

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Α.Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Καθηγητής Α.Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

**«Μελέτη των Μονοπατιών Σηματοδότησης των Προϊόντων Προχωρημένης
Γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε Κύτταρα Ωοθήκης και Ενδοθηλίου»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΑΔΑΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2013



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ·
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΙΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΚΗΡΟΝΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΞΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΕΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΟΙΣ ΙΗΤΡΙΚΟΙΣ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΠΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠΙ ΨΟΦΟΝΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ Ι ΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕ ΤΡΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΜΕΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΣ ΗΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΘΟΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΙΝΟΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΑΘΙΣΝΤΑΣ, ΕΣΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΤΑΣΙ Η ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΣΤΟ ΕΣΤΙΝ ΠΑΡΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΘΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΣΙΑΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ Η ΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΣΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΡΑΤΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ Ε ΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ·
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ. Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΙΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΟΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΜΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΩ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΓΥΩΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚ ΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΓΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΓΓΕΛΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΣΗΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΨΟΡΑΣ ΓΑΙ ΣΑΤΤΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΓΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΩΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Copyright © Χρήστος Αδαμόπουλος 2013

Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

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



*Στην μητέρα μου και τα αδέρφια μου για
την αμέριστη υποστήριξη*

*«Μη φυλάγεσαι από την αταξία
είναι ευφυής*

Η τάξη είναι αγκύλωση Φυλάξου

Η τάξη στο ανατομείο

Ψάξε μέσα της για νεοπλάσματα

για άτυπα κύτταρα αριθμού

για συμφύσεις χωροχρόνου

Το Χάος σηματοδοτεί δε λέει»

Έκτωρ Κακναβάτος-Χαοτικά I

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

06-02-2008

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

15-04-2008

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

ΕΥΑΝΘΙΑ ΔΙΑΜΑΝΤΗ-ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΠΠΠΕΡΗ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

29-07-2008

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ Α΄ ΠΡΟΟΔΟΥ:

29-07-2009

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ Β΄ ΠΡΟΟΔΟΥ:

30-07-2010

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ Γ΄ ΠΡΟΟΔΟΥ:

02-4-2012

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ :

21-06-2013

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Χρήστος Αδαμόπουλος

Ημ/νία Γέννησης: 11/04/1981

E-mail: chr.adamopoulos@gmail.com

Οδός: Σαμοθράκης 10 Χαλάνδρι 15233, Αθήνα

Τηλ: 210-6894433, 6974293343

Εκπαίδευση

- 2008-2013 -Υποψήφιος διδάκτορας, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Επιβλέπων: Καθ. Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου
-Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Μοριακή Ιατρική», Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, *Βαθμός Πτυχίου: «Άριστα»*
- 2001-2007 Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, *Βαθμός Πτυχίου: «Λίαν Καλώς»*
- 1996-1999 Γενικό Λύκειο Κυπαρισσίας, *Βαθμός Απολυτηρίου: «Άριστα» (19 & 1/11)*

Πειραματική/Εργαστηριακή εμπειρία

- 2006-σήμερα Επιστημονικός συνεργάτης, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- 2010-2011 Ερευνητικό πρόγραμμα χρηματοδοτούμενο από το Κοινωφελές Ίδρυμα Ιωάννη Σ. Λάτση: «*Ο Ρόλος της Μηχανικής Φόρτισης στην Αντιμετώπιση της Οστεοπόρωσης: Σχεδιασμός μοντέλου μηχανικής διέγερσης οστεοβλαστικών κυττάρων για την διερεύνηση θεραπευτικών εφαρμογών*» (Επιστημ. Υπευθ.: Αν. Καθ. Ε.Μπάσδρα)
- 2009-2010 Ερευνητικό πρόγραμμα χρηματοδοτούμενο από το Κοινωφελές Ίδρυμα Ιωάννη Σ. Λάτση: «*Επιπτώσεις των πλούσιων σε γλυκοτοζίνες γευμάτων (ταχυφαγείας) στο αναπαραγωγικό σύστημα γυναικών με Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών. Διατροφικές λύσεις βελτίωσης των συνεπειών του συνδρόμου*» (Επιστημ. Υπευθ.: Καθ. Α.Γ. Παπαβασιλείου)
- 2006-2007 Πρόγραμμα «Καποδίστριας»: «*Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών πρωτοπαθούς και δευτερογενούς γλοιωματογένεσης*» (Επιστημ. Υπευθ.: Επικ. Καθ. Χριστίνα Πιπέρη)
- 2005-2006 -Πρόγραμμα Ογκολογίας του Υπουργείου Υγείας για το έτος 2005: «*Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών γλοιωματογένεσης σε δείγμα ελληνικού πληθυσμού: Επιλογή στόχων για εφαρμογή δοκιμασιών χημειοευαισθησίας*», (Επιστημ. Υπεύθ. Επικ. Καθ. Χριστίνα Πιπέρη)
-Πειραματική Εργασία: «*Μελέτη της επίδρασης των γλυκοτοζινών επί αναπαραγωγικού συστήματος θήλεων επίμυων*», (Επιστημ. Υπεύθ. Καθ. Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη)
- 2005-2006 Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας: «*Αμφίδρομες λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις σε σάυρες της οικογένειας Lacertidae*», Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μετεκπαίδευση

Ιούλ 2008 University of California, Davis, School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, (Επιστημ. Υπεύθ. Prof. Antony J. Duleba), «Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων θήκης από ωοθήκες επίμυων»

Υποτροφίες:

2010-2013 Υποτροφία έρευνας: Ηράκλειτος Π. Χρηματοδότηση για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής. Συγχρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από Εθνικούς Πόρους διαμέσου του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ)

Ιούλιος 2010 Υποτροφία του Ιδρύματος Ωνάση, διαλέξεις Βιολογίας: “*Basic And Applied Virology*”, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη

Ιούλιος 2009 Υποτροφία του Ιδρύματος Ωνάση, διαλέξεις Βιολογίας: “*Immunobiology*”, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη

Ιούλιος 2007 Υποτροφία του Ιδρύματος Ωνάση, διαλέξεις Βιολογίας: “*Channels and Channelopathies*”, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη

Βραβεία:

Οκτ. 2012 Βραβείο: «*Young investigator Award*» για την εργασία “*Androgens and dietary glycotoxins excess may accelerate ovarian tissue ageing by decreasing GLO-I activity: a link to PCOS syndrome*”, 22nd European Tissue Repair Society Congress, Athens, Greece

Μάιος 2012 Έπαθλο «*Σωτήρης Παπασταμάτης*», Α΄ Βραβείο, για την πρωτότυπη, βιοϊατρική ερευνητική μελέτη «*Οι πολυκυστίνες 1 και 2 ως προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου*». Ιατρική Εταιρεία Αθηνών, 38ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο

Μάρτ. 2012 1ο βραβείο για την αναρτημένη ανακοίνωση «*Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζύλιωσης ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση της ενδοθηλίνης-1 στο ενδοθήλιο μέσω των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1*» 21ο Συνέδριο Ημέρες Παθολογίας, Αθήνα

Απρ. 2010 2ο βραβείο για την εργασία «*Αλλεργία με IgE Μηχανισμό στο ωμό και όχι στο βρασμένο λάχανο. Διερεύνηση ευαισθητοποίησης σε άλλα συγγενή λαχανικά και φρούτα*» 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Αθήνα

Οκτ. 2008 1ο βραβείο για την εργασία «*Συσσώρευση των τελικών προϊόντων μη ενζυμικής γλυκοζύλιωσης (Advanced Glycation End-products-AGEs) και η εντόπιση του υποδοχέα τους στο αναπαραγωγικό σύστημα αρρένων μυών με μεταβολικό σύνδρομο*» 19ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική

Μέλος επιστημονικών εταιρειών

The Endocrine Society (Fellow/Student Associate Member) (2012-σήμερα)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

Δημοσιεύσεις:

1. Role of Histone Lysine Methyltransferases SUV39H1 and SETDB1 in Gliomagenesis: Modulation of Cell Proliferation, Migration, and Colony Formation. Spyropoulou A, Gargalionis A, Dalagiorgou G, Adamopoulos C, Papavassiliou KA, Lea RW, Piperi C, Papavassiliou AG. *Neuromolecular Med.* 2013 Aug 13. [Epub ahead of print]
2. Sox11 expression in astrocytic gliomas: correlation with Nestin/c-MET/IDH1-R132H expression phenotypes, p-STAT-3 and survival. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr E, **Adamopoulos C**, Fragkou P, Boviatsis E, Themistocleous M, Petraki K, Vrettakos G, Sakalidou M, Samaras V, Zisakis A, Saetta A, Chatziandreou I, Patsouris E, Piperi C, *Br J Cancer.* 2013 May 28;108(10):2142-52.
3. Advanced Glycation End-products induce Endoplasmic Reticulum stress in human aortic endothelial cells. **Adamopoulos C**, Farmaki E, Spilioti E, Kiaris H, Piperi C, Papavassiliou AG. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Mar 2:1-10.
4. Mechanical stimulation of polycystin-1 induces human osteoblastic gene expression via potentiation of the calcineurin/NFAT signalling axis. Dalagiorgou G., Piperi C., Georgopoulou U., **Adamopoulos C.**, Basdra E.K., Papavassiliou AG. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Jan;70(1):167-80.
5. Polycystic ovary syndrome offspring display increased oxidative stress markers comparable to gestational diabetes offspring. Boutzios G, Livadas S, Piperi C, Vitoratos N, **Adamopoulos C**, Hassiakos D, Iavazzo C, Diamanti-Kandarakis E. *Fertil Steril.* 2013 Mar 1;99(3):943-50.
6. Deregulated Chromatin Remodeling in the Pathobiology of Brain Tumors. Spyropoulou A, Piperi C, **Adamopoulos C**, Papavassiliou AG. *Neuromolecular Med.* 2012 Nov 1. [Epub ahead of print] *Neuromolecular Med.* 2013 Mar;15(1):1-24.
7. Phosphorylated 4E-Binding Protein 1 (p-4E-BP1): a novel prognostic marker in human astrocytomas. P. Korkolopoulou, G. Levidou, E. El-Habr, C. Piperi, **C. Adamopoulos**, V. Samaras, E. Boviatsis, I. Thymara, G. Vretakos, EA. Trigka, S. Sakellariou, N. Kavantzias, E. Patsouris, A. Saetta. *Histopathology.* 2012 Aug;61(2):293-305.
8. Histone modifications as a pathogenic mechanism of colorectal tumorigenesis. Gargalionis AN, Piperi C, **Adamopoulos C**, Papavassiliou AG. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Aug;44(8):1276-89.
9. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. C. Piperi, **C. Adamopoulos**, G. Dalagiorgou, E. Diamanti-Kandarakis, A.G. Papavassiliou, *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jul;97(7):2231-42.
10. Expression of Interleukin-8 (IL-8) Receptor CXCR2 and Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3) in Astrocytic Tumors. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr EA, **Adamopoulos C**, Samaras V, Zisakis A, Kavantzias N, Boviatsis E, Fragkou P, Papavassiliou AG, Patsouris E, Piperi C, *Mol Med.* 2012 May 9;18:379-88.
11. The clinical and prognostic significance of activated Akt-mTOR pathway in human astrocytomas. E. El-Habr, **C. Adamopoulos***, G. Levidou, A. Saetta, P. Korkolopoulou, C. Piperi. *Neurol Res Int.* 2012; 2012: 454957. (**co-authorship*)

12. Strong and positive association of Endothelin-1 with AGEs in PCOS: A causal relationship or a bystander? Christakou C., Economou F., Livadas S., Piperi C., **Adamopoulos C.**, Marinakis E., Diamanti-Kandarakis E. *Hormones*, 2011 Oct-Dec;10(4):292-7

13. High Incidence of MGMT and RARbeta Promoter Methylation in Primary Glioblastomas: Association with Histopathological Characteristics, Inflammatory Mediators and Clinical Outcome. Piperi C, Themistocleous MS, Papavassiliou GA, Farmaki E, Levidou G, Korkolopoulou P, **Adamopoulos C**, Papavassiliou AG, *Mol Med* 2010 Jan-Feb;16(1-2):1-9.

Προφορικές-Αναρτημένες Ανακοινώσεις:

- 1) “Interference of Advanced Glycation End-products signaling with collagen cross-linking in human endothelium” **C. Adamopoulos**, C. Piperi, P. Korkolopoulou, G. Dalagiorgou, A. Spyropoulou, A. N. Gargalionis, E. A. Kandaraki, A. G. Papavassiliou, The Endocrine Society’s 95th Annual Meeting & Expo, San Francisco, USA 15-18/06/2013
- 2) «Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης ρυθμίζουν την έκφραση της οξειδάσης της λυσίνης στο ενδοθήλιο» **X. Αδαμόπουλος**, X. Πιπέρη, Π. Κορκολοπούλου, Γ. Νταλαγιώργου, Α.Ν. Γαργαλιώνης, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη, Α.Γ. Παπαβασιλείου, 40^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα, 17-20/04/2013
- 3) «Οι πολυκυστίνες ως νέοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες στο αδενοκαρκίνωμα στον καρκίνο του παχέος εντέρου» Α.Ν. Γαργαλιώνης, Γ. Νταλαγιώργου, Π. Κορκολοπούλου, X. Πιπέρη, Γ. Λεβίδου, Α. Ζήζη-Σερμπετζόγλου, **X. Αδαμόπουλος**, Ι. Καραβοκυρός, Ν. Τσαβαρής, Ε.Κ. Μπάσδρα, Α.Γ. Παπαβασιλείου. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας, Αθήνα, Ελλάδα 18-20/10/2012
- 4) “Induction of endoplasmic reticulum stress by Advanced Glycation End-products in human endothelial cells” **C. Adamopoulos**, E. Farmaki, H. Kiaris, A. G. Papavassiliou, 22nd European Tissue Repair Society Meeting, Athens, Greece, 4-5/10/2012
- 5) “Polycystins: mechanosensor molecules with prognostic significance in colorectal cancer” Α.Ν. Gargalionis, G. Dalagiorgou, P. Korkolopoulou, C. Piperi, G. Levidou, **C. Adamopoulos**, A. Zizi-Sermpetzoglou, N. Tsavaris, E.K. Basdra, A. G. Papavassiliou, 22nd European Tissue Repair Society Meeting, Athens, Greece, 4-5/10/2012
- 6) “Androgens and dietary glycotoxins excess may accelerate ovarian tissue ageing by decreasing GLO-I activity: a link to PCOS syndrome” E. Kandaraki, A. Chatzigeorgiou, C. Piperi, E. Palioura, S. Palimeri, **C. Adamopoulos**, A. G. Papavassiliou, M. Koutsilieris, 22nd European Tissue Repair Society Meeting, Athens, Greece, 4-5/10/2012
- 7) “Impact of dietary Advanced Glycation End Products (AGEs) modifications on metabolic and hormonal profile in women with polycystic ovary syndrome” S. Livadas, E. Tantalaki, C. Piperi, Anastasios Kollias, **C. Adamopoulos**, A. Koulouri, C. Christakou, E. Diamanti-Kandarakis, 22nd European Tissue Repair Society Meeting, Athens, Greece, 4-5/10/2012
- 8) “Polycystins 1 and 2 as novel prognostic markers in colorectal cancer” Α.Ν. Gargalionis, G. Dalagiorgou, P. Korkolopoulou, C. Piperi, G. Levidou, **C. Adamopoulos**, A. Zizi-Sermpetzoglou,

N. Tsavaris, E.K. Basdra, A. G. Papavassiliou, 37th ESMO Congress (Abstract), Vienna, Austria, 28/09-02/10/2012

- 9) “Advanced Glycation End-Products induce endoplasmic reticulum stress in endothelium” **C. Adamopoulos**, E. Farmaki, H. Kiaris, A. G. Papavassiliou, C. Piperi, 11⁰ International Symposium on the Maillard Reaction, Nancy, France, 16-20/09/2012
- 10) “Advanced Glycation End-Products regulate lysyl oxidase expression in endothelium” **C. Adamopoulos**, C. Piperi, P. Korkolopoulou, G. Dalagiorgou, A. Spyropoulou, E. Diamanti-Kandarakis, A. G. Papavassiliou, 11⁰ International Symposium on the Maillard Reaction, Nancy, France, 16-20/09/2012
- 11) “Prognostic implications of interleukin-8 (IL-8)-CXCR axis in astrocytic tumors” P. Korkolopoulou, G. Levidou, E. El-Habr, **C. Adamopoulos**, P. Fragkou, N. Kavantzias, E. Boviatsis, A. G. Papavassiliou, C. Piperi, E. Patsouris, 10th European Congress of Neuropathology-British Neuropathological Society-Euro CNS, Edinburgh, Scotland, UK 31/07-04/08/2012
- 12) “Transcriptional regulation of endothelin-1 expression by Advanced Glycation End-Products in human aortic endothelium is mediated via NF-κB and AP-1” **C. Adamopoulos**, C. Piperi, G. Dalagiorgou, A. N. Gargalionis, E. A. Kandaraki, E. Diamanti-Kandarakis, A. G. Papavassiliou, The Endocrine Society’s 94th Annual Meeting & Expo, Houston, USA 23-26/06/2012
- 13) “Impact of dietary Advanced Glycation End Products (AGEs) modifications on metabolic and hormonal profile in women with polycystic ovary syndrome” S. Livadas, E. Tantalaki, C. Piperi, Anastasios Kollias, **C. Adamopoulos**, A. Koulouri, C. Christakou, E. Diamanti-Kandarakis, The Endocrine Society’s 94th Annual Meeting & Expo, Houston, USA 23-26/06/2012
- 14) «Φωσφορυλιωμένη 4E-πρωτεΐνη σύνδεσης 1 (p-4E-BP1):Ένας νέος προγνωστικός δείκτης για τα αστροκυτταρικά νεοπλάσματα» Π. Κορκολοπούλου, Γ. Λεβίδου, Η. Ελ-Χαμπέρ, Χ. Πιπέρη, **Χ. Αδαμόπουλος**, Ε. Μποβιάτσης, Ε.Α. Τρίγκα, Π. Φράγκου, Σ. Σακελαρίου, Ν. Καβαντζιάς, Ε. Πατσούρης, Α.Α. Σαέττα, 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Καλαμάτα, Ελλάδα, 13-16/06/2012
- 15) «Τα προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης επάγουν την έκφραση της ενδοθηλίνης-1 σε καλλιέργειες ανθρωπίνων ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nuclear Factor-κB» **Χ. Αδαμόπουλος**, Χ. Πιπέρη, Γ. Νταλαγιώργου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη, Α. Γ. Παπαβασιλείου, 38ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα, 16-19/05/2012
- 16) «Συσχέτιση της έκφρασης των Πολυκυστινών 1 και 2 με την κλινική έκβαση και πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου» Α.Ν. Γαργαλιώνης, Π. Κορκολοπούλου, Χ. Πιπέρη, Γ. Λεβίδου, Α. Ζήξη-Σερμπετζόγλου, **Χ. Αδαμόπουλος**, Γ. Νταλαγιώργου, Ι. Καραβοκυρός, Ε. Πατσούρης, Ν. Τσαβαρής, Ε.Κ. Μπάσδρα, Α.Γ. Παπαβασιλείου. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα, Ελλάδα 26-28/04/2012
- 17) «Γονιδιακή ρύθμιση της ενδοθηλίνης-1 από τα προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης μέσω των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στο ενδοθήλιο». **Χ. Αδαμόπουλος**, Χ. Πιπέρη, Γ. Νταλαγιώργου, Α.Ν. Γαργαλιώνης, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη, Α.Γ. Παπαβασιλείου. 39ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα 4-7/04/2012

- 18) «Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση της ενδοθελίνης-1 στο ενδοθήλιο μέσω των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και AP-1». **Χ. Αδαμόπουλος**, Χ. Πιπέρη, Γ. Νταλαγιώργου, Α.Ν. Γαργαλιώνης, Ε. Κανδαράκη, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη, Α.Γ. Παπαβασιλείου». 21ο Συνέδριο Ημέρες Παθολογίας, Αθήνα, Ελλάδα 16-17/03/2012
- 19) “Prognostic significance of the mTOR pathway in human astrocytomas: a multivariate survival analysis, including IDH1-R132H presence, with emphasis on p-4E-BP1.” Ε. El-Habr, P. Korkolopoulou, G. Levidou, C. Piperi, **C. Adamopoulos**, V. Samaras, E. Boviatsis, G. Vretakos, I. Thymara, E. Trigka, S. Sakellariou, E. Patsouris, A. Saetta – International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma, Valencia, Spain 23-25/06/2011
- 20) “How do we move teeth after all: the role of Polycystin-1 in mechanically induced alveolar bone remodelling.” G. Dalagiorgou, C. Piperi, U. Georgopoulou, **C. Adamopoulos**, A. Papavassiliou, E. Basdra. EOS 87th Congress of the European Orthodontic Society, Istanbul, Turkey 19-23/06/2011
- 21) «Αλλεργία με IgE Μηχανισμό στο ωμό και όχι στο βρασμένο λάχανο. Διερεύνηση ευαισθητοποίησης σε άλλα συγγενή λαχανικά και φρούτα». Γ. Πούλιος, Β. Βοβόλης, Κ. Κουτσοστάθης, Χ. Πιπέρη, Α. Γαργαλιώνης, Α. Παπαχρόνη, **Χ. Αδαμόπουλος**. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Αθήνα, Ελλάδα 16/04/2010
- 22) «Επίδραση της διατροφής με γλυκοτοξίνες σε ορμονικές παραμέτρους της επινεφριδικής λειτουργίας, φυσιολογικών και αρρενοποιηθέντων θηλέων επίμυων». Σ. Παλημέρη, Ε. Παλιούρα, Ε. Κανδαράκη, Α. Παπαλόης, Χ. Πιπέρη, Φ. Οικονόμου, **Χ. Αδαμόπουλος**, Α. Παπαβασιλείου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη. 37ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα 14-17/04/2010
- 23) «Επίδραση διατροφικών γλυκοτοξινών [Advanced Glycated End products (AGEs)] σε προεφηβικά αρρενοποιηθέντες θήλειες επίμυες». Ε. Παλιούρα, Ε. Κανδαράκη, Σ. Παλυμέρη, Χ. Πιπέρη, **Χ. Αδαμόπουλος**, Α. Παπαβασιλείου, Α. Παπαλόης, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη. 36ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα 8-11/04/2009
- 24) «Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με στεφανιαία νόσο έχουν αυξημένα επίπεδα τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης [Advanced Glycated End products (AGEs)] και ανδρογόνων». Ξ. Ξυράφης, Κ. Τούτουζας, Γ. Μπούτζιος, Σ. Λιβαδάς, Α. Καραχάλιος, Χ. Πιπέρη, **Χ. Αδαμόπουλος**, Χ. Στεφανάδης, Α. Παπαβασιλείου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη. 36ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα 8-11/04/2009
- 25) «Μελέτη των επιπέδων ορού των προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης [Advanced Glycated End products (AGEs)] σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με τα επίπεδα των ανδρογόνων». Μ. Χρήστου, Ε. Λαμπρινουδάκη, Σ. Λιβαδάς, Φ. Οικονόμου, Χ. Πιπέρη, **Χ. Αδαμόπουλος**, Γ. Τσαγκαράκη, Γ. Κρεατσάς, Α. Παπαβασιλείου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη. 36ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα 8-11/04/2009
- 26) «Η επίδραση των διατροφικών γλυκοτοξινών [Advanced Glycated End products (AGEs)] στο οξειδωτικό στρες και στις ορμονικές παραμέτρους σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών». Ε. Τανταλάκη, Χ. Πιπέρη, Α. Κουλούρη, **Χ. Αδαμόπουλος**, Α. Ζέρβα, Α. Παπαβασιλείου, Ε.

Διαμάντη-Κανδαράκη. 36ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα 8-11/04/2009

- 27) “Serum levels of the Soluble isoform of the Receptor of Advanced Glycosylated End products (sRAGE) are increased in women with PCOS”, C. Piperi, E. Tantalaki, S. Livadas, C. Christakou, X. Xyrafis, **C. Adamopoulos**, S. Kandarakis, A. Papavasiliou and E. Diamanti-Kandarakis – 10th European Congress of Endocrinology, Berlin, Germany 3-7/5/2008
- 28) «Συσσώρευση των τελικών προϊόντων μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-products - AGEs) και η εντόπιση του υποδοχέα τους στο αναπαραγωγικό σύστημα αρρένων μυών με μεταβολικό σύνδρομο. Δ. Μοσχονάς, Δ. Μητρόπουλος, Χ. Πιπέρη, Δ. Περρέα, **Χ. Αδαμόπουλος**, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη, Α. Παπαβασιλείου - 19ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική, Ελλάδα 1-5/10/2008
- 29) «Ανίχνευση των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και του υποδοχέα τους στο αναπαραγωγικό σύστημα αρρένων μυών με μεταβολικό σύνδρομο», Δ. Μοσχονάς, Δ. Μητρόπουλος, Χ. Πιπέρη, Δ. Περρέα, **Χ. Αδαμόπουλος**, Α. Παπαβασιλείου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη - 35ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα 19-22/3/2008
- 30) «Επίπεδα του διαλυτού τμήματος του υποδοχέα των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (sRAGE) στον ορό γυναικών με Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών», Χ. Χρηστάκου, Χ. Πιπέρη, Σ. Λιβαδάς, Ε. Τανταλάκη, Ξ. Ξυράφης, **Χ. Αδαμόπουλος**, Σ. Κανδαράκης, Α. Παπαβασιλείου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη - 35ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα 19-22/3/2008
- 31) «Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες στις χρόνιες επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2», Κ. Αλεξανδράκη, Χ. Πιπέρη, Κ. Μακρυλάκης, **Χ. Αδαμόπουλος**, Ε. Φαρμάκη, Ε. Σταμούλη, Γ. Καλτσάς, Α. Καλοφούτης -34ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Κρήτη, Ελλάδα 28-31/3/2007
- 32) «Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1» Κ. Αλεξανδράκη, Χ. Πιπέρη, Κ. Μακρυλάκης, **Χ. Αδαμόπουλος**, Ε. Φαρμάκη, Ε. Σταμούλη, Γ. Καλτσάς, Α. Καλοφούτης - 10ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα 28/2-4/3/2007
- 33) «Η αυτοτομία της ουράς σε νεαρά άτομα σαυρών της οικογένειας Lacertidae», Π. Παφίλης, **Χ. Αδαμόπουλος**, Α. Σκέλλα, Χ. Σίμου, Ε. Δ. Βαλάκος - 28ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Ιωάννινα, Ελλάδα 18-20/5/2006

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή της παρούσας διδακτορικής διατριβής και μέντορα μου κύριο Αθανάσιο Γ. Παπαβασιλείου για την εμπιστοσύνη, την επιστημονική και ηθική καθοδήγησή του σε όλο το χρονικό διάστημα της εκπόνησής της. Με την ίδια θέρμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κυρία Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη, για την καθοδήγηση της και την πολύπλευρη στήριξή της. Η συνεργασία μου μαζί της αποτελεί αναμφισβήτητη τιμή. Από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Χριστίνα Πιπέρη υπό την αδιάκοπη επίβλεψη και καθοδήγηση της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα διατριβή. Η βοήθειά της αλλά και η στήριξή της σε καθημερινή βάση στιγμή υπήρξε ανεκτίμητη.

Για την οικονομική ενίσχυση της διατριβής αυτής από το ερευνητικό χρηματοδοτούμενο έργο «Ηράκλειτος-II», το οποίο χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από Εθνικούς πόρους εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου καθώς και σε όλους όσους μέσα από το πρόγραμμα αυτό συνέβαλλαν προς την κατεύθυνση αυτή.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Ευθυμία Μπάσδρα για την συμπαράσταση και την ηθική υποστήριξη. Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιπποκράτη Κιάρη για τη παραγωγική συνεργασία μας αλλά και για τις πάντοτε διαφωτιστικές συμβουλές του.

Ευχαριστώ, επίσης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πηνελόπη Κορκολοπούλου για την συνεργασία στην πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην Δρ. Γεωργία Νταλαγιώργου-Κογεράκη μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την πολύτιμη βοήθεια της καθώς επίσης και για την καθημερινή συνεργασία μας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια και φίλη, Δρ. Έλενα Φαρμάκη, για τη συνεργασία μας καθώς επίσης και για την συμπόρευσή μας από την πρώτη στιγμή που βρεθήκαμε μαζί στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας. Ευχαριστώ επίσης ολόθερμα για τη στενή συνεργασία μας αλλά και για την φιλία τους την Ελιάννα Σπηλιώτη, τον Αντώνη Γαργαλιώνη και την Αναστασία Σπυροπούλου.

Ευχαριστώ, επίσης, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας που συνέβαλλαν με τον έναν ή τον άλλο τρόπο στην υλοποίηση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για τη στήριξη, την κατανόηση και την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου, αλλά και όλους εκείνους που κατά κάποιο τρόπο συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και τους οποίους ίσως παρέλειψα να αναφέρω.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Summary.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Βιοχημεία των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)	6
1.1.1 Υποδοχέας των AGEs - RAGE	17
1.1.2 Σηματοδότηση των AGEs.....	24
1.1.2.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP-κινασών	28
1.2 AGEs και Αναπαραγωγικό Σύστημα.....	31
1.3 AGEs και Ενδοθήλιο	35
1.4 Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ).....	44
1.4.1 Μοριακοί συνοδοί στο ΕΔ	45
1.4.2 Μονοπάτια σηματοδότησης στην απόκριση του στρες του ΕΔ.....	48
1.4.3 Αναγνώριση του στρες του ΕΔ από τους μοριακούς συνοδούς.....	56
1.4.4 Στρες του ΕΔ και απόπτωση	57
1.5 AGEs και Στρες του ΕΔ.....	61
1.5.1 Στρες του ΕΔ και Μεταβολική Ομοιόσταση.....	61
1.5.2 Μοριακή διασυνομιλία μεταξύ σηματοδότησης των AGEs και του στρες του ΕΔ	64
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	67
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	68
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	68
3.2 Απομόνωση πρωτογενών κυττάρων.....	70
3.2.1 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφαλική φλέβα (HUVECs) ..	70
3.2.2 Απομόνωση κυττάρων θήκης από επίμυες (Theca cells).....	72
3.3 Δοκιμασία με χρήση χρωστικής Trypan Blue.....	73
3.4 Δοκιμασία MTT	74
3.5 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	75
3.6 Απομόνωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	76

3.7 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	77
3.8 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	77
3.9 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση	78
3.10 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)	81
3.11 Ανοσοδοκιμασία τύπου ELISA που βασίζεται σε κύτταρα (CASE-kit).....	83
3.12 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα.....	86
3.13 RT-PCR (Reverse Transcription PCR).....	86
3.14 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	88
3.15 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	92
3.16 Ποσοτική PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR GREEN.....	93
3.17 Δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA)	94
3.17.1 Προσθήκη βιοτίνης στο 3' άκρο των ανιχνευτών	96
3.17.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	97
3.17.3 Ποσοτικοποίηση και εκτίμηση των αποτελεσμάτων.....	100
3.18 Ανοσοϊστοχημεία σε αορτικό ενδοθήλιο επίμυων	100
3.19 Κυτταρομετρία ροής.....	101
3.20 Στατιστική ανάλυση	102
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	103
4.1 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε HUVECs.....	103
4.2 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε κύτταρα θήκης επίμυων.....	108
4.3 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε HAECs.....	112
4.4 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε αορτικό ενδοθήλιο επίμυων.....	117
4.5 Αλληλεπίδραση της σηματοδότησης των AGEs και του Στρες του ΕΔ	121
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	129
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141

Περίληψη

Τα προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End products, AGEs) είναι μόρια υψηλής δραστηριότητας, τα οποία σχηματίζονται ενδογενώς από την μη ενζυματική γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων ή προέρχονται από εξωγενείς πηγές. Αυτά περιλαμβάνουν μια πολύπλοκη και ετερογενή ομάδα συστατικών με ποικίλη μοριακή δομή και βιολογική λειτουργία. Ο σχηματισμός των AGEs έχει ενοχοποιηθεί στην παθογένεια των διαβητικών επιπλοκών, νευροεκφυλιστικών διαταραχών, του γήρατος και της αρτηριοσκλήρυνσης και της φλεγμονής. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί η παρουσία αυξημένων επιπέδων AGEs και του κύριου σηματοδοτικού υποδοχέα τους (Receptor of AGE, RAGE) στον ορό και στον ωοθηκικό ιστό γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ). Η αλληλεπίδραση των AGEs με τον υποδοχέα τους RAGE ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενέχονται στην ενδοθηλιακή και αναπαραγωγική δυσλειτουργία, καταστάσεις που χαρακτηρίζουν σε μεγάλο βαθμό το ΣΠΩ.

Το αρχικό στάδιο της παρούσας μελέτης περιελάμβανε την μελέτη της επίδραση των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-products, AGEs) με τη χορήγηση AGE-τροποποιημένης αλβουμίνης βόειου ορού (AGE-bovine serum albumin, AGE/BSA) σε φυσιολογικό και παθολογικό ανθρώπινο ενδοθήλιο. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού των AGEs που περιλαμβάνουν την ERK1/2 και την c-JUN σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφαλίου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial-cells, HUVECs) φυσιολογικών γυναικών, γυναικών με ΣΠΩ και Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση των AGEs δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της κινάσης ERK1/2 μεταξύ φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων και από ΣΠΩ και διαβήτη κήσης. Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της c-JUN στα ενδοθηλιακά κύτταρα από ΣΠΩ κατόπιν χορήγησης AGEs σε σχέση με τα φυσιολογικά ή στα προερχόμενα από διαβήτη κήσης. Η αυξημένη ενεργοποίηση του c-JUN στο ΣΠΩ οφείλεται στη χορήγηση των AGEs. Η ίδια διερεύνηση πραγματοποιήθηκε και σε καλλιέργειες κυττάρων θήκης από επίμυες, όπου και οι δύο

κινάσες ERK1/2 και c-JUN, μετά από χορήγηση των AGEs ενεργοποιήθηκαν ειδικά μέσω φωσφορυλίωσης.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η συμμετοχή των επαγόμενων από τα AGEs μεταγραφικών παραγόντων NF-κB (Nuclear Factor-κB) και AP-1 (Activator Protein-1) AGEs σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (HAECs, Human Aortic Endothelial Cells) στη γονιδιακή ρύθμιση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1, endothelin-1) και της οξειδάσης της λυσίνης (lysyl oxidase, LOX). Η ET-1 αποτελεί έναν βασικό παράγοντα αγγειοσυστολής και σημαντικό δείκτη αγγειακής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ενώ η LOX αποτελεί το κύριο ένζυμο σύνθεσης του κολλαγόνου και της ελαστίνης στο ενδοθήλιο, καταλύοντας τη δημιουργία διασυνδέσεων και συμμετέχοντας ενεργά στην αναδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην αγγειακή ομοίωση. Η χορήγηση AGE-BSA σε καλλιέργειες HAECs επάγει σημαντικά τη μεταγραφή των γονιδίων της ET-1 και της LOX κατά ένα χρονο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς και την πρωτεϊνική τους έκφραση. Η επαγωγή αυτή μεσολαβείται από την ενεργοποίηση και πρόσδεση στους υποκινητές και των δύο γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1. Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του ενδοθηλίου της αορτής φυσιολογικών επίμυων που είχαν λάβει δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs έδειξε υψηλή έκφραση και συνεντοπισμό των AGEs, RAGE, ET-1 και LOX σε σχέση με τους μάρτυρες.

Παράλληλα μελετήθηκε η πιθανή επίδραση των AGEs στην επαγωγή του Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ) και των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μορίων. Η χορήγηση AGE-BSA ελάττωσε στατιστικά σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των HAECs κατά ένα δόσο- και χρόνο εξαρτώμενο τρόπο ενώ παρατηρήθηκε άμεση επαγωγή (24 και 48 ώρες) των μοριακών συνοδών, δεικτών, της επαγωγής του στρες του ΕΔ (GRP78, GRP94) καθώς επίσης και επαγωγή του μεταγραφικού ενεργοποιητή XBP-1. Δείχθηκε επίσης μετέπειτα επαγωγή του phospho-eIF2 α και του προαποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα CHOP (48 και 72 ώρες) που σχετίστηκε με αυξημένο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων στους ίδιους χρόνους.

Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης των LOX και ET-1 μέσω ενεργοποίησης του άξονα AGE-RAGE καθώς και η γονιδιακή τους ρύθμιση από τους

μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1, αποτελεί ένα πιθανό ενδοκυττάριο μοριακό μηχανισμό που συμβάλλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηριστική της παχυσαρκίας, των μικροαγγειακών διαβητικών επιπλοκών, της αθηρογένεσης και του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών. Η παρούσα διατριβή δείχνει για πρώτη φορά την άμεση επαγωγή από τα AGEs του στρες του ED σε ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα, παίζοντας ένα σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Summary

Advanced glycation products (AGEs) are highly reactive molecules, which are formed from the inherently non-enzymatic glycosylation of proteins, lipids and nucleic acids or derived from exogenous sources. These include a complex and heterogeneous group of components with varying molecular structure and biological function. The formation of AGEs has been implicated in the pathogenesis of diabetic complications, neurodegenerative disorders, aging and atherosclerosis and inflammation. Recently, it has been demonstrated the presence of elevated AGEs levels of and their principal signaling receptor signaling (Receptor of AGE, RAGE) in serum and ovarian tissue of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). The interaction of AGEs with their receptor RAGE activates intracellular signaling pathways that are involved in endothelial and reproductive dysfunction, conditions that characterize PCOS.

The first part of this project included the study of AGE effects in normal and pathological human endothelium after treatment with AGE-modified bovine serum albumin (AGE/BSA). The study involved activation/phosphorylation of specific intracellular target proteins of the signaling pathway of AGEs, specifically ERK1/2 and c-JUN, in cultured endothelial cells from umbilical vein (HUVECs) of normal women, women with PCOS and gestational diabetes. Administration of AGEs resulted in no statistically significant activation of the kinase ERK1/2 between normal endothelial cells from PCOS women and those with gestational diabetes. However, a statistically significant activation of c-JUN was observed in endothelial cells following administration of AGEs compared to normal or derived from gestational diabetes. Increased activation of c-JUN was also observed in PCOS after AGEs treatment. The same investigation was also conducted in cell cultures from rat ovaries (theca cells) where both kinases ERK1/2 and c-JUN were specifically activated after administration of AGEs.

Then we investigated the involvement of the AGEs induced transcription factors NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) and AP-1 (Activator Protein-1) AGEs in human aortic endothelial cells (HAECs, Human Aortic Endothelial Cells) in the gene regulation of endothelin -1 (ET-1) and lysine oxidase (LOX). The ET-1 is a key factor

in vasoconstriction and an important indicator of vascular endothelial dysfunction. LOX on the other hand is the main enzyme implicated in the synthesis of collagen and elastin in the endothelium, catalyzing the formation of crosslinks and participating actively in the reconstruction of the extracellular matrix as well as contributing to vascular homeostasis. The administration of AGE-BSA in HAECs significantly induced gene transcription of ET-1 and LOX in a time- and dose-dependent manner and their protein expression. This induction is mediated by binding and activation of the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in the promoters of both genes. Furthermore, immunohistochemical investigation of normal aortic endothelium from rats that had received high in AGEs-diet showed increased expression and colocalization of AGEs, RAGE, ET-1 and LOX in the same areas.

In parallel, the effect of AGEs on the induction of endoplasmic reticulum stress (ER stress) was also investigated in endothelial cells. AGE-BSA administration significantly decreased proliferation of HAECs at a dose- and time-dependent manner, while there was an immediate induction (at 24 and 48 hours) of the molecular chaperons, GRP78, GRP94 which are representative markers of ER stress induction. Furthermore activation of the transcriptional activator, XBP-1 was also observed. In addition a subsequent induction of phospho-eIF2 α and of the proapoptotic transcription factor, CHOP (at 48 and 72 hours) was associated with the increased number of apoptotic cells at the same time points.

The elevated protein expression of LOX and ET-1 via activation of AGE-RAGE axis and gene regulation through the transcription factors NF- κ B and AP-1 suggest a potential intracellular molecular mechanism contributing to endothelial dysfunction that characterizes microvascular diabetic complications, obesity, atherogenesis and polycystic ovary syndrome. The present study shows for the first time the direct induction of ER stress by AGEs in human aortic endothelial cells, playing an important role in the apoptosis of endothelial cells.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοχημεία των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)

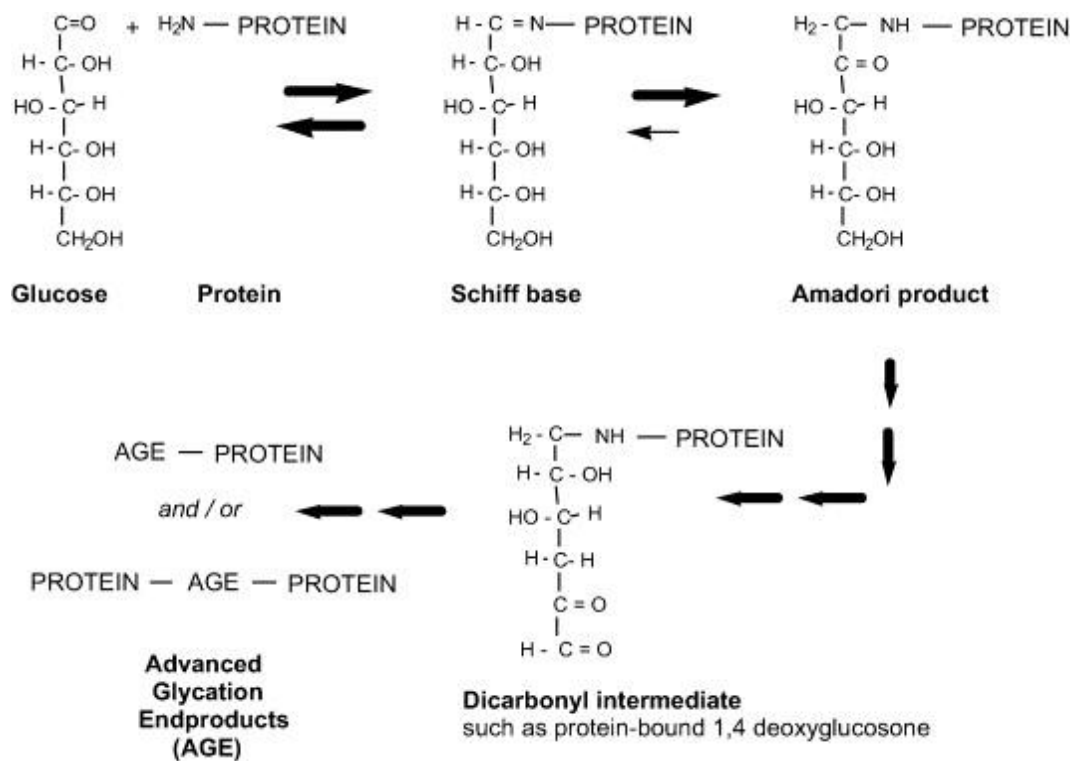
Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-products, AGEs) σχηματίζονται μη ενζυμικά από την αντίδραση ανηγμένων μορφών σακχάρων με πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Η αντίδραση αυτή, είχε περιγραφεί πρωταρχικά το 1912 από τον Γάλλο χημικό Louis Camille Maillard, στην προσπάθειά του να αναπαραγάγει την βιολογική πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ αποτελεί μια από τις βασικές αντιδράσεις της χημείας τροφίμων καθώς όταν συμβαίνει παράγει ένα χαρακτηριστικό χρυσο-καφέ χρώμα ή «browning effect» δίνοντάς επίσης χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Η επονομαζόμενη και αντίδραση Maillard, αποτελεί το κλασικό μονοπάτι σχηματισμού των AGEs ενώ για τη δημιουργία τους παίζουν καθοριστικό ρόλο οι υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά το μαγείρεμα [1].

Η αντίδραση Maillard στην πραγματικότητα δεν είναι μόνο μια αντίδραση αλλά μια σειρά μη ενζυμικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την αντίδραση καρβονυλικών ομάδων σακχάρων, όπως της γλυκόζης ή κάποιας άλλης δραστικής αλδεϋδης, που έχει αναχθεί, με αμινομάδες πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων ή φωσφολιπιδίων, σχηματίζοντας βάσεις Schiff, ακολουθούμενες από αναδιευθετήσεις Amadori και οξειδωτικές τροποποιήσεις (γλυκοξειδώσεις) που επάγονται από την επίδραση ελευθέρων ριζών οξυγόνου [2].

Η αυξημένη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση και η συσσώρευση των AGEs στους ιστούς έχει ενοχοποιηθεί καταφανώς στις διαβητικές επιπλοκές, καθώς μπορούν να μεταβάλλουν την ενζυμική ενεργότητα πρωτεϊνών, να ελαττώσουν την προσδετική ικανότητα με τους συνδέτες τους, να αλλάξουν το χρόνο ημίσειας ζωής των πρωτεϊνών και να τροποποιήσουν την «αντιγονικότητά» τους. Έχει αναφερθεί επίσης η παρουσία αυτό-αντισωμάτων ενάντια στα AGEs του ορού, τα οποία είναι ικανά να σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα με τα AGEs ενώ οι παραγόμενες από την μη ενζυμική γλυκοζυλίωση ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν τον

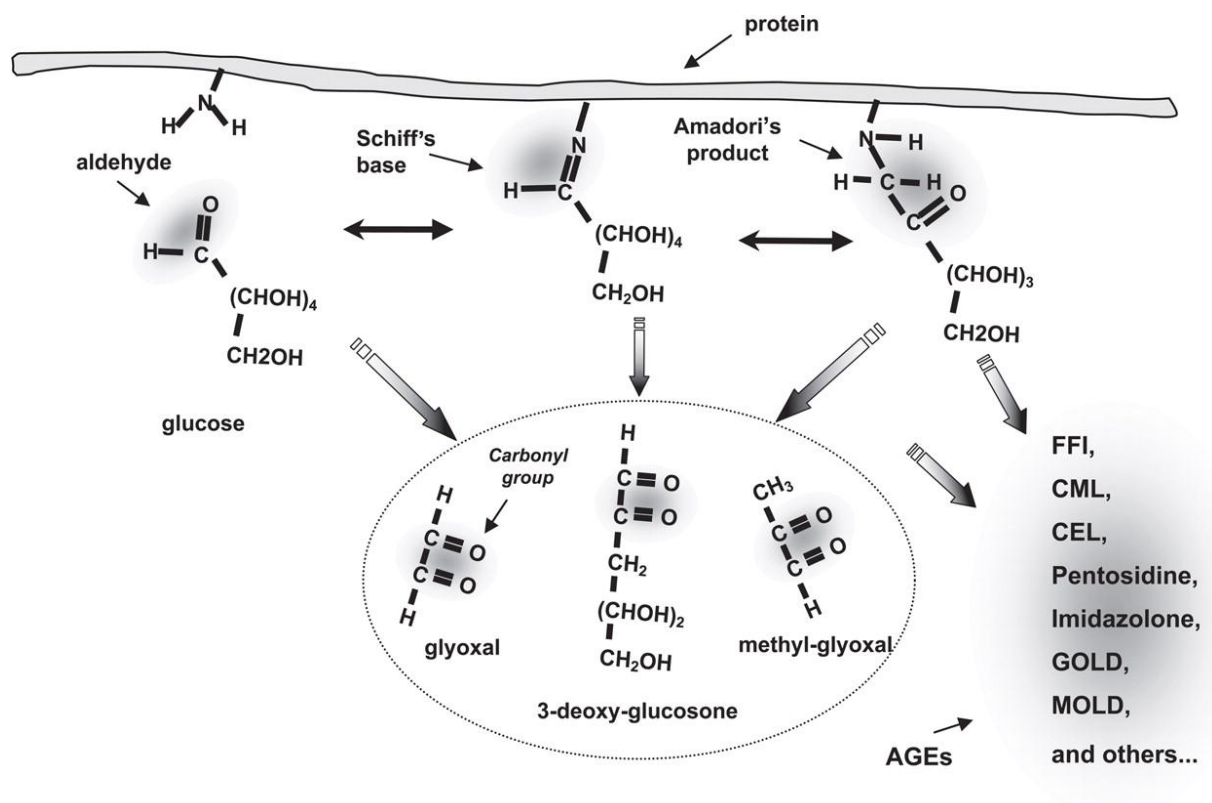
κατακερματισμό πρωτεϊνών αλλά και την οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων και των λιπιδίων [2].

Ήδη από το 1969 οι Rahbar και συνεργάτες είχαν συνδέσει το μονοπάτι αυτό με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1) στον άνθρωπο με την παρατήρηση ότι μια φυσικά απαντώμενη μικρή ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη, η HbA1c, είναι ένα μετα-μεταφραστικό παράγωγο της αντίδρασης της γλυκόζης με την αμινοτελική αμινομάδα της βαλίνης της β αλυσίδας της HbA1c [3]. Κλινικά, η μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, που είναι ένα προϊόν Amadori, έχει φέρει επανάσταση στην παρακολούθηση και τη μελέτη των διαβητικών ασθενών.



Εικόνα 1.1: Το κλασικό μονοπάτι της μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης που οδηγεί στο σχηματισμό των AGEs μέσω των προϊόντων Amadori. Η αρχική αντίδραση ανάμεσα στη γλυκόζη και την αμινομάδα μιας πρωτεΐνης σχηματίζει μια αναστρέψιμη Schiff βάση, η οποία μετατρέπεται σε ομάδα φρουκτοζαμίνης ή προϊόν Amadori. Με το χρόνο τα προϊόντα αυτά μπορεί να σχηματίσουν τα AGEs μέσω δραστικών δικαρβονυλικών ενδιάμεσων προϊόντων, όπως της συνδεόμενης με πρωτεΐνη 1,4-δεοξυγλουκοζόνης [4].

Όπως προαναφέρθηκε η μη ενζυμική γλυκοζύλιωση των πρωτεϊνών αποτελεί το κλασικό μονοπάτι σχηματισμού των AGEs και ξεκινάει με μια πυρηνόφιλη αντίδραση προσθήκης ανάμεσα σε μια ελεύθερη αμινομάδα και την καρβονυλική ομάδα ενός σακχάρου για να σχηματιστεί μια αναστρέψιμη Schiff βάση μέσα σε περίοδο ωρών. Η τελευταία μέσα από μια σειρά αναδιευθετήσεων μπορεί να μετατραπεί σε μια πιο σταθερή κετοαμίνη ή προϊόν Amadori μέσα σε περίοδο ημερών. Το προϊόν Amadori, από τη στιγμή που σχηματίζεται, είναι πρακτικά μη αναστρέψιμο. Η πρωτεϊνική μη ενζυμική γλυκοζύλιωση είναι μια αυθόρμητη αντίδραση που εξαρτάται *in vivo* από το βαθμό και τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας, το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης και τη διαπερατότητα του ιστού στην ελεύθερη γλυκόζη [2, 4]. Το προϊόν Amadori μπορεί να μετασχηματιστεί σε μια περίοδο εβδομάδων σε δραστικά δικαρβονυλικά ενδιάμεσα προϊόντα, όπως γλουκοσόνες (π.χ. 1,4-δεοξυγλουκοσόνη, πρόδρομο της γλουκοζεπάνης) για να σχηματιστούν τελικά τα AGEs, όπως η γλουκοζεπάνη. Αυτό είναι το κλασικό μονοπάτι σχηματισμού των AGEs (Εικόνα 1.1)[4].



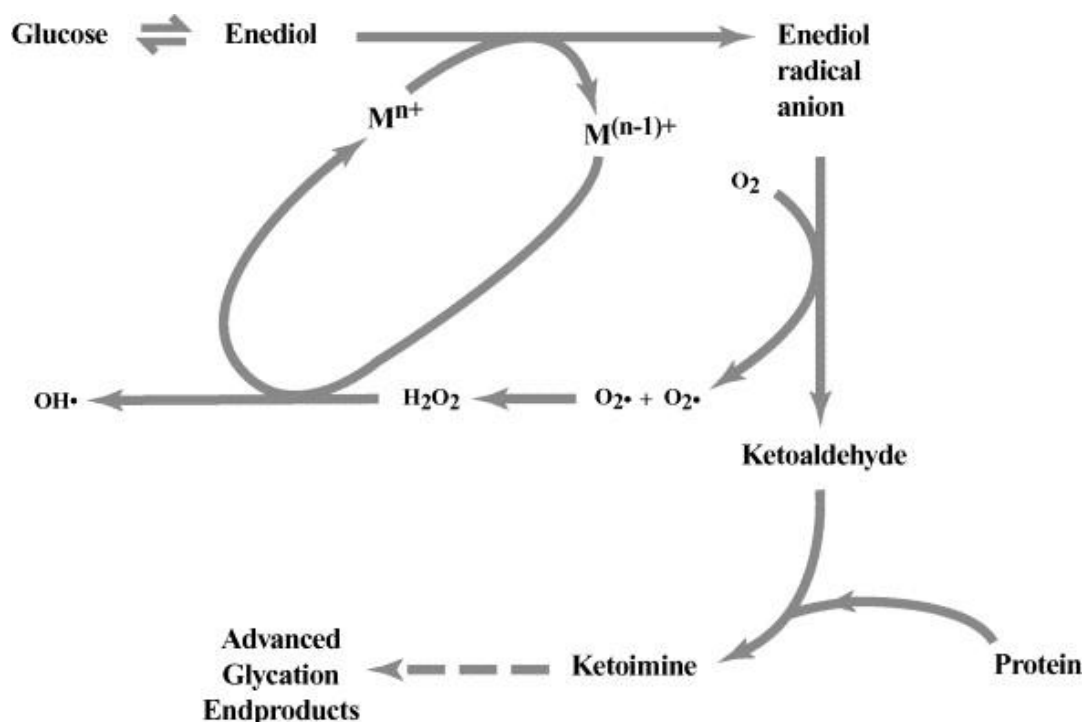
Εικόνα 1.2: Πιθανά μονοπάτια σχηματισμού AGEs [5].

Εναλλακτικοί μηχανισμοί σχηματισμού των AGEs περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχει το «καρβονυλικό στρες». Πρόκειται για αντιδράσεις με δραστικά δικαρβονυλικά ενδιάμεσα προϊόντα (Εικόνα 1.2), τα οποία ήδη αναφέρθηκαν, και μπορούν να σχηματιστούν από την αυτο-οξειδωση της γλυκόζης, των λιπιδίων, των Schiff βάσεων ή και των Amadori προϊόντων και στη συνέχεια, να αντιδράσουν πάλι με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας τις δραστικές καρβονυλικές ομάδες και να οδηγήσουν στον σχηματισμό των AGEs, όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω [5, 6]. Τα προϊόντα Amadori γενικά είναι περισσότερο σταθερά προϊόντα από τις βάσεις Schiff και πρακτικά μη αναστρέψιμα. Στη συνέχεια, μέσα από πολύπλοκες αντιδράσεις, όπως αφυδάτωση και συμπύκνωση, σχηματίζονται τα AGEs, που είναι τα τελικά μη αναστρέψιμα προϊόντα. Τα προϊόντα Amadori μπορούν επίσης να διασπαστούν, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια, με οξείδωση (γλυκοξειδωση) για να παραχθούν AGEs, όπως η καρβοξυμεθυλ-λυσίνη (carboxymethyl-lysine: CML) [4].

Η μεθυλογλυοξάλη έχει αναγνωριστεί ως κύριο ενδοκυττάριο δραστικό δικαρβονυλικό ενδιάμεσο, που προέρχεται από τη γλυκόλυση. Η αυθόρμητη αποφωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και της φωσφορικής διϋδροξυακετόνης στο στάδιο της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της μεθυλογλυοξάλης. Επιπρόσθετα, το ασκορβικό οξύ, η θρεονίνη και η αμινοακετόνη είναι πρόδρομες ουσίες της μεθυλογλυοξάλης. Η μεθυλογλυοξάλη αντιδρά με ελεύθερες ομάδες λυσίνης για τον σχηματισμό των AGEs, όπως της καρβοξυαιθυλυσίνης (carboxyethyl-lysine, CEL) ή του διμερούς της μεθυλογλυοξαλικής λυσίνης (methylglyoxal lysine dimmer, MOLD). Αντιδρά επίσης με την αργινίνη για τον σχηματισμό των υδροϊμιδαζολονών. Η μεθυλογλυοξάλη μπορεί να καταβολιστεί από τις ενδοκυττάρια γλυοξαλάσες [4, 7].

Η γλυκόζη μπορεί άμεσα να οξειδωθεί με την παρουσία καταλυτικών μετάλλων και οξυγόνου (αυτο-οξειδωση). Πιο συγκεκριμένα, μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη, βρίσκονται σε ισορροπία με την «ενεδιόλη» τους, η οποία μπορεί να υποστεί αυτο-οξειδωση με την παρουσία μετάλλων μετάβασης και να σχηματιστεί η ρίζα ενεδιόλης. Αυτή η ρίζα ανάγει το μοριακό οξυγόνο για να παραχθεί ρίζα υπεροξειδίου (O₂⁻) κι έτσι, οξειδώνεται σε δικαρβονυλική κετοαλδεΐδη, η οποία

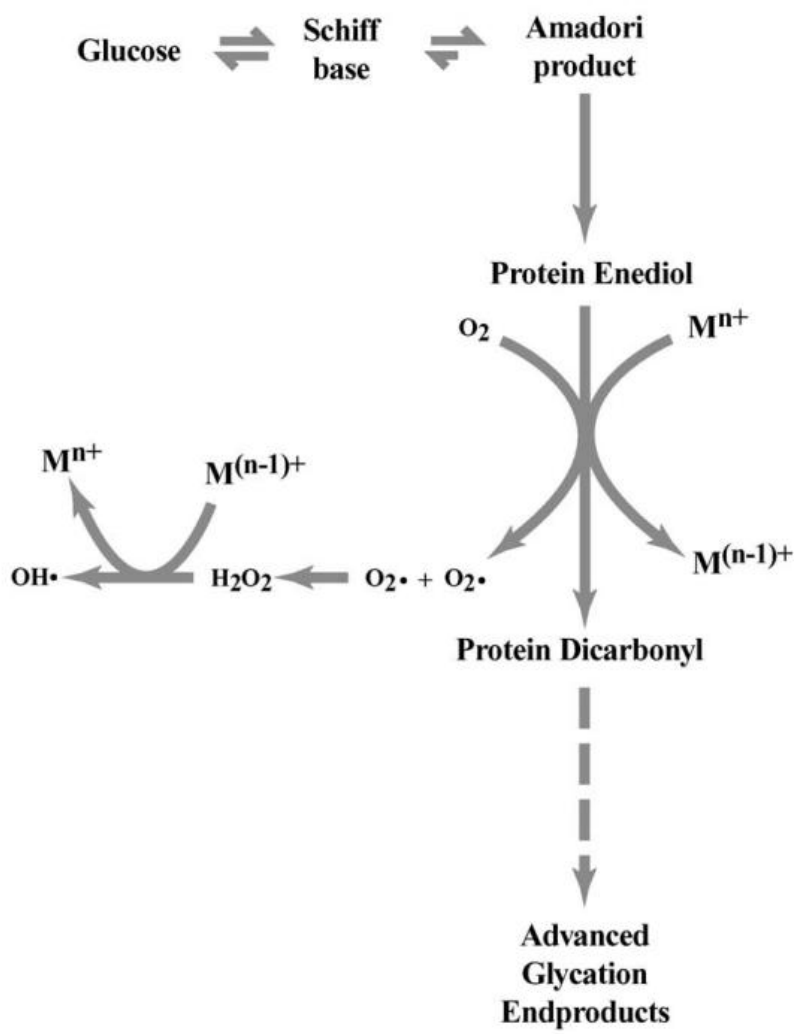
αντιδρά με αμινομάδες πρωτεϊνών σχηματίζοντας την κετοϊμίνη [2]. Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως «μη ενζυμική γλυκοζυλίωση αυτο-οξειδωσης» (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Μη ενζυμική γλυκοζυλίωση αυτο-οξειδωσης, όπου η γλυκόζη μετατρέπεται σε δικαρβονυλική κετοαλδεύδη μέσω της ρίζας ενεδιόλης. Αυτή η κετοαλδεύδη μπορεί να αντιδράσει με μια αμινο-ομάδα πρωτεΐνης για να σχηματιστεί μια κετοϊμίνη ικανή να σχηματίσει AGEs. Αυτά τα στάδια καταλύονται από μέταλλα μετάβασης (M) και η ρίζα υπεροξειδίου που παράγεται μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton.

Οι κετοϊμίνες είναι παρόμοιες, αν και πιο δραστικές από τα προϊόντα Amadori, και συμμετέχουν στο σχηματισμό AGEs. Η καταλυόμενη από μέταλλα αυτο-οξειδωση της γλυκόζης μπορεί να είναι σημαντική στους ασθενείς με ΣΔ1 και νεφρική ανεπάρκεια ή/ και αθηροσκλήρωση. Μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό γλυοξάλης, ενός σημαντικού δραστικού δικαρβονυλικού ενδιάμεσου προϊόντος και αραβινόζης. Η τελευταία πεντόζη μπορεί να αντιδράσει με πρωτεΐνες και να σχηματίσει AGEs, όπως την πεντοσιδίνη [4]. Οι αντιδράσεις οξειδωσης, επίσης, συμμετέχουν στο σχηματισμό των AGEs, ο οποίος επιταχύνεται με την παρουσία οξυγόνου και επιβραδύνεται σε αναερόβιες συνθήκες. Ο όρος «γλυκοξειδωση» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αυτο-οξειδωση των προϊόντων Amadori προς AGEs (Εικόνα 1.4). Παρουσία μμετάλλων μμετάβασης και μοριακού οξυγόνου, τα

προϊόντα Amadori μετατρέπονται σε δικαρβονυλικές πρωτεϊνικές ενώσεις μέσω μίας ενεδιόλης πρωτεΐνης που παράγει τη ρίζα υπεροξειδίου. Οι πρωτεϊνικές δικαρβονυλικές ενώσεις μπορεί να συμμετέχουν στον σχηματισμό AGEs και αναφέρονται ως προϊόντα γλυκοξείδωσης. Από τη στιγμή που σχηματίζονται, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορεί να μετατραπούν σε υψηλά δραστικές ρίζες υδροξυλίου (OH^\cdot) μέσω της αντίδρασης Fenton [2].



Εικόνα 1.4: Η γλυκοξείδωση όπου οι κετοαμίνες μετατρέπονται σε πρωτεϊνικές δικαρβονυλικές ενώσεις ικανές να σχηματίζουν AGEs. Αυτά τα στάδια καταλύονται από μέταλλα μετάβασης (M) και η ρίζα υπεροξειδίου που παράγεται μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton. Οι αμινοομάδες των βάσεων αδενίνης και γουανίνης στο DNA είναι επίσης ευαίσθητες στη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση και το σχηματισμό AGEs, πιθανότατα λόγω των δραστικών ενδοκυττάρων σακχάρων. Τα AGEs μπορούν, επίσης, να σχηματιστούν και από τα φωσφολιπίδια και να προκαλέσουν την

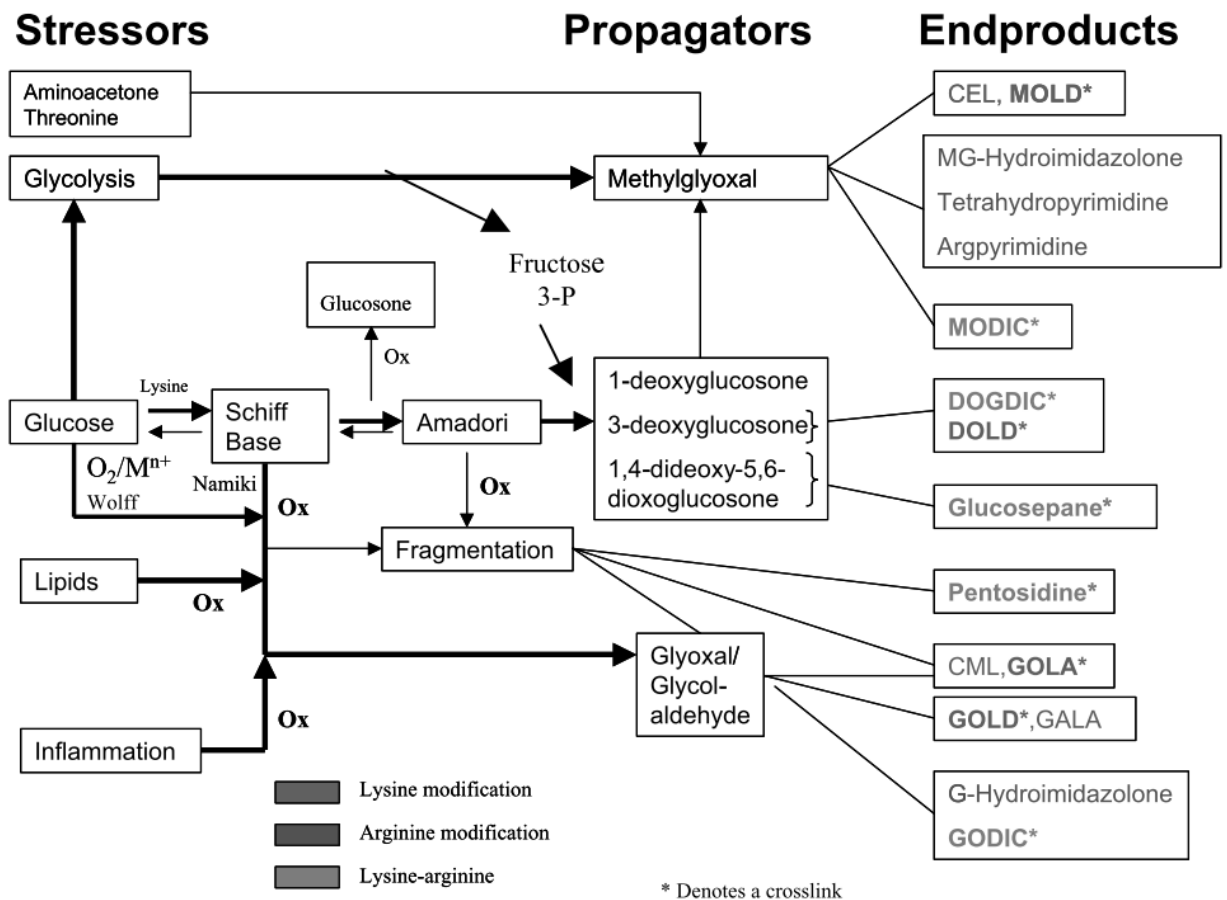
υπεροξειδωση των λιπιδίων μέσω μιας άμεσης αντίδρασης ανάμεσα στη γλυκόζη και τις αμινοομάδες των φωσφολιπιδίων, όπως τα κατάλοιπα φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοσερίνης [2].

Επιπρόσθετα, η υπεροξειδωση των λιπιδίων παράγει μερικά δραστικά δικαρβονυλικά ενδιάμεσα, τα οποία είναι παρόμοια με αυτά που σχηματίζονται κατά τις αντιδράσεις γλυκοξειδωσης, συμπεριλαμβανομένων της γλυοξάλης και της μεθυλογλυοξάλης, τα οποία είναι πρόδρομες ενώσεις των κυριότερων AGEs, όπως του CML, της CEL, των ιμιδαζολονών της αργινίνης και της αργιπιριμιδίνης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι η οξειδωτική αποδόμηση των λιπιδίων και ιδιαίτερα, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Είναι η διαδικασία κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου «κλέβουν» ηλεκτρόνια από τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, προκαλώντας κυτταρική βλάβη. Η αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων, πιθανότατα επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία και το οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα τον αυξημένο σχηματισμό των τελικών προϊόντων προχωρημένης λιποοξειδωσης (Advanced Lipoxidation End-products, ALEs), μπορεί να είναι ο μηχανισμός που συνδέει τη δυσλιπιδαιμία με τις διαβητικές επιπλοκές [8].

Έχει βρεθεί, επίσης, ένα *in vitro* μονοπάτι σχηματισμού των AGEs μη εξαρτώμενο από τη γλυκόζη ή τα λιπίδια αλλά από τα αμινοξέα. Σε ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα, τα οποία όταν εκτεθούν σε φλεγμονώδες ερέθισμα παράγουν μυελοϋπεροξειδάση οξειδάση του NADPH, προάγεται ο σχηματισμός των AGEs μέσω οξειδωσης διαφόρων αμινοξέων. Ενδέχεται δηλαδή σε περιοχές φλεγμονής, αν τα ένζυμα αυτά ρυθμίζουν το σχηματισμό των AGEs *in vivo*, όπως και *in vitro*, να προκαλείται η παραγωγή τους και μέσω αυτού του μηχανισμού [9, 10].

Η αντίδραση Maillard συνολικά αποτελείται από τρία κινητικά διαμερίσματα που αποτελούνται από α) τους στρεσογόνους παράγοντες ή ερεθίσματα (*stressors*), δηλαδή την πηγή των καρβονυλικών παραγόντων που οδηγούν την αντίδραση, β) τα μέσα διάδοσης (*propagators*), δηλαδή τους δραστικούς καρβονυλικούς παράγοντες που προέρχονται από τους *stressors* και τα τελικά προϊόντα (*end-products*), που ολοκληρώνουν τη διαδικασία της μοριακής γήρανσης και είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης Maillard [1] (Εικόνα 1.5).

Πέρα από τον ενδογενή σχηματισμό τους με τους προαναφερθέντες τρόπους τα AGEs έχουν και εξωγενή πηγή προέλευσης μέσω της διατροφής. Μπορούν να σχηματιστούν κατά το μαγείρεμα, μέσω της θερμικής επεξεργασίας όπως ήδη αναφέρθηκε αρχικά, αλλά περιέχονται και στον καπνό από το τσιγάρο [6]. Σχετικά πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι τα AGEs τουλάχιστον εν μέρει απορροφώνται στην κυκλοφορία ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερβολική πρόσληψη θερμικά επεξεργασμένων τροφών μπορεί να ενεργοποιήσει παθολογικά μονοπάτια ή να επιδεινώσει μια ήδη υπάρχουσα παθολογία [11].



Εικόνα 1.5: Επιλεκτικά χημικά μονοπάτια και AGEs σχετιζόμενα με την αντίδραση Maillard *in vivo* [1].

Δεδομένων των ποικίλων μηχανισμών σχηματισμού, εύκολα συμπεραίνεται ότι τα AGEs είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων [6]. Έχουν περιγραφεί τόσο φθορίζοντα όσο και μη-φθορίζοντα μόρια. Από αυτά, συγκεκριμένα AGEs μπορούν

να σχηματίσουν διασταυρούμενες συνδέσεις (cross-links) μέσα στους ιστούς (Εικόνα 1.6).

Τα AGEs μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες:

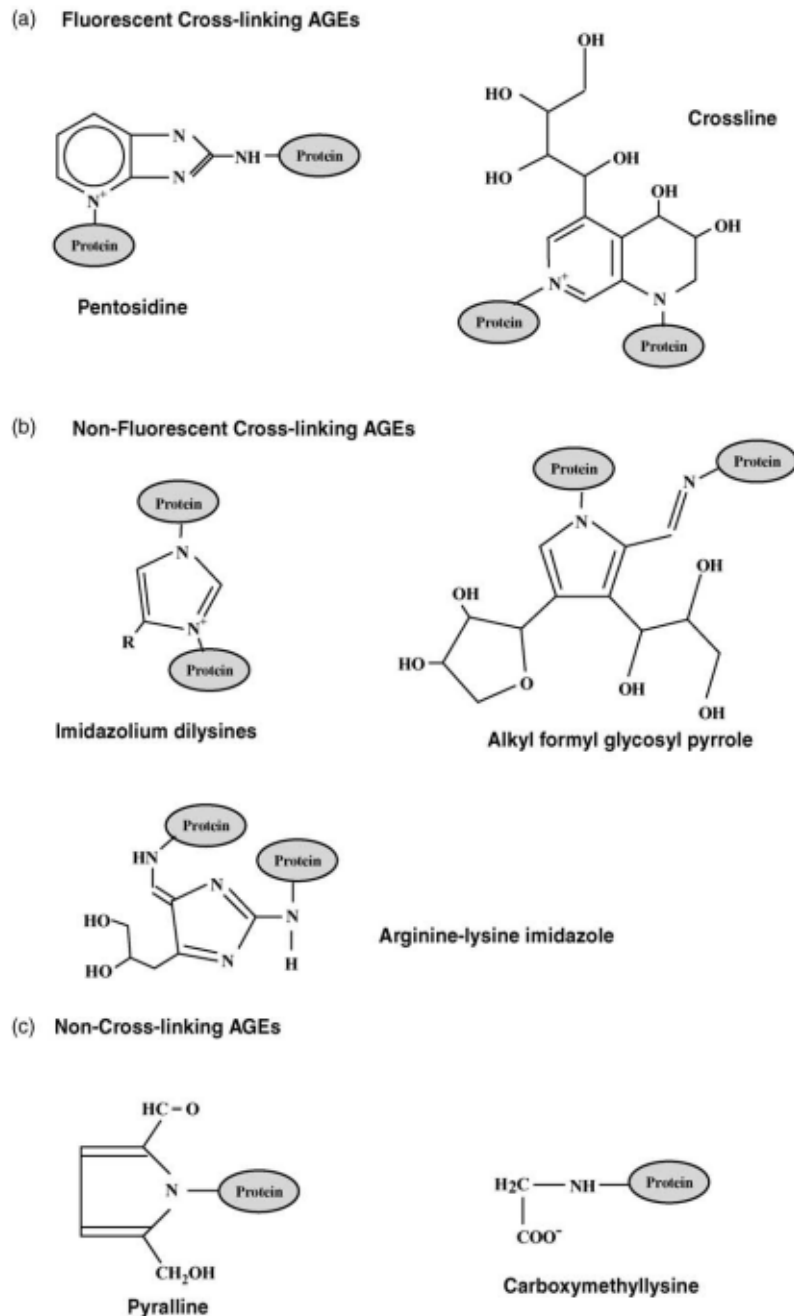
α) *φθορίζοντα AGEs που σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις*, όπως η πεντοσιδίνη και η κροσλίνη. Η πεντοσιδίνη σχηματίζει διασταυρούμενες συνδέσεις ανάμεσα στη λυσίνη και την αργινίνη και τα επίπεδα της φαίνεται να αυξάνουν στο ΣΔ1. Η κροσλίνη αρχικά αναγνωρίστηκε στα νεφρά διαβητικών αρουραίων και μπορεί να σχηματιστεί και *in vitro* και *in vivo*.

β) *μη φθορίζοντα AGEs που σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις*, όπως οι διλυσίνες ιμιδαζολίου, η αλκυλ-φορμυλ-γλυκοζυλ-πυρόλη (AFGP) και η ιμιδαζόλη αργινίνης-λυσίνης (ALI). Οι διλυσίνες ιμιδαζολίου είναι επίσης γνωστές ως διμερή γλυοξάλης-λυσίνης (GOLD) ή μεθυλογλυοξάλης-λυσίνης (MOLD) και σχηματίζονται από αντιδράσεις ανάμεσα σε παράγωγα γλυοξάλης και κατάλοιπα λυσίνης και ανιχνεύονται *in vivo*. Οι αλκυλ-φορμυλ-γλυκοζυλ-πυρόλες (AFGP) σχηματίζονται από την αντίδραση ανάμεσα σε δύο μόρια σακχάρων με ένα μόνο κατάλοιπο λυσίνης αλλά είναι περιορισμένης σημασίας *in vivo*. Η ιμιδαζόλη αργινίνης-λυσίνης (ALI) έχει απομονωθεί πρόσφατα.

γ) *AGEs που δε σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις*, όπως η πυρραλίνη και η Ν-καρβοξυμεθυλ-λυσίνη (CML). Η πυρραλίνη ανιχνεύεται στο ανθρώπινο δέρμα, το πλάσμα και τον εγκέφαλο. Το CML σχηματίζεται από την οξειδωτική αποδόμηση προϊόντων Amadori και κατά τη διάρκεια καταλύομενης από μέταλλα οξείδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσία πρωτεΐνης. Αποτελεί ένα από τα κυριότερα AGEs *in vivo* και τα επίπεδά του αυξάνουν δύο φορές στο κολλαγόνο του δέρματος διαβητικών ασθενών [2].

Το χαρακτηριστικό φάσμα φθορισμού των AGEs στα 440 nm μετά από εκπομπή στα 370 nm έχει χρησιμοποιηθεί κλασικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των AGEs στους ιστούς. Με βιοχημικές και ανοσοχημικές μεθόδους μπορούν να μετρηθούν φθορίζοντα AGEs, όπως η πεντοσιδίνη και μη-φθορίζοντα AGEs, όπως η καρβοξυλομεθυλ-λυσίνη (CML). Η πολυπλοκότητα, το κόστος και η έλλειψη επαναληψιμότητας συνέβαλαν στον περιορισμό της ευρύτερης χρήσης

αυτών των μεθόδων. Πρόσφατα, η διαδοχική φασματοσκοπία μάζας έχει διευκολύνει σημαντικά τη χρήση και έχει βελτιώσει την επαναληψιμότητα της μεθόδου για διάφορα AGEs [12].



Εικόνα 1.6: Χημικές δομές τριών τύπων AGEs (a) Φθορίζοντα AGEs που σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις, όπως η πεντοσιδίνη και η κροσλίνη, (b) μη φθορίζοντα AGEs που σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις, όπως διλυσίνες ιμιδαζολίου, αλκυλ-φορμυλ-γλυκοζυλ-πυρόλη και ιμιδαζόλη αργινίνης-λυσίνης και (c) AGEs που δε σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις, όπως το CML και η πυραλίνη [2].

Μετά το σχηματισμό των AGEs, η συσσώρευση των συνδεδεμένων με τις πρωτεΐνες AGEs εξαρτάται από το χρόνο ημίσειας ζωής των πρωτεϊνών αυτών. Σε πρωτεΐνες μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής, όπως το κολλαγόνο του δέρματος, τις κρυσταλλίνες του φακού και τις πρωτεΐνες των χόνδρων, μπορεί να συσσωρευθούν ακόμη και πάνω από τη διάρκεια ζωής των οργανισμών. Εξάλλου, οι περιοχές όπου αναπτύσσονται οι διαβητικές επιπλοκές είναι επίσης εκείνες όπου βρίσκονται μακροχρόνιες πρωτεΐνες (π.χ. σπειραματική βασική μεμβράνη, κρυσταλλίνη φακού). Φαίνεται λοιπόν απαραίτητο να προτιμώνται οι δοκιμασίες μέτρησης της συσσώρευσης των AGEs και όχι η μέτρηση αυτών σε δείγματα π.χ. αίματος [12].

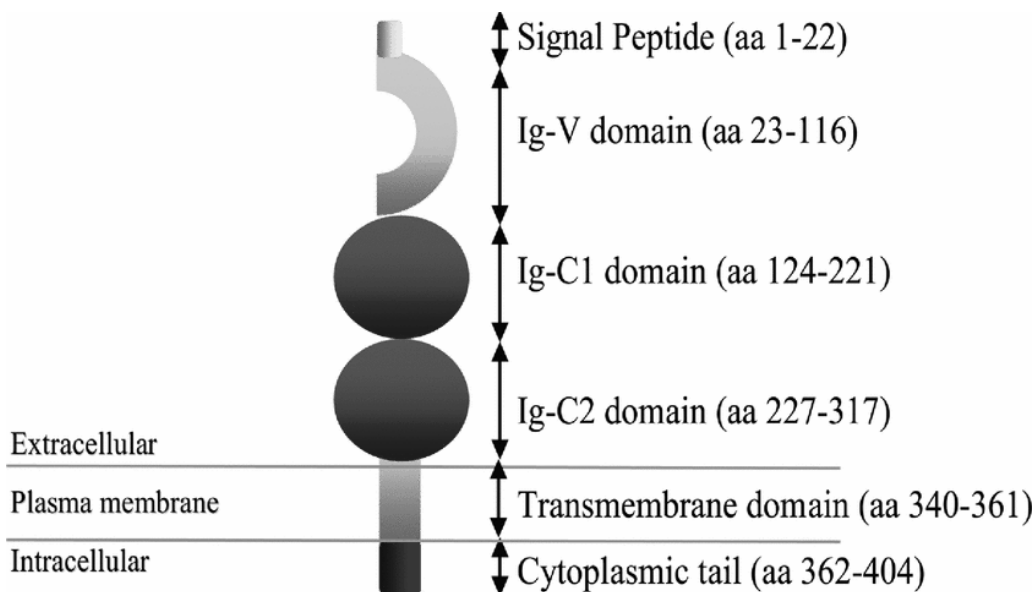
Τα κυκλοφορούντα AGEs μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και να προκαλέσουν ενδοκυττάρια βλάβες. Έχουν αναγνωριστεί ποικίλοι υποδοχείς για τα AGEs:

- υποδοχείς-κάθαρσης των μακροφάγων τύπου I και τύπου II (macrophage scavenger receptors type I and type II, MSR)
- γαλεκτίνη-3 (AGE-R3)
- AGER1 (AGE receptor-1)
- ολιγοσακχαρυλική τρανσφεράση-48 (OST-48/AGE-R2)
- RAGE (Receptor for AGEs)

Οι υποδοχείς των AGEs μπορεί να έχουν θετικό ή αρνητικό ρόλο στη δράση των AGEs. Όσον αφορά στο θετικό τους ρόλο, κάποιοι υποδοχείς φυσιολογικά βοηθούν στην κάθαρση των AGEs από την κυκλοφορία και μπορεί να μετριάζουν τις οξειδωτικές τους επιδράσεις. Για παράδειγμα, ευεργετικός υποδοχέας των AGEs θεωρείται ο AGE-R1 (Lu et al., 2004). Η υπερέκφρασή του έδειξε αυξημένη ενδοκυττάρωση και αποδόμηση των AGEs. Επίσης, αποκάλυψε μια ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από τα AGEs και τον RAGE φωσφορυλίωση των MAP-κινασών και την ενεργοποίηση του NF-κB. Αντίθετα, ο RAGE και πιθανόν άλλοι υποδοχείς φαίνεται να ενεργοποιούν μια απάντηση στο στρες που οδηγεί σε φλεγμονή και κυτταρική δυσλειτουργία [6].

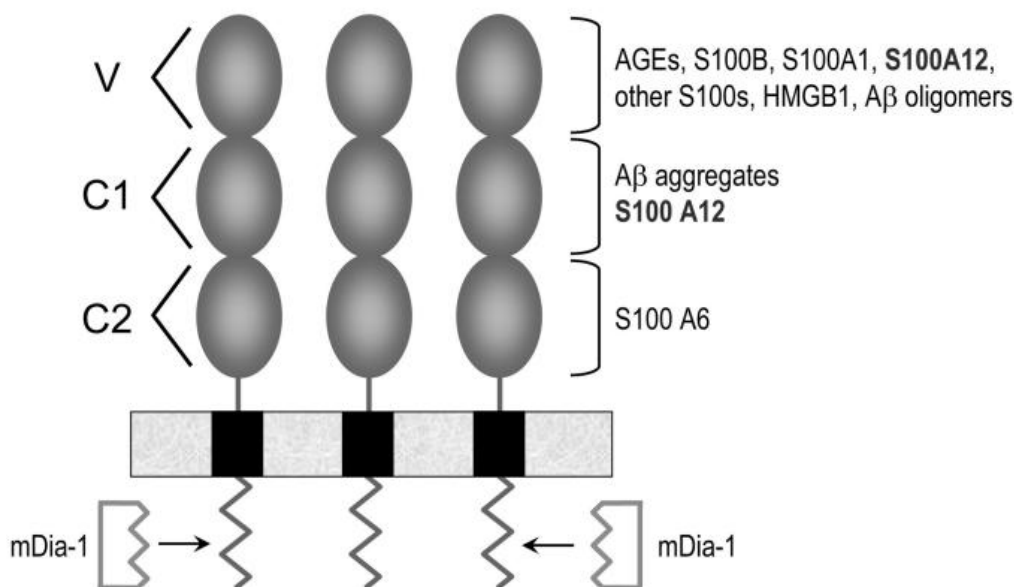
1.1.1 Υποδοχέας των AGEs - RAGE

Ο πιο μελετημένος υποδοχέας των AGEs είναι ο RAGE (Receptor for AGEs). Ο υποδοχέας εμφανίζεται σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπως επιθηλιακά, νευρικά, αγγειακά και φλεγμονώδη κύτταρα, συνήθως εκφραζόμενος σε χαμηλά επίπεδα σε ομοιόσταση και σε αυξημένα επίπεδα σε περιοχές στρες ή φλεγμονής. Εξάιρεση αποτελεί ο πνεύμονας, στον οποίο ο RAGE εμφανίζει σχετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με άλλους ιστούς [13]. Ο RAGE είναι μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Το γονίδιο που τον κωδικοποιεί στον άνθρωπο είναι γνωστό και ως *AGER* και εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC, major histocompatibility complex) και αποτελείται από μια 5' πλευρική περιοχή που ρυθμίζει τη μεταγραφή του, 11 εξόνια και μια μικρή 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Το mRNA των 1,4 kb που προκύπτει μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη 404 αμινοξέων με μοριακό βάρος περίπου 55 kDa. Ο υποδοχέας RAGE αποτελείται από έναν αριθμό ξεχωριστών περιοχών (domains): μια εξωκυττάρια περιοχή (αμινοξέα 1-342) που περιλαμβάνει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (αμινοξέα 1-22), ακολουθούμενο από τρεις περιοχές τύπου ανοσοσφαιρινών, συμπεριλαμβανομένων μιας περιοχής τύπου V, η οποία περιέχει τουλάχιστον εν μέρει την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (αμινοξέα 23-116) και δύο περιοχές τύπου C (αμινοξέα 124-221 και 227-317) [14](Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση του RAGE [14](Kalea, Schmidt, & Hudson, 2009)

Ακολουθείται από μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή (αμινοξέα 343-363) και τελικά από μια υψηλά φορτισμένη μικρή κυτταροπλασματική περιοχή (αμινοξέα 364-404), που είναι απαραίτητη για τις διαμεσολαβούμενες από τον RAGE κυτταρικές επιδράσεις μετά τη σύνδεσή του με τους συνδέτες. Όπως και άλλα μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινικών υποδοχέων, διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος. Τα προϊόντα αυτά, έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων που επηρεάζουν την περιοχή πρόσδεσης ή την αφαίρεση της διαμεμβρανικής περιοχής και μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή εκκρινόμενων μη συνδεδεμένων με τη μεμβράνη μορφών του υποδοχέα [15-18].



Εικόνα 1.8: Οι περιοχές του RAGE και οι προσδέτες του. Ο RAGE είναι μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Η εξωκυτταρική του περιοχή αποτελείται μια τύπου-V και δύο τύπου-C ανοσοσφαιρινικές περιοχές. Παρόλο που οι περισσότερη συνδέτες δεσμεύονται στην περιοχή τύπου-V, οι περιοχές C1 και C2 επίσης δεσμεύουν κάποιους από τους συνδέτες. Ακολουθεί μια μονή διαμεμβρανική περιοχή που ακολουθείται από μια φορτισμένη κυτταροπλασματική ουρά. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η σύνδεση στην κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης mDia-1 (mammalian diaphanous-1) είναι σημαντική για την μεταγωγή σήματος από τον RAGE μέσω δέσμευσης σύνδετη σε αυτόν [13].

Η εξωκυττάρια περιοχή του RAGE αποτελείται, όπως αναφέρθηκε, από μια μεταβλητή V τύπου περιοχή που ακολουθείται από δύο ξεχωριστές σταθερές

περιοχές C τύπου. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές V και C1 του RAGE δεν είναι ανεξάρτητες η μία από την άλλη, αλλά αυτές σχηματίζουν μια ολοκληρωμένη δομική μονάδα που απαιτείται για τουλάχιστον κάποιες από τις ιδιότητες σύνδεσης των συνδετών. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η περιοχή C2 του RAGE προσκολλάται στη μονάδα VC1 μέσω ενός ευλύγιστου διασυνδέτη, αλλά λειτουργεί ως μια ανεξάρτητη μονάδα. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι ποικίλοι συνδέτες του RAGE μπορεί να προτιμούν να αλληλεπιδρούν με μία ή περισσότερες από αυτές τις περιοχές [13] (Πίνακας 1.1 και Εικόνα 1.8).

Ο RAGE είναι ένας υποδοχέας που συνδέεται με μια ποικιλία μορίων. Εκτός από τα AGEs, συνδέεται με πεπτίδια β-αμυλοειδούς, που συσσωρεύονται στη νόσο Alzheimer και το αμυλοειδές-α, το οποίο συναθροίζεται στη συστηματική αμυλοειδωση. Επιπρόσθετα, συνδέτες του RAGE είναι οι S100/καλγκρανουλίνες, μια οικογένεια στενά σχετιζόμενων και συνδεόμενων με Ca^{2+} πολυπεπτιδίων, που συσσωρεύονται εξωκυττάρια σε περιοχές χρόνιας φλεγμονής. Ένας άλλος φλεγμονώδης συνδέτης του RAGE είναι η DNA-συνδεόμενη πρωτεΐνη HMGB1 (high mobility group box-1) ή αμφοτερίνη, η οποία απελευθερώνεται από κύτταρα που υφίστανται νέκρωση. Εκτός από τους συνδέτες αυτούς που συμμετέχουν ενεργά στη φλεγμονή και σε ανοσολογικές αντιδράσεις, ο RAGE επίσης αλληλεπιδρά με επιφανειακά μόρια στα βακτήρια και τα λευκοκύτταρα [19].

Ligand	Ligand Family	Extracellular Domain(s) of RAGE/Interaction
CML-AGE (carboxy-methyl lysine)	AGEs	• V-type domain
pronyl glycine	AGEs	• not studied
AGE peptides	AGEs	• V-type domain
AOPPs Advanced Oxidation Protein products	AOPPs	• not studied
HMGB1	HMGB1	• V-type domain
S100A12	S100/calgranulins	• V- & C1- type domains
S100B	S100/calgranulins	• V-type domain
S100A6	S100/calgranulins	• C2-type domain
Amyloid-β Oligomers	Amyloid-β & β-Sheet fibrils	• V-type domain
Amyloid-β Aggregates	Amyloid-β & β Sheet Fibrils	• C1-type domain

Πίνακας 1.1: Οι οικογένειες των προσδετών του RAGE [13].

Από αυτούς τους ξεχωριστούς συνδέτες του RAGE, ο πρώτος που αναγνωρίστηκε ήταν τα AGEs. Βάσει των διαθέσιμων ενδείξεων, είναι πιθανό ότι τα AGEs και ειδικά πεπτίδια AGEs συνδέονται με τον RAGE μέσω της περιοχής V τύπου. Επιπρόσθετα με τα AGEs, τα προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPPs: advanced oxidation protein products) επίσης συνδέονται με τον RAGE και πυροδοτούν τη μεταγωγή σήματος. Οι συγκεκριμένες περιοχές στις οποίες συνδέονται στο εξωκυττάριο τμήμα του RAGE πρέπει ακόμη να διευκρινιστούν [13].

Η αμφοτερίνη (HMGB1) συνδέεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, με τον RAGE και συμμετέχει σε μια ποικιλία μηχανισμών κυτταρικού stress, όπως πρόκληση κυτταρικής μετανάστευσης, νευρικής εξέλιξης και διαφοροποίησης και αύξηση της φλεγμονώδους απάντησης, τουλάχιστον κατά ένα μέρος μέσω RAGE. Διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η αμφοτερίνη/HMGB1 συνδέεται με την περιοχή V τύπου του RAGE [13]. Η οικογένεια των πολυπεπτιδίων S100/καλγκρανουλίνης είναι μια ξεχωριστή οικογένεια μορίων που περιλαμβάνει τουλάχιστον 21 μέλη. Οι S100/καλγκρανουλίνες είναι πρωτεΐνες συνδεόμενες με το ασβέστιο που γενικά λειτουργούν ως διμερή και έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, και μέσα κι έξω από το κύτταρο. Μέλη αυτής της οικογένειας που συνδέονται με τον RAGE πρώτα αναγνωρίστηκαν οι S100A12 και S100B, αλλά αργότερα άλλες συμπεριλαμβανομένων των S100A1, S100A2, S100A5, S100A6, S100A4, S100A7, S100A8A9, S100A11, S100A13 και S100P έχουν αναφερθεί ότι συνδέονται με τον RAGE. Από αυτές τις S100/καλγκρανουλίνες που είναι γνωστό ότι συνδέονται με τον RAGE, οι S100B, S100A1, S100A2, S100A5, S100A6, S100A12 αλληλεπιδρούν με την περιοχή V τύπου, η S100A12 επίσης αλληλεπιδρά με την περιοχή C1 και η S100A6 αλληλεπιδρά με την περιοχή C2 τύπου Ig. Το πεπτίδιο β-αμυλοειδούς και οι ίνες β-πτυχωτής επιφάνειας είναι προσδέτες του RAGE κι ενέχονται στη νόσο Alzheimer και την αμυλοείδωση. Ενώ οι συναθροίσεις Αβ συνδέονται με την περιοχή τύπου C1-Ig του RAGE, τα ολιγομερή Αβ (που πιστεύεται ότι είναι τα πιο παθογόνα είδη) συνδέονται με την περιοχή τύπου V (Πίνακας 1.1) [13, 19].

Η κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE συνδέεται με την εξωκυττάρια περιοχή μέσω μιας μονής ενδομεμβρανικής περιοχής. Η ενδοκυττάρια περιοχή είναι μικρή (<50 αμινοξέα) και υψηλά φορτισμένη. Μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων και

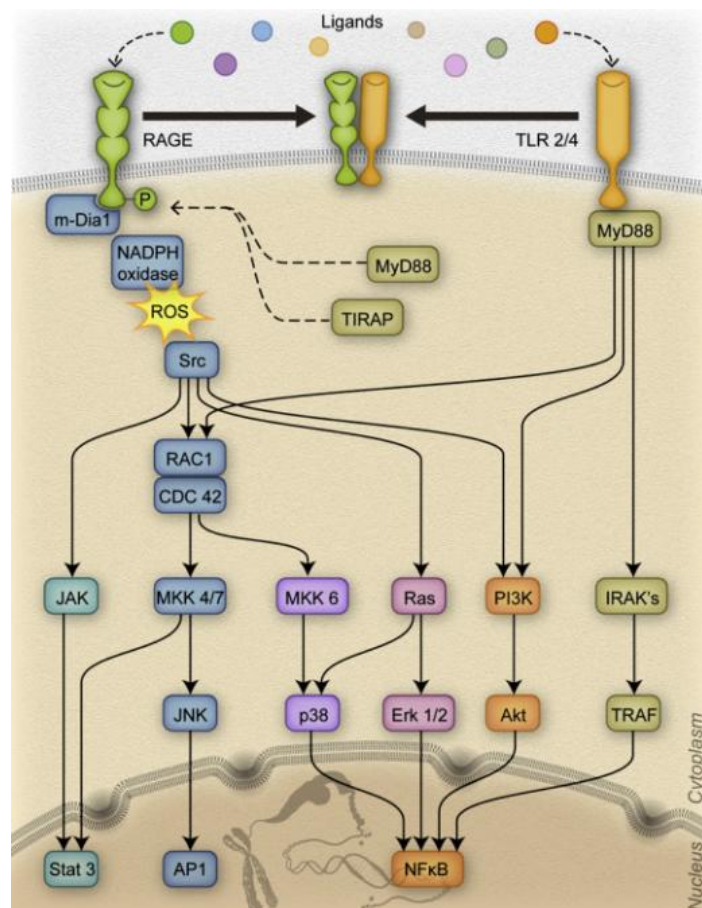
μελέτες *in vivo* σε διαγονιδιακά ποντίκια αποκάλυψαν ότι η κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος μετά από την πρόσδεση των συνδετών [13]. Καθώς η κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE δεν έχει ενδογενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, ένας μηχανισμός με τον οποίο επάγει τη δράση της στη μετάδοση σήματος και τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων είναι μέσω διασύνδεσης με τα ενδοκυττάρια μόρια για να γεφυρώσει τα γεγονότα φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης που απαιτούνται για να ξεκινήσει η σηματοδότηση.

Ο Ishihara και οι συνάδελφοί του πρότειναν ότι η κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE (ειδικά το συστατικό του πιο κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή) αλληλεπιδρά άμεσα με την MAP-κινάση ERK (extracellular signal-regulated kinase: εξοκυττάρια κινάση ρυθμιζόμενη από σηματοδότηση). Όμως, δε βρέθηκαν λειτουργικές επιπτώσεις αυτής της αλληλεπίδρασης, έτσι είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση δεν είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση του RAGE μετά τη σύνδεση με τους προσδέτες [13, 20]

Η πολυπλευρικότητα της σηματοδότησης του RAGE και η διαπίστωση ότι η κυτταροπλασματική περιοχή δεν παρουσιάζει ενδογενή δράση τυροσινικής κινάσης υποδηλώνει ότι RAGE αλληλεπιδρά με κυτταροπλασματικούς προσαρμοστές ώστε να διεγείρει την στρατολόγηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Πάνω σε αυτή την υπόθεση οι Hudson και συνεργάτες αναζήτησαν την πρωτεΐνη προσαρμογέα στην κυτταροπλασματική ουρά του RAGE χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Yeast Two-Hybrid. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε ότι η κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE συνδέεται *in vitro* και *in vivo* με την πρωτεΐνη mDia-1 (mammalian diaphanous-1) και ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι άμεση αλλά και απαραίτητη για την ενδοκυττάρια σηματοδότηση του RAGE που μεσολαβείται μετά την πρόσδεση των συνδετών του (Εικόνες 1.8 και 1.9). Η mDia-1 είναι ένα μέλος μια οικογένειας πρωτεϊνών (formin protein family) οι οποίες λειτουργούν για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ρυθμίζοντας την κυτταρική κινητικότητα, τη μετανάστευση και τη μεταγωγή σήματος, χαρακτηριστικά παρόμοια με τη βιολογία του RAGE [13, 21].

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι ο RAGE ανήκει σε μια τάξη υποδοχέων οι οποίοι περιέχουν μια διαμεμβρανική έλικα και η ενδοκυττάρια σηματοδότησή τους

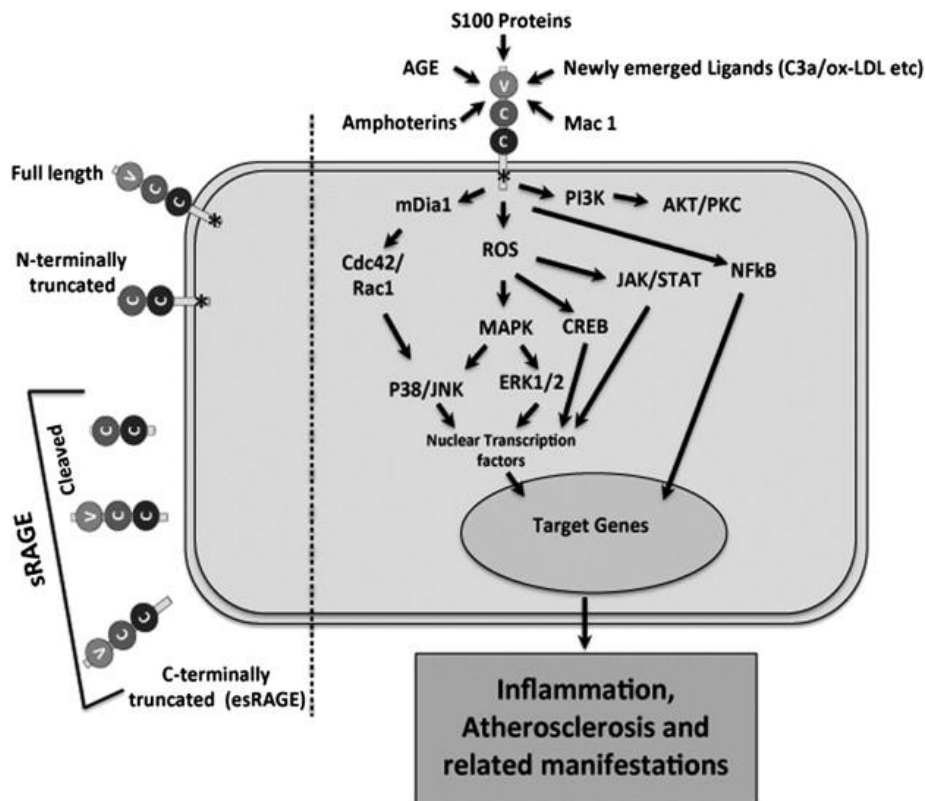
μεσολαβείται από κινάσες. Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν οι υποδοχείς της ερυθροποιητίνης (EPOR, erythropoietin receptor) και της αυξητικής ορμόνης (GHR, growth hormone receptor). Οι περισσότεροι αντίστοιχοι υποδοχείς, προκειμένου να είναι λειτουργικοί και να ενεργοποιούν τα ενδοκυττάρια μεταγωγικά μονοπάτια, πολυμερίζονται. Η άποψη περί διμερισμού και του RAGE ενισχύεται από το γεγονός ότι ο υποδοχέας προκειμένου να συνδεθεί και να ενεργοποιηθεί από τον συνδέτη S-100 διμερίζεται [21, 22]. Μελετώντας το μηχανισμό αλληλεπίδρασης του RAGE με τα AGEs παρατηρήθηκε η ύπαρξη ολιγομερών του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη και θεωρείται πως αυτά είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των AGEs από τον υποδοχέα [24]. Αντίστοιχα αποτελέσματα υπάρχουν σχετικά με την αλληλεπίδραση και του α-αμυλοειδούς με τον υποδοχέα RAGE. Συνεπώς, είναι πιθανόν ο RAGE να δρα και να επάγει τις ενδοκυττάριας λειτουργίες του μετά από διμερισμό του [25].



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση της πιθανής «συνεργασίας των RAGE και TLR μέσω σχηματισμού ομο- και ετερο-ολιγομερών ώστε να ενισχυθεί η φλεγμονώδης απόκριση [26].

Η αλληλεπίδραση του RAGE με διαφορετικούς συνδέτες ξεκινά μια σειρά γεγονότων κυτταρικής σηματοδότησης, όπως η παραγωγή ROS και η ενεργοποίηση αρκετών κινασών, οδηγώντας σε διαφορετικές φλεγμονώδεις συνέπειες όπως η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, AP-1 και Stat-3. Τα ενδιάμεσα γεγονότα σε αυτά τα μονοπάτια είναι υπό συνεχή διερεύνηση. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο RAGE στρατολογεί ορισμένες πρωτεΐνες προσαρμογείς για τη βέλτιστη σηματοδότηση (Εικόνα 1.8).

Υπό αυτό το πρίσμα η φωσφορυλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του από τον ισότυπο ζ της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKCζ) απαιτείται προκειμένου να στρατολογηθούν η MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) και η TIRAP (toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein), πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους υποδοχείς TLRs (Toll-like receptors) και την μη ειδική ανοσία. Βάσει κοινών λειτουργιών, οι TLRs και ο RAGE θα μπορούσαν να συνεργάζονται ενισχύοντας την φλεγμονώδη απόκριση μέσω στρατολόγησης και/ή συναρμολόγησης ομο- και ετερο- ολιγομερών (Εικόνα 1.8)[26].



Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών ισομορφών του RAGE και των βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών μετά από την αλληλεπίδραση RAGE-συνδέτη [27].

Συνεπώς, η πρόσδεση των συνδετών στον RAGE (AGEs, αμφοτερίνη, S100/καλγκρανουλίνες, κ.λ.π.) οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής ROS, την ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως των MAP-κινασών (Mitogen-activated protein kinases), της PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinase), του JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription) και του NF-κB, οδηγώντας στην προώθηση της φλεγμονής και της αρτηριοσκλήρυνσης (Εικόνα 1.9)[27].

Η κλωνοποίηση του RAGE κατέδειξε ότι τα AGEs ενεργοποιούν αρκετά καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με το αυξημένο οξειδωτικό στρες και/ή την οξεία ή χρόνια φλεγμονή [28]. Τα μονοπάτια αυτά συχνά συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor-κB) και σχετίζονται με την εντοπισμένη ιστική βλάβη [19]

1.1.2 Σηματοδότηση των AGEs

Επιπλέον φλεγμονώδεις μεσολαβητές οι οποίοι επάγονται μέσω της μεσολαβούμενης από τα AGEs ενεργοποίησης του RAGE και των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α, tumour necrosis factor-α), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6, interleukine-6) και η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP, C-reactive protein). Δεν προκαλεί ως εκ τούτου εντύπωση ότι ο RAGE έχει εμπλακεί στην γήρανση αλλά και σε ένα μεγάλο αριθμό παθολογιών που συμπεριλαμβάνουν την αθηρωμάτωση, την αρθρίτιδα, μεταβολικά σύνδρομα, νευροεκφυλιστικές νόσους και τον καρκίνο [29]

Καθώς ο υποκινητής του γονιδίου που κωδικοποιεί τον RAGE (*AGER*) φέρει θέσεις πρόσδεσης για τον NF-κB φαίνεται πως υπάρχει μια θετική θηλιά ανάδρασης («positive feedback loop») η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του RAGE και ως εκ τούτου την παρατεταμένη ενεργοποίηση του NF-κB [30]. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει γιατί η έκφραση του RAGE είναι χαμηλή στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς και αυξάνει κάτω από παθολογικές και συνθήκες στρες [31]. Η μεταγωγή σήματος από τον RAGE φαίνεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ότι σχετίζεται με το μεσολαβούμενο από συνδέτη

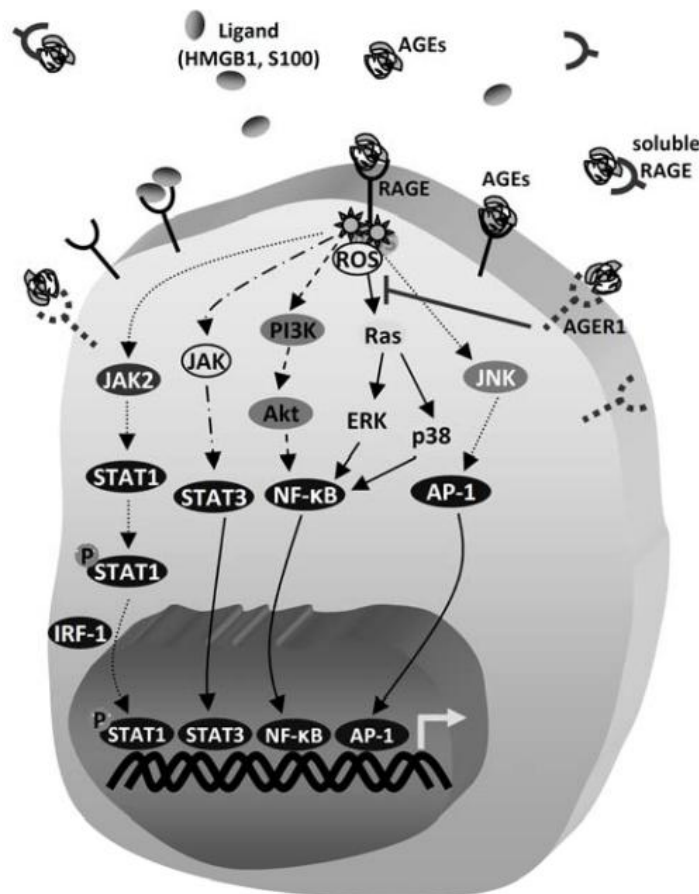
σηματισμό ολιγομερών του RAGE υποδηλώνοντας ότι διαφορετικές πρωτεΐνες προσαρμοστές (π.χ. TIRAP) μπορούν να στρατολογηθούν [32].

Σε πιο πρόσφατες μελέτες δείχθηκε ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια της MAP-κινάσης ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase-1/2) και της κινάσης Akt εμπλέκονται στην επαγόμενη από τα AGEs αυτοφαγία σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα επίμυων [33] και ότι η ορμόνη γκρελίνη (Ghrelin) ανέστειλε την επαγόμενη από τα AGEs απόπτωση σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα εμπλέκοντας τα μονοπάτια των ERK1/2 και PI3K/Akt [34]. Επιπλέον, τα AGEs αυξάνουν την κυτταρική μετανάστευση και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε ινοβλάστες του έξω χιτώνα μέσω των μονοπατιών του RAGE, MAPK και του NF-κB [35] και προάγουν την απόπτωση στους ινοβλάστες μέσω ενεργοποίησης του ROS, των MAP-κινασών και του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1 (forkhead box O1) [36]. Επιπρόσθετα, η δέσμευση των AGEs στον RAGE έχει βρεθεί ότι διεγείρει την υπερέκφραση του αγγειακού ενδοθηλικού αυξητικού παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) σε περικύτταρα του αμφιβληστροειδή [37] και τη σηματοδότηση του μεσαγγειακού αυξητικού παράγοντα TGF-β (Transforming Growth Factor-beta)-Smad μέσω μιας αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II τύπου I [38]. Τελικά, μελέτες σε τέσσερις γενεές ποντικών στα οποία είχε χορηγηθεί ισοθερμική διαίτα με ή χωρίς AGEs έδειξαν ότι η χορήγηση των AGEs προώθησε έναν προ-φλεγμονώδη φαινότυπο που σχετίστηκε με αυξημένη παχυσαρκία και πρόωμη αντίσταση στην ινσουλίνη [39]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ότι η εξωγενής προσθήκη σε παρασκευάσματα γλυκοζυλιωμένης βοείου αλβουμίνης (AGE-BSA) καθώς και γλυκοζυλιωμένης λυσοζύμης (AGE-lysozyme) σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες εκτός από παρόμοιες επιδράσεις στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης εισήγαγε επίσης και υπογραφές γονιδιακής έκφρασης ειδικές για το κάθε παρασκεύασμα υποδηλώνοντας την ύπαρξη διαφορετικών μεσολαβούμενων από υποδοχέα μονοπατιών τα οποία ενεργοποιούνται για το κάθε παρασκεύασμα [40].

Λίγα είναι γνωστά για τα άμεσα σηματοδοτικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά τη δέσμευση των AGEs στον RAGE, αλλά φαίνεται πως αυτό που ακολουθεί την πρόσδεση του συνδέτη είναι η επαγωγή του ROS η οποία αυξάνει τη φλεγμονή μέσω πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών [37, 41] (Εικόνα 1.20). Έχει βρεθεί ότι τόσο η μιτοχondριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων όσο και το μονοπάτι της

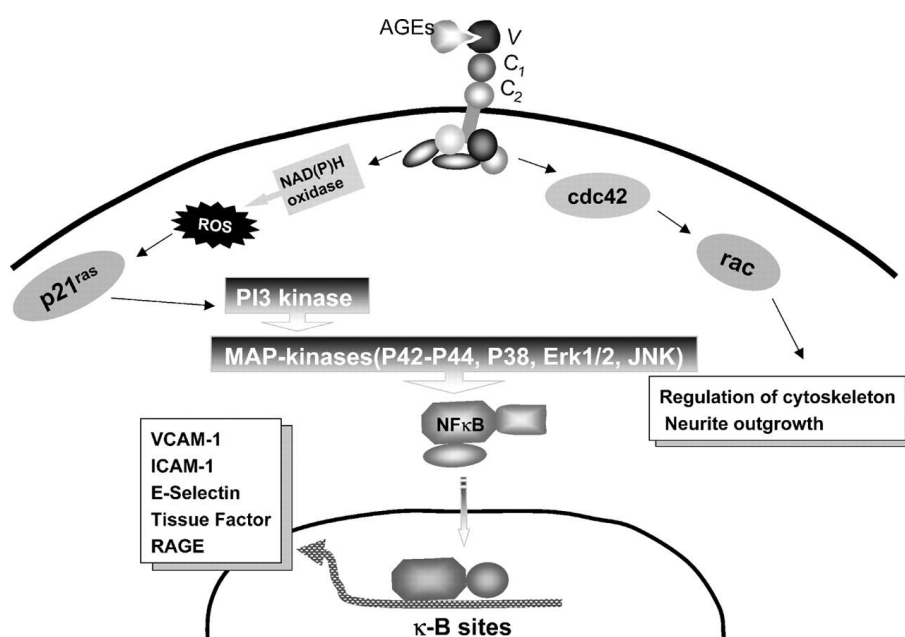
οξειδάσης του φωσφορικού νικοτιναμυδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιου (NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) συμμετέχουν στην σχετιζόμενη με το οξειδωτικό στρες ενεργοποίηση του RAGE [43, 44].

Εκτός από τον RAGE, τα AGEs μπορούν να δεσμευτούν επίσης και σε άλλους υποδοχείς όπως ο AGER1. Ο AGER1 εξουδετερώνει τη σηματοδότηση από την ενεργοποίηση του RAGE προκαλώντας την ελάττωση του οξειδωτικού στρες [45] (Εικόνα 1.20). Βρέθηκε ότι η χορήγηση AGEs ή CML στην κυτταρική σειρά HEK293 αύξησε τη φωσφορυλίωση της Akt περίπου τρεις φορές με έναν εξαρτώμενο από το οξειδωτικό στρες τρόπο. Η χρήση μεταλλαγμάτων $p66^{shc}$ έδειξε ότι οι επαγόμενες από τα AGEs επιδράσεις απαιτούν τη φωσφορυλίωση της σερίνης-36 (Ser-36) των $p66^{shc}$. Οι προ-οξειδωτικές αυτές αποκρίσεις κατεστάλησαν σε κύτταρα που υπερέκφραζαν τον AGER1 και επανεμφάνιστηκαν όταν η έκφραση του AGER1 ελαττώθηκε από μικρά παρεμβατικά μόρια RNA [46].



Εικόνα 1.20: Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται μετά από τη δέσμευση των AGEs στο RAGE [42].

Άλλοι υποδοχείς δέσμευσης των AGEs εκτός από τους υποδοχείς κάθαρσης των μακροφάγων τύπου I και τύπου II περιλαμβάνουν τον υποδοχέα τύπου λεκτίνης LOX-1 (lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1), τη σχετιζόμενη με λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας πρωτεΐνη-2 (LRP2, low density lipoprotein-related protein 2), TLRs και μερικούς άλλους υποδοχείς κάθαρσης [47]. Οι υποδοχείς κάθαρσης των μακροφάγων τύπου I μπορούν να κάνουν ενδοκυττάρωση διαλυτών AGE-τροποποιημένων πρωτεϊνών και τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και εμπλέκονται στην προσκόλληση των μακροφάγων στη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αναγνωρίζοντας AGE-τροποποιημένο κολλαγόνο ενώ ο LOX-1 βρέθηκε να αλληλεπιδρά με οξειδωμένες LDL και AGE-τροποποιημένες πρωτεΐνες [48]. Από την άλλη μεριά η LRP2 εμπλέκεται στην επαναπορρόφηση των φυσικά διηθημένων πρωτεϊνών αλλά επίσης και στην ενδοκυττάρωση AGE-τροποποιημένων πρωτεϊνών [49], ενώ οι TLRs συμμετέχουν στην φυσική ανοσία και η ενεργοποίησή τους επιτυγχάνεται από διαφορετικά μόρια που μοιράζονται παρόμοια τρισδιάστατα μοτίβα [50].



Εικόνα 1.21: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση AGE-RAGE.

Όπως γίνεται αντιληπτό, η πυροδότηση των φλεγμονωδών μηχανισμών (παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών και έκφραση προσκολλητικών μορίων)

που διαμεσολαβούνται από την αλληλεπίδραση AGE-RAGE περιλαμβάνει ποικίλα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, (p21ras, MAP-κινασών, PI3K, cdc42/rac, JAK/STAT, της NAD(P)H οξειδάσης) τα οποία τελικά συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ [51](Εικόνα 1.21).

Ο NF-κΒ τροποποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορους παράγοντες, που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την αθηροσκλήρωση, όπως την ενδοθηλίνη-1, τον VEGF, τον TGF β, τον ιστικό παράγοντα (tissue factor), διάφορες φλεγμονώδεις κυτοκίνες, κυρίως IL-1α, IL-6 και TNF-α. Υπάρχει επίσης αυξημένη έκφραση προσκολλητικών μορίων, όπως αγγειακού κυτταρικού προσκολλητικού μορίου (Vascular Cell Adhesion Molecule: VCAM-1), διακυτταρικού προσκολλητικού μορίου (Intercellular adhesion molecule: ICAM-1, εξοκυττάρων πρωτεϊνών, όπως λαμινίνης και κολλαγόνου τύπου IV, επιπρόσθετα με άλλες επιδράσεις, όπως αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα ή αγγειογένεση [52].

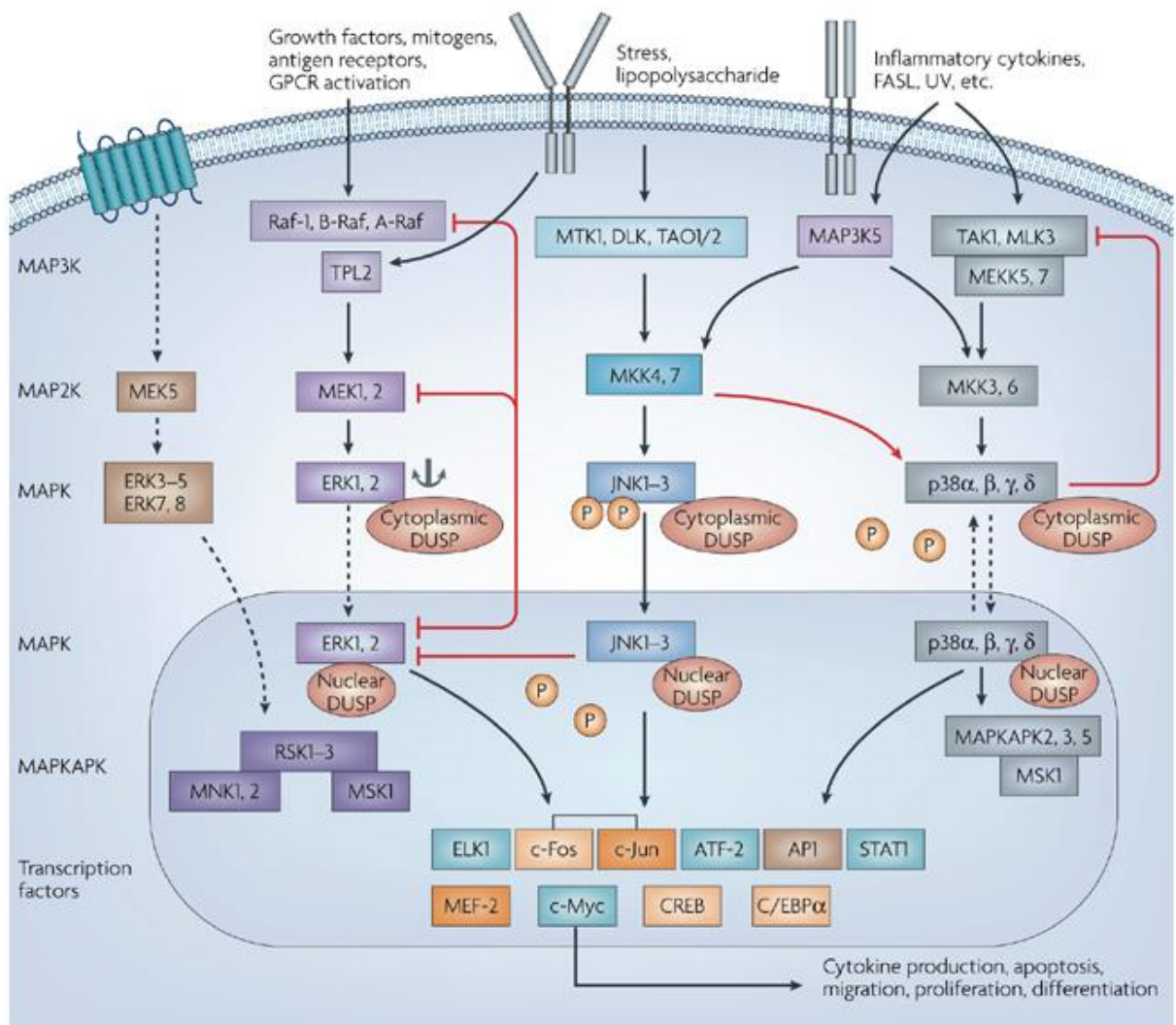
1.1.2.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP-κινασών

Οι MAP-κινάσες (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών με ενεργότητα σερίνης θρεονίνης (Ser/Thr), οι οποίες είναι ευρέως συντηρημένες μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταγωγή μηνυμάτων. Ενεργοποιούνται από ποικιλία ερεθισμάτων και εμπλέκονται σε πολλά και σημαντικά κυτταρικά προγράμματα όπως: κυτταρικός πολλαπλασιασμός, κυτταρική διαφοροποίηση, κυτταρική κίνηση και κυτταρικός θάνατος. Οι MAPKs φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από MAPK-κινάσες (MAPKKs), οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από MAPK-κινάσες-κινάσες (MAPKKKs). Οι MAPKKKs ενεργοποιούνται με τη σειρά τους μέσω αλληλεπίδρασης με την οικογένεια των μικρών GTPασών και/ή με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, που συνδέουν τα συστατικά των MAPK με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ή εξωτερικά ερεθίσματα [53, 54]

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK οργανώνονται ιεραρχικά σε τρεις επιμέρους οδούς μεταγωγής σήματος, οι οποίες ακολουθούν την τυπική αυτή

διευθέτηση, και διαθέτουν εξειδικευμένους ενδιάμεσους μεσολαβητές οι οποίοι διατηρούν αναλλοίωτο το αρχικό σήμα. Η εξειδίκευση στην απόκριση επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση διαφορετικών MKKK→MKK →MAPK συστημάτων σε απόκριση διαφορετικών ερεθισμάτων [55]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK ενεργοποιείται από μεγάλη ποικιλία υποδοχέων που εμπλέκονται στην αύξηση και διαφοροποίηση και περιλαμβάνουν (Εικόνα 1.22):

- υποδοχείς κινασών τυροσίνης (receptor tyrosine kinases, RTKs),
- υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (GCRPs)
- ιντεγκρίνες &
- διάιλους ιόντων



Εικόνα 1.22: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP-κινασών [59]

Τα συγκεκριμένα συστατικά του μονοπατιού ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφορετικών ερεθισμάτων, αλλά η αρχιτεκτονική του μονοπατιού συνήθως περιλαμβάνει μια ομάδα πρωτεϊνών-προσαρμογέων (Shc, GRB2, Crk) που συνδέουν τον υποδοχέα με έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine nucleotide exchange factor) (SOS, C3G) μεταβιβάζοντας το σήμα σε μικρές GTP πρωτεΐνες πρόσδεσης (Ras, Rap1), οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον κύριο σηματοδοτικό καταρράχτη που αποτελείται από μία MAPKKK (Raf), μία MAPKK (MEK1/2) και MAPK (ERK). Ένα ενεργοποιημένο διμερές της ERK μπορεί να ρυθμίζει στόχους στο κυττόςολιο και επίσης μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και φωσφορυλιώνει μια ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση [55, 56].

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες (Stress-activated protein kinases, SAPK) ή οι αμινοτελικές κινάσες της c-JUN (Jun N-terminal kinases, JNK) είναι μέλη της οικογένειας MAPK και ενεργοποιούνται από ποικιλία περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, φλεγμονωδών κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και GPCR αγωνιστών. Τα σήματα στρες «παραδίδονται» σε αυτόν τον καταρράχτη μέσω μικρών GTPασών της οικογένειας Rho (Rac, Rho, cdc42). Όπως και με τις άλλες MAPKs, η κινάση που βρίσκεται πλησιέστερα της μεμβράνης είναι μια MAPKKK, τυπικά η MEKK1-4 ή ένα μέλος της μικτής σειράς κινασών (mixed lineage kinases, MLK) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MKK4 (SEK) ή την MKK7, και τις SAPK/JNK κινάσες. Εναλλακτικά, η MKK4/7 μπορεί να ενεργοποιηθεί από ένα μέλος της οικογένειας της GCK (germinal center kinase) με έναν ανεξάρτητο από GTPάση τρόπο. Η SAPK/JNK μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου μπορεί να ρυθμίζει την ενεργότητα πολλαπλών μεταγραφικών παραγόντων [57, 58].

Οι p38 MAPKs (α, β, γ και δ) είναι μέλη της οικογένειας MAPK, τα οποία ενεργοποιούνται από ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων και φλεγμονωδών κυτταροκινών. Όπως και στα άλλα μονοπάτια των MAPK, μια MAPKKK είναι πλησιέστερα στη μεμβράνη, τυπικά μια MEKK ή μια MLK. Η MAPKKK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MKK3/6, τις p38 MAPK κινάσες. Οι MKK3/6 μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν άμεσα από την ASK1, η οποία έχει διεγερθεί από αποπτωτικά ερεθίσματα. Η p38 MAPK εμπλέκεται στη ρύθμιση των HSP27 και MK2 (MAPKAPK-2), MK3 (MAPKAPK-3) και αρκετών μεταγραφικών παραγόντων που

περιλαμβάνουν τους ATF-2, Stat1, το σύμπλοκο Max/Myc, τους MEF-2, Elk-1 και έμμεσα τον CREB μέσω ενεργοποίησης του MSK1 [56-58].

1.2 AGEs και Αναπαραγωγικό Σύστημα

Ο ωοθηκικός ιστός, μεταξύ άλλων, αποτελεί στόχο εναπόθεσης και συσσώρευσης τόσο των ενδογενώς όσο και των εξωγενώς παραγόμενων AGEs [60-62].

Συγκεκριμένα σε ότι αφορά την επίδραση εξωγενών AGEs στον ωοθηκικό ιστό, απεδείχθη η άμεση εναπόθεση των γλυκοτοξινών AGEs και του υποδοχέα τους RAGE στα στρώματα της ωοθήκης θήλεων επιμύων όταν χορηγήθηκε τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs για 6 μήνες, σε αντίθεση με ομάδα επιμύων που έλαβε τροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε AGEs [61]. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης, ινσουλίνης και τεστοστερόνης στον ορό των επιμύων που έλαβαν τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs γεγονός που επιβεβαιώνει την επίδραση των τοξικών αυτών μορίων στο αναπαραγωγικό και μεταβολικό προφίλ των πειραματόζων.

Μελέτη της ομάδα μας παρουσίασε για πρώτη φορά τον εντοπισμό των AGEs, του RAGE καθώς και του NF-κB σε ανθρώπινο φυσιολογικό και πολυκυστικό ωοθηκικό ιστό [60] και αποτέλεσε την απαρχή της διερεύνησης του ρόλου των AGEs στο αναπαραγωγικό σύστημα και τα συνέδεσε με την παθοφυσιολογία του Σύνδρομου Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια διαφορετική ποιοτική κατανομή των AGE, RAGE και του ενεργοποιημένου NF-κB σε γυναίκες με ΣΠΩ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, ενώ εντοπισμός των AGE και RAGE υπήρξε ισχυρότερος στη στιβάδα των κοκκιοκυττάρων των ΣΠΩ ωοθηκών [60]. Ήδη βέβαια και πάλι από την ομάδα μας, είχαν εντοπίσει αυξημένα επίπεδα AGEs στον ορό αδύνατων, νορμογλυκαιμικών γυναικών με Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ) [63].

Το ΣΠΩ αποτελεί μια από τις συχνότερες ενδοκρινολογικές παθήσεις του θήλεος αναπαραγωγικού συστήματος το οποίο φαίνεται να επηρεάζει το 6-7% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας καθώς είναι η κύρια αιτία ανωθυλακιορρηκτικής

στεριότητας [64, 65]. Χαρακτηρίζεται από πολυκυστικές ωοθήκες με πεπαχημένο, ινώδη χιτώνα (*tunica albuginea*), υποφλοιώδη ζώνη που αποτελείται από πολλά κυστικά θυλάκια που βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και της ατρησίας και πλεονάζουσα παραγωγή ανδρογόνων [66]. Παρά τη συνεχή έρευνα, οι ακριβείς μηχανισμοί που ενεργούν τοπικά και προάγουν την ανωοθυλακιορρηξία στο ΣΠΩ παραμένουν άγνωστοι.

Από την άλλη μεριά τα υψηλά επίπεδα AGEs είναι γνωστό ότι έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν ομοιοπολικές διασυνδέσεις με δομικές πρωτεΐνες μεγάλου χρόνου ζωής, όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη [67] και οδηγούν στην τροποποίηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας τους, ελαττώνοντας την ενζυματική τους ενεργότητα, μεταβάλλοντας τις βιοφυσικές τους ιδιότητες και αλλάζοντας τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις τους με άλλα ένζυμα [68, 69]. Χαρακτηριστικά, η *in vitro* έκθεση μεσαγγειακών κυττάρων σε AGEs προκαλεί, μέσω της ενεργοποίησης της τύπου-υποδοχέα κινάσης-1 της ακτιβίνης (*activin receptor-like kinase 1*) την αύξηση στο mRNA και την πρωτεΐνη του κολλαγόνου τύπου IV άλφα 1, ενός από τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [70].

Οι ίνες κολλαγόνου στα ωοθυλάκια μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας εξαιτίας της προωορρηκτικής αύξησης της λυτικής ενεργότητας του κολλαγόνου. Τα συστατικά του κολλαγόνου του ωοθηκικού στρώματος στην εξωκυττάρια ουσία και στον ινώδη χιτώνα είναι διάμεσα των κολλαγόνων τύπου I, III και IV [71], τα οποία παρέχουν δομική σταθερότητα στις ωοθήκες και υποστηρίζουν τη θεμέλια ουσία, στην οποία λαμβάνει χώρα η ωοθυλακική ωρίμανση, η ωορρηξία και ο σχηματισμός του ωχρού σωματίου [72, 73]. Η φυσιολογική διαμόρφωση του κολλαγόνου στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία απαιτεί το ένζυμο της **οξειδάσης της λυσίνης** (*lysyl oxidase, LOX*). Η LOX είναι μια εξαρτώμενη από χαλκό αμινική οξειδάση, η οποία καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση της πεπτιδυλολυσίνης και της υδροξυλυσίνης στην ελαστίνη και στις αλυσίδες κολλαγόνου. Οι προκύπτουσες αλδεΰδες οδηγούνται σε αυθόρμητη συμπύκνωση, σχηματίζοντας διασταυρούμενες διασυνδέσεις μεταξύ και εσωτερικά των αλυσίδων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αυτή η μετα-μεταγραφική τροποποίηση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας επηρεάζει σημαντικά τις δομικές ιδιότητες του κολλαγόνου και της ελαστίνης και συμβάλλει στη διέγερση ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών που

παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστα [74]. Λόγω της δράσης της αυτής, η μείωση στη φυσιολογική έκφραση της LOX έχει περιγραφεί σε πολλές πολυγονιδιακές και μονογονιδιακές διαταραχές όπως η αθηροσκλήρωση, το σύνδρομο Ehlers-Danlos τύπου IX και η νόσος Menkes [74, 75]. Αντίθετα, και η επαγωγή της LOX εμπλέκεται στην ανθρώπινη παθοφυσιολογία και αρκετές μελέτες έχουν πρόσφατα προτείνει την σαφή συσχέτιση μεταξύ οργανικής ίνωσης και ενισχυμένης ενεργότητας της LOX, η οποία έχει περιγραφεί σε αρκετές χρόνιες ηπατικές νόσους, στην ιδιοπαθή και πειραματική πνευμονική ίνωση, στην πειραματική ηπατική ίνωση και στη νεφρική ίνωση στους αρουραίους, καθώς και σε άλλες παθολογίες που προκαλούν ίνωση [76-83].

Κατά τη διαδικασία της ωορρηξίας, η σύνθεση του κολλαγόνου ρυθμίζεται από την υδροξυλάση της προλίνης και τη LOX. Σε πειραματικούς οργανισμούς η ενεργότητα της LOX στα ωοθυλάκια επάγεται μετά από την ωοθυλακική διάρρηξη, προκαλώντας την αναδόμηση των ινών κολλαγόνου [84]. Μελέτες *in vivo* αποδεικνύουν ότι η LOX εκφράζεται στον ωοθηκικό ιστό αρουραίου και βοός και συγκεκριμένα στη στιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων [85, 86]. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν τη ρύθμιση της LOX στον ωοθηκικό ιστό σε ενδοκρινές, παρακρινές και αυτοκρινές επίπεδο που οδηγούν στη συντονισμένη ρύθμιση της ωοθηκικής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης [87]. Επιπρόσθετα, μια μελέτη που διερευνά την έκφραση της LOX στο επαγόμενο από διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) ΣΠΩ σε αρουραίους, έδειξε ότι η χρήση της DHEA αύξησε την έκφραση του LOX mRNA περισσότερο από τρεις φορές σε σχέση με τα επίπεδα των μαρτύρων, προτείνοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης LOX μπορεί να είναι μία από τις αιτίες της κυστογένεσης στο ΣΠΩ [88].

Η εξασφάλιση της φυσιολογική λειτουργίας τόσο της ωοθήκης και όσο και των ωοθυλακίων προϋποθέτει τη φυσιολογική δομή και ελαστικότητα του περιβάλλοντος συνδετικού ιστού που αποτελεί το παρέγχυμα, ενώ η φυσιολογική δραστηριότητα της LOX όπως προκύπτει μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο. Υπό το πρίσμα του πιθανού ρόλου της LOX στο ΣΠΩ, μελέτη από την ομάδα μας, έδειξε ότι το ένζυμο αυτό υπερεκφράζεται σε ωοθηκικό ιστό από ΣΠΩ σε σχέση με τον φυσιολογικό και ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου *LOX* ρυθμίζεται από σηματοδοτικά διαμεσολαβητικά μόρια που επάγονται από τα AGEs

[62]. Η συσσώρευση δηλαδή των AGEs είναι ικανή να διεγείρει την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και το σχηματισμό ανώμαλων διασταυρούμενων δεσμών κολλαγόνου, διαταράσσοντας έτσι τις φυσιολογική ιστική αναδιοργάνωση που απαιτείται για την ωρίμανση των ωοθυλακίων, πιθανόν επιδρώντας στη μεταγραφική διαδικασία οξειδωτικών παραγόντων [62].

Εκτός από τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό, η φυσιολογική αγγείωση της ωοθήκης είναι επίσης καθοριστικής σημασίας για τη φυσιολογική της λειτουργία. Η καταστροφική δράση των AGEs στα αγγεία είναι ευρέως αποδεκτή λόγω της διέγερσης φλεγμονωδών παραγόντων. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ισχυρή θετική συσχέτιση των AGEs με τα επίπεδα *ενδοθηλίνης-1 (endothelin-1, ET-1)*, ενός πεπτιδίου δείκτη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, τόσο σε γυναίκες με ΣΠΩ όσο και σε φυσιολογικές γυναίκες [89]. Εξάλλου, πέρα από την αυξημένη περιεκτικότητα σε AGEs στον ορό γυναικών με ΣΠΩ, υπάρχει και θετική συσχέτιση με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο [90].

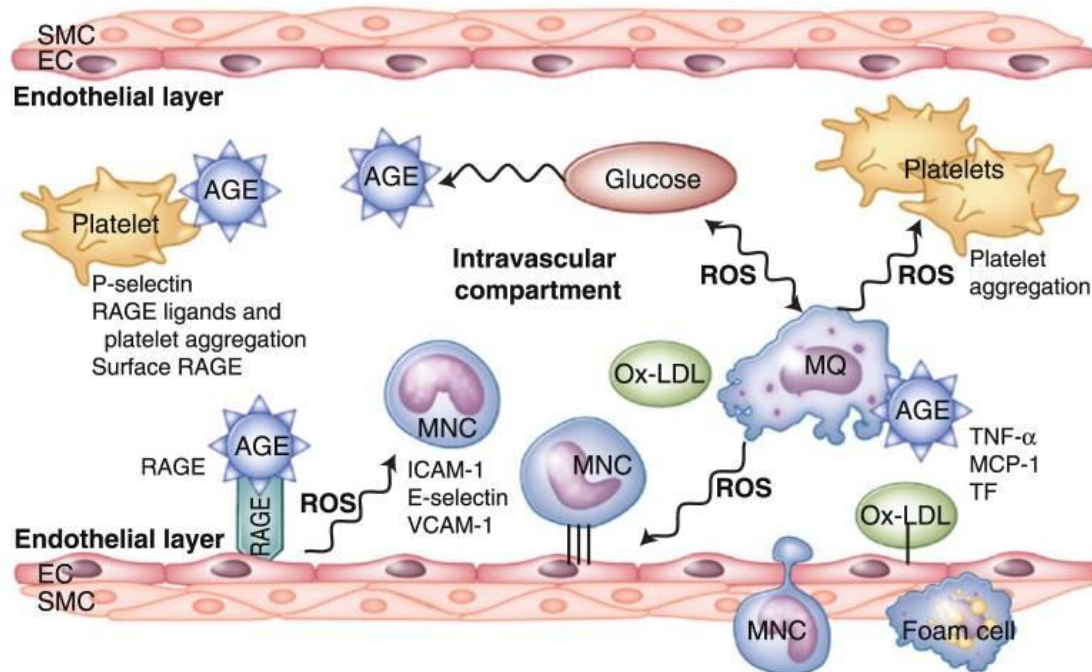
Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν πως το οξειδωτικό φορτίο που επάγει η παρατεταμένη συσσώρευση και εναπόθεση των ενδογενών και των εξωγενών AGEs, καθώς και η επίδρασή τους στους μηχανισμούς σηματοδότησης και ενεργοποίησης παραγόντων φλεγμονής, είτε λόγω του γήρατος, είτε λόγω άλλων παθολογικών καταστάσεων μπορεί να διαταράσσει τους διαθέσιμους ενεργειακούς μηχανισμούς και κατ' επέκταση την αναπαραγωγική λειτουργία και ικανότητα του συστήματος [91].

1.3 AGEs και Ενδοθήλιο

Η αλληλεπίδραση AGE/RAGE, μέσω δέσμευσης των AGEs υποδοχέα τους RAGE τροποποιεί δραματικά τις βιολογικές ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχειδειχθεί ότι τα ερυθροκύτταρα ασθενών με διαβήτη επάγουν οξειδωτικό στρες στα ενδοθηλιακά κύτταρα, κάτι το οποίο παρεμποδίστηκε όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα είχαν προ-επωαστεί με το αντιοξειδωτικό probucol ή με αντίσωμα έναντι του RAGE, καθώς επίσης και όταν τα διαβητικά ερυθροκύτταρα είχαν προ-επωαστεί με αντίσωμα έναντι των AGEs (anti-AGE IgG) [92, 93]. Η αλληλεπίδραση AGE/RAGE έχειδειχθεί ότι αυξάνει την απελευθέρωση του ιστικού παράγοντα, την έκκριση της ιντερλευκίνης-6, την έκφραση του αγγειακού μορίου κυτταρικής προσκόλλησης VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) και ότι τροποποιεί την διαπερατότητα του ενδοθηλιακού φραγμού [92, 93]. Η έκφραση του VCAM-1 ακολουθείται από μια αύξηση στην προσκόλληση των μονοκυττάρων συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην διαδικασία αρτηριοσκλήρυνσης. Μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας παρατηρήθηκε όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεπώαστηκαν με διαβητικά ερυθροκύτταρα, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε όταν συνεπώαστηκαν με φυσιολογικά ερυθροκύτταρα [92].

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ικανότητα των AGEs να σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις έχει επίδραση στις ιδιότητες των βασικών μεμβρανών του αγγειακού τοιχώματος [6]. Η ύπαρξη των AGEs στον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να παρέμβει στην ενδοθηλιακή λειτουργία με ποικίλους τρόπους. Τα τροποποιημένα από τα AGEs κολλαγόνο τύπου I και κολλαγόνο τύπου IV αναστέλλουν το φυσιολογικό σχηματισμό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και μειώνουν την ελαστικότητα των αρτηριών. Η τροποποιημένη από τα AGEs θεμέλια ουσία διεγείρει την αλληλεπίδραση με τα μονοκύτταρα και με ποικίλα μακρομόρια, όπως την LDL και έτσι, τα AGEs μπορούν να δράσουν ως οξειδωτικά μόρια. Τα AGEs που σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις μεταβάλλουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (ιδιαίτερα αυτών με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής) κι έτσι, μπορούν να τροποποιούν και τη λειτουργία τους, όπως για παράδειγμα των αδιάλυτων πρωτεϊνών της σπειραματικής βασικής μεμβράνης και άλλων εξωκυττάριας πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας [6]. Έτσι, σε αντίθεση με την ταχεία άνοδο και

πτώση των επιπέδων γλυκόζης, τα AGEs από τη στιγμή που σχηματίζονται μπορεί να ασκήσουν μακροπρόθεσμες επιδράσεις στο αγγειακό τοίχωμα (Εικόνα 1.23).



Εικόνα 1.23: Σχηματική αναπαράσταση των επιδράσεων της υπεργλυκαιμίας στην αγγειακή φλεγμονή και αθηρωμάτωση. Η υπεργλυκαιμία επάγει την αγγειακή βλάβη μέσω πολύπλοκων αλληλοεπικαλυπτόμενων μονοπατιών: ο σχηματισμός των AGEs και η παραγωγή ROS βίσκονται στο επίκεντρο. Τα AGEs μπορούν να σχηματίσουν διασταυρούμενες συνδέσεις με την αλβουμίνη, την LDL και την IgG στον υπενδοθηλιακό χώρο των αγγείων, με αποτέλεσμα την πάχυνση της βασικής μεμβράνης, την οξείδωση της LDL και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και της φλεγμονώδους διαδικασίας αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα με το σχηματισμό διασταυρούμενων συνδέσεων και τη μη αναστρέψιμη τροποποίηση της δομής του αγγειακού τοιχώματος, τα AGEs που δε σχηματίζουν διασταυρούμενες συνδέσεις μπορούν επίσης να συσσωρευτούν στους ιστούς των διαβητικών. Για παράδειγμα, η καρβοξυμεθυλ-λυσίνη (CML) δε σχηματίζει διασταυρούμενες συνδέσεις, αλλά στοιχεία δείχνουν ότι επιδρά στο αγγειακό τοίχωμα με τη σύνδεσή της με ξεχωριστούς υποδοχείς της κυτταρικής

επιφάνειας. Έτσι, εκτός από τον μηχανισμό δράσης μέσω διασταυρούμενων συνδέσεων, τα AGEs μπορούν επίσης να συνδέονται με υποδοχείς που μεταβιβάζουν το σήμα και αλλάζουν τις ιδιότητες του κυττάρου. Τα AGEs, είτε σχηματίζοντας διασταυρούμενες συνδέσεις είτε συνδεόμενα με τους υποδοχείς τους, θεωρούνται σημαντικοί μεσολαβητές στην παθογένεια των διαβητικών αγγειακών επιπλοκών, συμμετέχοντας τόσο στη μικροαγγειοπάθεια όσο και στη μακροαγγειοπάθεια [6, 94].

Τα AGEs μπορεί να συσχετίζονται με την αθηροσκλήρυνση με διάφορους μηχανισμούς, όπως την αυξημένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την αυξημένη αγγειακή LDL, την αυξημένη αποσταθεροποίηση της πλάκας, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την ελαττωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης μετά από τραυματισμό [6, 95]. Επίσης, τα AGEs είναι χημειοτακτικά για τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του αίματος τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [96, 97] επάγοντας έτσι την μετανάστευση των μονοκυττάρων κατά μήκος μιας ενδοθηλιακής κυτταρικής μονοστιβάδας [97]. Σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας, αναστολείς του NF-κB μείωσαν σε μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης προσκόλληση των μονοκυττάρων, προτείνοντας ότι η ενεργοποίηση του NF-κB είναι βασική για την επαγόμενη από τα AGEs προσκόλληση και μετανάστευση των μονοκυττάρων.

Οι επαγόμενοι από τα AGEs αθηροσκληρυντικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν: την καταστολή του NO [98], την αντίσταση του γλυκοζυλιωμένου κολλαγόνου στην αγγειακή ανακατασκευή και τη διαταραχή της κάθαρσης της LDL. Η σύνδεση της LDL απολιποπρωτεΐνης Β με τα AGEs διαταράσσει την επαγόμενη από τον υποδοχέα της ηπατική απομάκρυνση και κάθαρση και την παγιδεύει στο υπενδοθήλιο. Αντίστροφα, η γλυκοζυλίωση της απολιποπρωτεΐνης Β προάγει την παραμονή της στο αορτικό τοίχωμα και την αυξημένη αναγνώρισή της από τα μακροφάγα. Επομένως, υπάρχει αυξημένη εναπόθεση AGEs-LDL στα αγγεία και αυξημένη παραγωγή αφρωδών κυττάρων μέσω της αναγνώρισης της τροποποιημένης (οξειδωμένης) LDL από τα μακροφάγα και της πρόσληψής της [6]. Με αυτό τον τρόπο, η γλυκοζυλιωμένη LDL ενισχύει το σχηματισμό του αθηρώματος περισσότερο από τη «γυμνή» LDL [99]. Οι *in vitro* μελέτες έχουν δείξει λοιπόν ότι τα AGEs σχηματίζονται ενδομοριακά και διαμοριακά με πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας του αγγειακού τοιχώματος, αυξάνοντας την αγγειακή δυσκαμψία,

παγιδεύοντας λιποπρωτεΐνες μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα και εμποδίζοντας την κάθαρσή τους. Η γλυκοζυλιωμένη LDL έχει φανεί ότι διεγείρει την παραγωγή PAI-1 και μειώνει την παραγωγή tissue plasminogen activator (tPA) σε καλλιέργειες ανθρώπινων αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων [100]. Η γλυκοζυλιωμένη HDL έχει επίσης συνδεθεί με μειωμένη ικανότητα αναστολής της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα [101]. Η αλληλεπίδραση των AGEs με τους υποδοχείς τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει δείξει ότι προάγει την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, τη θρομβωτική δραστηριότητα, τη μετανάστευση των μακροφάγων και των T λεμφοκυττάρων στην έσω στοιβάδα και την αναστολή της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο χάλασης, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αθηρογένεσης [98].

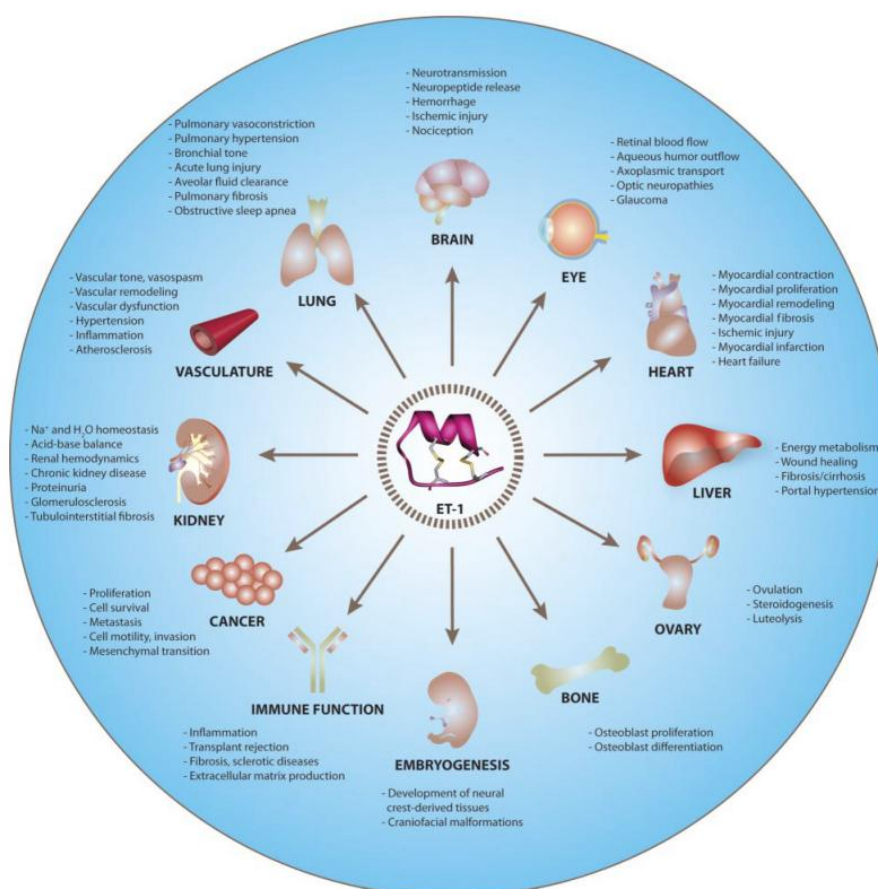
In vivo, αυξημένη εναπόθεση AGEs έχει βρεθεί σε αθηρωματικές πλάκες και λιπώδεις γραμμώσεις και ιδιαίτερα μέσα στα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μακροφάγα και α σχετιζόμενα αφρώδη κύτταρα ασθενών [102, 103]. Επιπλέον, έχουν σημειωθεί αυξημένα επίπεδα τους στο πλάσμα και αυξημένη εναπόθεση σε αγγειακούς ιστούς σε διαβητικούς ασθενείς. Τα επίπεδα αυτά συσχετίζονται με τη διαταραχή της αγγειοχάλασης και τη μειωμένη ελαστικότητα των αγγείων που αποκαθίστανται με τη χορήγηση αντι-AGEs [104, 105].

Ενδοθηλίνη-1

Η **ενδοθηλίνη-1 (endothelin-1, ET-1)** είναι μια πεπτιδική ορμόνη με ποικίλες βιολογικές δράσεις. Ταυτοποιήθηκε πρωταρχικά το 1988 ως ένας παράγοντας του ενδοθηλίου ο οποίος προκαλούσε παρατεταμένη αγγειοσυστολή και αύξηση της αρτηριακής πίεσης (Yanagisawa et al., 1988). Οι αγγειοδραστικές ιδιότητες της ET-1 έχουν κάνει το πεπτίδιο αυτό γνωστό για το ρόλο του στην υπέρταση. Παρόλα αυτά, μελέτες για περισσότερο από μια εικοσαετία έχουν αποκαλύψει ότι η ET-1 παίζει ένα πιο σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία των θηλαστικών [107] (Εικόνα 1.24).

Είναι πλέον σαφές ότι η ET-1 είναι ζωτικής σημασίας για τη νευρολογική λειτουργία, την πνευμονική φυσιολογία, τη μεταφορά υγρών και ηλεκτρολυτών, τις αυτοάνοσες διαταραχές, και τη βιολογία του καρκίνου [107]. Η ET-1 απαιτείται

επίσης για τους ανάπτυξη των ιστών που προέρχονται από την εμβρυϊκή νευρική ακρολοφία. Η βιολογική σημασία της ET-1 καταδεικνύεται ακόμη περισσότερο από την κλινική σημασία της. Πιο συγκεκριμένα, η θεραπευτική παρέμβαση με ανταγωνιστές του υποδοχέα της ET-1 έχει βελτιώσει αξιοσημείωτα την κλινική διαχείριση των ασθενών που πάσχουν από σοβαρή πνευμονική αρτηριακής υπέρταση [108]. Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα της ET-1 έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή πρόληψη της εξέλιξης της χρόνιας νεφρικής νόσου [109], έναν γνωστό, ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου.

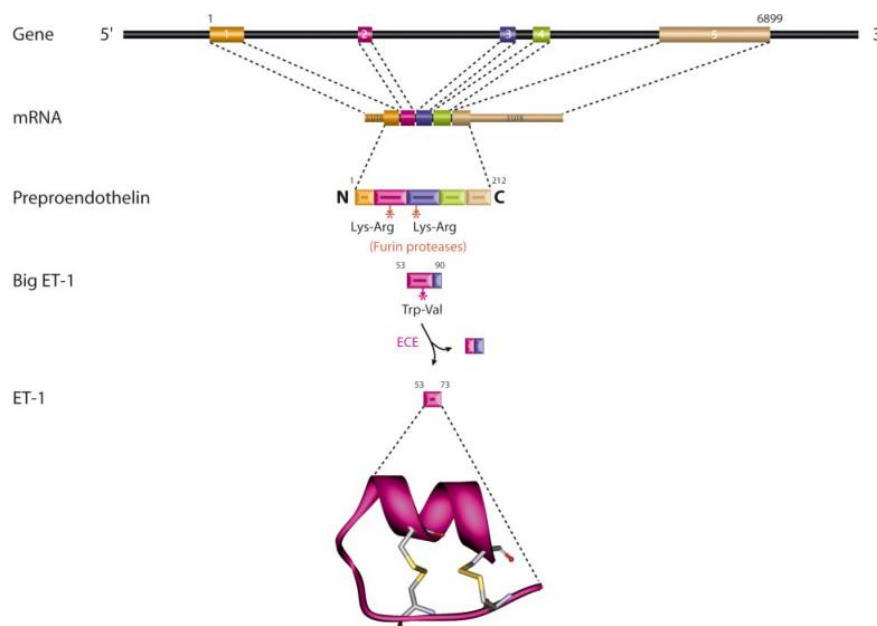


Εικόνα 1.24: Διαγραμματική σύνοψη της φυσιολογίας της ET-1 [106].

Η ET-1 είναι το εντονότερα και ευρέως εκφραζόμενο μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των ενδοθηλινών (ET-1, ET-2 και ET-3) [110]. Οι ποικίλες βιολογικές δράσεις της ET-1 διαμεσολαβούνται από δύο διαφορετικούς υποτύπους υποδοχέων της ET-1 τους ET_A και ET_B [111]. Ωστόσο, τα διαφορεικά πρότυπα έκφρασης των

υποδοχέων και οι σηματοδοτικοί καταρράκτες μόνο μερικώς μετρούν για την πολύπλοκη φυσιολογία της ET-1. Πράγματι, οι μηχανισμοί οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση της ET-1 είναι επίσης σημαντικοί για τη διατήρηση της φυσιολογικής της δράσης. Η σύνθεση του βιολογικά ενεργού πεπτιδίου 21 αμινοξέων (amino acids, aa) της ET-1 είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία (Εικόνα 1.25).

Η μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου *edn1* αποδίδει ένα mRNA 2,8 kilobases (kb) που κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 212 aa την preproET-1 [106]. Το πεπτίδιο οδηγητής 17 aa στοχέυει την preproET-1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου εισέρχεται στην εκκριτική οδό [112]. Πριν από την εξωκύτωση, πρωτεάσες που μοιάζουν με φουρίνη διασπούν την preproET-1 σε μια πρωτεΐνη 38 aa που ονομάζεται μεγάλη ET-1. Το τελικό βήμα διάσπασης διαμεσολαβείται από ένζυμα μετατροπής της ενδοθηλίνης τα οποία διασπούν τη μεγάλη ET-1 στην ενεργή ET-1. Είναι πιθανό να υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί για καθεμία από αυτές τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεων. Ωστόσο, η μεταγραφική ρύθμιση πιστεύεται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός ελέγχου της βιοδιαθεσιμότητα της ET-1 [107].



Εικόνα 1.25: Σύνοψη της σύνθεσης της ET-1. Παρουσίαση και δομή των εσώνων και των εξωνίων και του μονοπατιού επεξεργασίας του RNA του γονιδίου *edn1*. Η μετάφραση παράγει την προ-προενδοθηλίνη (preproET-1). Η δομή της ET-1 περιέχει δύο δισουλφιδικές γέφυρες και λήφθηκε από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων RCSB Protein Data Bank (PDB 1T7H) [107].

Για παράδειγμα, η ET-1 εντοπίζεται τόσο σε ιδιοσυστατικά εκκριτικά κυστίδια [113] όσο και σε εξειδικευμένα ρυθμιστικά κοκκία γνωστά ως σωματίδια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κύτταρων [114]. Η υποξία, η θρομβίνη και η διατμητική τάση είναι γνωστό ότι διεγείρουν την έκκριση της ET-1 μέσω εξωκύτωσης από τα σωματίδια Weibel-Palade [115], αλλά είναι επίσης γνωστό ρυθμίζουν την σταθερή κατάσταση των επιπέδων mRNA του γονιδίου. Σε μία μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η μεσολαβούμενη από την υποξία συσσώρευση της ET-1 σε σωματίδια Weibel-Palade συνοδεύτηκε από μια ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *edn1*, προτείνοντας ότι η μεταγραφή ήταν το αρχικό βήμα στην επαγωγή της ET-1 [116]. Ωστόσο, τα πιο ενδιαφέροντα στοιχεία προέρχονται από διάφορες ανεξάρτητες μελέτες οι οποίες ασχολούνται συγκεκριμένα, με τα επίπεδα διέγερσης της ET-1 ενώ η επικρατούσα άποψη είναι ότι η μεταγραφή είναι η πρωταρχικό επίπεδο ρύθμισης της έκφρασης της ET-1 [107].

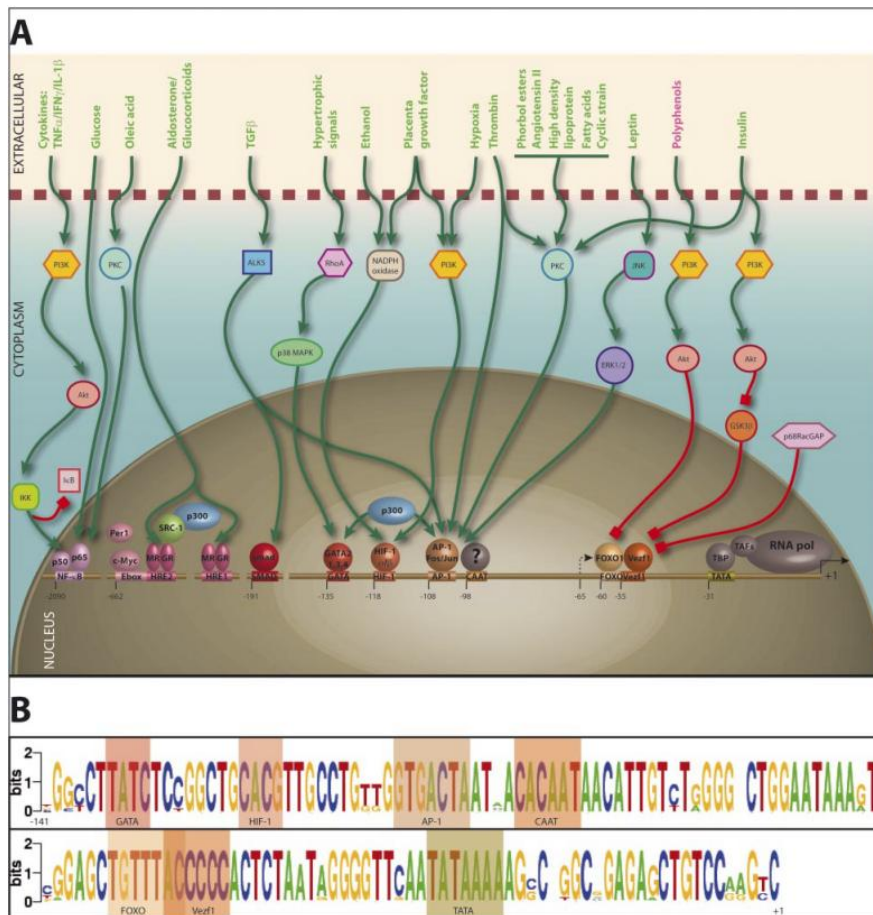
Η ικανότητα του γονιδίου *edn1* να ανταποκρίνεται στις διάφορες ορμόνες και ερεθίσματα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σωστών χωροχρονικών προτύπων έκφρασης της ET-1 στον οργανισμό. Τελικά, αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια συγκλίνουν σε συγκεκριμένα στοιχεία στην ρυθμιστική περιοχή του *edn1* τα οποία ελέγχουν την γονιδιακή δραστηριότητα. Μεταβολές στα πρότυπα έκφρασης του *edn1* έχουν διαπιστωθεί στην παθογένεση και την εξέλιξη διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του άσθματος, της αθηροσκλήρωσης, μυοκαρδιοπάθειας, της πρωτεϊνουρία, της διαβητική αμφιβληστροειδοπάθειας, του καρκίνου, της λεύκης (vitiligo), και της σκλήρυνσης. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του *edn1* έχουν συνδεθεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας και του άσθματος [106]. Επιπρόσθετα, μια κοινή εισαγωγή αδερίνης στην 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'-untranslated region, 5'-UTR) του *edn1* οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα mRNA και συνδέεται με την ιδιοπαθή υπέρταση [117] και την ορθοστατική δυσανεξία [118]. Οι ειδικοί φαρμακολογικοί παράγοντες είναι επίσης γνωστό ότι επηρεάζουν άμεσα την έκφραση του *edn1*. Για παράδειγμα, μερικοί αγωνιστές του υποδοχέα PPAR γ (proliferator-activated receptor γ) συνταγογραφούνται κοινώς για τους διαβητικούς ασθενείς και είναι γνωστό ότι μπλοκάρουν τον βασικό μεταγραφικό παράγοντα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης-1 (activator protein-1, AP-1) από τη σύνδεση του με τον υποκινητή του *edn1* [119]. Η

επακόλουθη μείωση της έκφρασης του *edn1* έχει συνδεθεί με το οίδημα, μια παρενέργεια περιοριστική της δόσης σε ασθενείς που λαμβάνουν PPAR αγωνιστές [120]. Έτσι, γίνεται φανερό ότι ο έλεγχος της έκφρασης του *edn1* είναι απαραίτητος για διάφορες πτυχές της ανθρώπινης φυσιολογίας, παθολογίας, και φαρμακολογίας.

Το γονίδιο *edn1* στα θηλαστικά περιέχει 5 εξώνια και εκτείνεται σε 6,8 kb του γενωμικού DNA [107] (Εικόνα 1.25). Η βασική θέση έναρξης μεταγραφής του *edn1* έχει χαρτογραφηθεί ανεξάρτητα από δοκιμασίες προστασίας νουκλεάσης και επέκτασης του 5'-άκρου [121]. Η μεταγραφή του *edn1* θα μπορούσε να ξεκινά από μια εναλλακτική θέση που βρίσκεται 65bp ανοδικά της βασικής θέσης έναρξης [121]. Αυτή η εναλλακτική μεταγραφή αρχίζει ανοδικά από την ρυθμιστική αλληλουχία TATA (TATA box) και από αρκετά άλλα *cis*-αντιδρώντα στοιχεία εντός του υποκινητή του *edn1*, γεγονός όμως που δεν επηρεάζει την κωδική αλληλουχία της *preproET-1*. Δοκιμασίες επέκτασης εκκινητών που διενεργήθηκαν σε βιβλιοθήκες RNA από ιστούς παρείχαν αποδείξεις ότι η μεταγραφή από την εναλλακτική θέση έναρξης συνέβη κατά έναν ιστό-ειδικό τρόπο και μπορεί να είναι σημαντική έκφραση του *edn1* στην καρδιά και τον εγκέφαλο [121]. Εκτός από το μετάγραφο φυσικού τύπου έχουν αναφερθεί τρεις επιπλέον ισομορφές, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του *edn1*. Κάθε μετάγραφο διατηρεί την κωδική αλληλουχία για το ώριμο πεπτίδιο της ET-1, αλλά κωδικοποιεί για τις προβλεπόμενες ισομορφές της *preproET-1*, μήκους 211, 178, και 78aa. Η ρυθμιστική σημασία των προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του mRNA του *edn1* του παραμένει άγνωστη. Σε αντίθεση, ο εγγύς υποκινητής του *edn1* είναι συντηρημένος σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των θηλαστικών και έχει μελετηθεί σε εκτενώς (Εικόνα 1.26). Ο υποκινητής του *edn1* περιέχει τόσο κοινά *cis*-αντιδρώντα στοιχεία όσο και σημαντικά κυτταρο-ειδικά και επαγωγίμα στοιχεία [107].

Η ανάλυση με απαλοιφή του ανθρώπινου υποκινητή του *edn1* συνδεδεμένου με ένα γονίδιο αναφοράς αποκάλυψε ότι τα στοιχεία του ελάχιστου υποκινητή βρίσκονται μέσα στις πρώτες 150 bp ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής [122]. Αυτή η περιοχή του γονιδίου *edn1* είναι συντηρημένη σε υψηλό βαθμό σε όλα τα θηλαστικά και περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες TATA και CAAT οι οποίες εντοπίζονται στις θέσεις -31 και -98 bp, αντίστοιχα (Εικόνα 1.26). Η αναγνώριση από της αλληλουχίας TATA πιθανώς εμπλέκει τη συγγενή δεσμευτική πρωτεΐνη στην

αλληλουχία TATA κατά τη συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης μεταγραφής. Τα στοιχεία της αλληλουχίας CAAT είναι πολύ κοινές συνιστώσες των ευκαρυωτικών υποκινητών και αναγνωρίζονται από διαφορετικές δεσμευτικές πρωτεΐνες του DNA, συμπεριλαμβανομένου του μεταγραφικού παράγοντα CAAT, του πυρηνικού παράγοντα-Y, της πρωτεΐνης μετατόπισης CCAAT και της πρωτεΐνης δέσμησης στον CCAAT/ενισχυτή [123].



Εικόνα 1.26: Σύνοψη της ρύθμισης του υποκινητή του *edn1*. **A)** *cis*-αντιδρώντα στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου *edn1* παρουσιάζονται μαζί με τα γνωστά ρυθμιστικά μονοπάτια και παράγοντες που μεσολαβούν στην γονιδιακή ενεργότητα του *edn1*. Παρόλο που αρκετά από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι γνωστό ότι επικαλύπτονται, μόνο οι τεκμηριωμένοι παράγοντες των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από δεδομένα ερεθίσματα παρουσιάζονται. Οι νουκλεοτιδικές θέσεις αριθμούνται σε σχέση με την πρωταρχική θέση έναρξης της μεταγραφής. Σήματα τα οποία αυξάνουν ή μειώνουν την έκφραση του *edn1* παρουσιάζονται με πράσινο και κόκκινο, αντίστοιχα. **B)** Η στοίχιση (alignment) του εγγύς υποκινητή του *edn1* από *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Bos taurus*, *Equus caballus*, *Canis familiaris*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus* και *Mus musculus* [107].

Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες λειτουργούν για την στρατολόγηση της RNA πολυμεράση II. Παρά το συμπέρασμα ότι ένα υποσύνολο των παραγόντων αυτών δρουν στον υποκινητή του γονιδίου *edn1*, η ικανότητά τους σύνδεσης στον υποκινητή ή ρύθμισης του γονιδίου *edn1* δεν έχει πειραματικά δοκιμαστεί. Μετάλλαξη της αλληλουχίας CAAT του *edn1* δεν μετέβαλε βασικούς μεταγραφικούς ρυθμούς σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά παρεμπόδισε τελείως την μεταγραφική ενεργότητα του *edn1* ως απόκριση στην υποξία [124]. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η αλληλουχία CAAT θα μπορούσε να είναι σημαντικότερη κάτω από συνθήκες επαγωγής του υποκινητή μάλλον παρά απλά ενεργώντας ως ένα βασικό ρυθμιστικό στοιχείο του υποκινητή [107].

1.4 Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ)

Το ΕΔ είναι ένα απαραίτητο κυτταρικό οργανίδιο για την πρωτεϊνική σύνθεση και ωρίμανση καθώς και περιοχή αποθήκευσης Ca^{2+} . Η διαταραχή των λειτουργιών του ΕΔ που μπορεί να προκληθεί από διακοπή της ομοιόστασης του Ca^{2+} , αναστολή της γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών ή του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών, υποξία και λοίμωξη από βακτήρια ή ιούς, μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μη διαμορφωμένων ή λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών και αποτυχία του ΕΔ στην αντιμετώπιση του υπερβολικού πρωτεϊνικού φορτίου. Το αποτέλεσμα αυτών των φαινομένων είναι το στρες του ΕΔ, το οποίο ορίζεται ως μια ανισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ζήτησης σε νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες και της χωρητικότητας του ΕΔ. Προκειμένου να μειώσουν το υπερβολικό πρωτεϊνικό φορτίο τα κύτταρα θέτουν σε λειτουργία την απόκριση σε μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR), η οποία σηματοδοτεί την παροδική μείωση της μετάφρασης πρωτεϊνών, την αποικοδόμηση των λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών και την επαγωγή των επιπέδων των μοριακών συνοδών και ενζύμων αναδίπλωσης έτσι ώστε να αυξηθεί η χωρητικότητα του ΕΔ για αναδίπλωση πρωτεϊνών και αποικοδόμηση. Ωστόσο, εάν το στρες του ΕΔ δεν μπορεί να αντιμετωπισθεί, ενεργοποιούνται τα αποπτωτικά μονοπάτια στα προβληματικά κύτταρα.

1.4.1 Μοριακοί συνοδοί στο ΕΔ

Το ΕΔ προσφέρει ένα περιβάλλον ιδανικό για διαμόρφωση και ωρίμανση πρωτεϊνών. Όπως ο αυλός άλλων οργανιδίων του εκκριτικού μονοπατιού, ο αυλός του ΕΔ είναι χημικά αντίστοιχος του «εξωκυτταροπλασματικού» χώρου και άρα τοπολογικά και λειτουργικά αντίστοιχος του εξωκυττάρου χώρου. Επομένως το περιβάλλον του ΕΔ διαφέρει από αυτό του κυτοσολίου όσον αφορά τα ιόντα, τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες και τη διαθεσιμότητα μοριακών συνοδών. Στο ΕΔ πραγματοποιούνται ποικίλες συν-μεταφραστικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες δεν συμβαίνουν στο κυτοσόλιο, όπως ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, η απομάκρυνση του πεπτιδίου-οδηγητή, η N-γλυκοζυλίωση και η προσθήκη της ομάδας γλυκοφωσφατίδουλοϊνοσιτόλης (GPI). Αυτές οι ομοιοπολικές αλλαγές είναι σημαντικές για την σωστή διαμόρφωση των πρωτεϊνών.

Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στο ΕΔ συν-μεταφραστικά και η διαμόρφωση πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις. Αρχικά τα νεοσχηματιζόμενα πεπτίδια εισέρχονται στον αυλό ή τη μεμβράνη του ΕΔ μέσω ενός πρωτεϊνικού καναλιού (Εικόνα 1.27). Στη συνέχεια πραγματοποιείται μετα-μεταφραστική διαμόρφωση αφού η ολοκληρωμένη αλυσίδα έχει απελευθερωθεί από το ριβόσωμα και το πρωτεϊνικό κανάλι (Εικόνα 1.27). Τέλος πραγματοποιείται συναρμολόγηση των ολιγομερών. Αυτό συνήθως συμβαίνει όταν οι υπομονάδες έχουν φτάσει σε μια διαμόρφωση που είναι κοντά στην κατάσταση της τελικής πρωτεΐνης. Σε αυτά τα τρία στάδια της διαμόρφωσης συμμετέχουν μοριακοί συνοδοί και ένζυμα αναδίπλωσης [125].

Οι νεοσυντιθέμενες εκκρινόμενες και συνδεδεμένες με μεμβράνες πρωτεΐνες προκειμένου να μετακινηθούν στο εκκριτικό μονοπάτι και να φτάσουν στο κατάλληλο κυτταρικό προορισμό, πρέπει να έχουν τη σωστή στερεοδιαμόρφωση. Εάν αυτή τη διαδικασία αποτύχει τότε συγκρατούνται στο ΕΔ και οδηγούνται σε αποικοδόμηση (Εικόνα 1.27). Η σωστή ωρίμανση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών πραγματοποιείται κάτω από τη βοήθεια και τον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού μοριακών συνοδών και ενζύμων αναδίπλωσης κατά τη διάρκεια μιας περίπλοκης διαδικασίας που ονομάζεται έλεγχος ποιότητας [126]. Τα πεπτίδια που δεν έχουν αναδιπλωθεί πλήρως ή έχουν αποκτήσει λανθασμένη διαμόρφωση συγκρατούνται

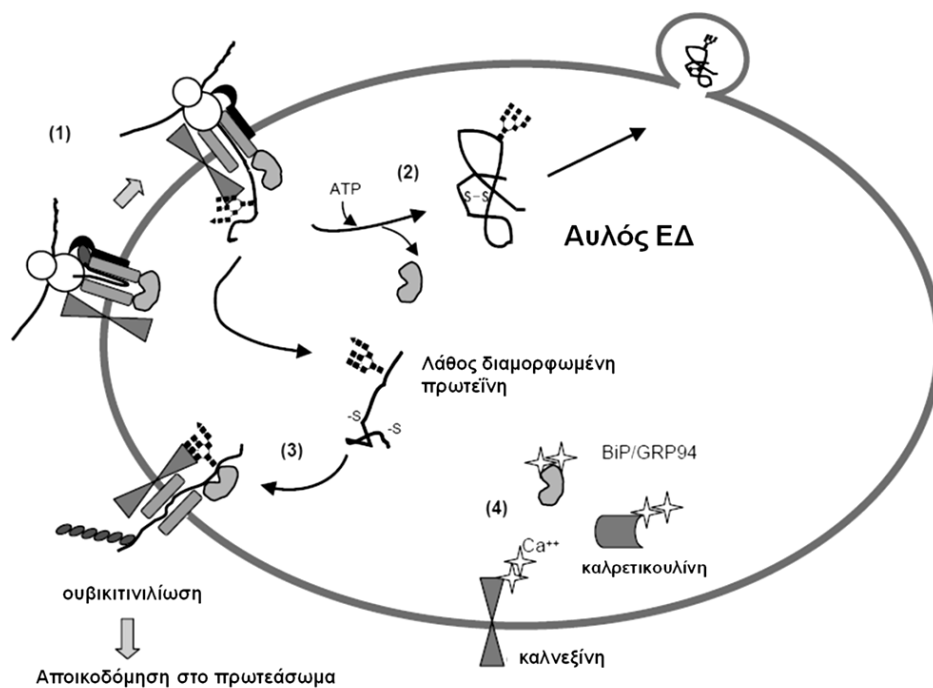
στο ΕΔ μέσω αλληλεπιδράσεων με τους μοριακούς συνοδούς και κατάλληλες πρωτεΐνες κατακράτησης πρωτεϊνών (υποδοχείς KDEL) [125].

Το ΕΔ περιέχει ένα μεγάλο αριθμό μοριακών συνοδών που φυσιολογικά συμμετέχουν στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, στην αναδίπλωση, στη συναρμολόγηση και στον έλεγχο ποιότητας των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση. Οι μοριακοί συνοδοί του ΕΔ μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες: α) στους μοριακούς συνοδούς της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins) που περιλαμβάνει τις GRP78, GRP94 και τους βοηθητικούς συνοδούς, β) στις λεκτίνες όπως η καλνεξίνη, η καλρετικουλίνη και η EDEM (ER degradation enhancing-mannosidase-like protein), γ) στους μοριακούς συνοδούς που παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, όπως η Hsp57. Επιπλέον, υπάρχουν τουλάχιστον δύο ομάδες συνοδών που καταλύουν την αναδίπλωση πρωτεϊνών, που είναι οι δισουλφιδικές ισομεράσες (Protein Disulfide Isomerase, PDI) και οι πεπτιδυλ-προλυλ-ισομεράσες (Peptidyl Prolyl Isomerases, PPIs). Στο ΕΔ υπάρχουν δύο γνωστά συστήματα μοριακών συνοδών, το σύστημα καλνεξίνη/καλρετικουλίνη και το σύστημα GRP78/GRP94 [127].

Το πρώτο σύστημα που αποτελείται από τους μοριακούς συνοδούς-λεκτίνες, την καλνεξίνη και καλρετικουλίνη, εξαρτάται από την παρουσία των N-μονογλυκοζυλιωμένων γλυκανών και των μη αναδιπλωμένων περιοχών στις νεοσυντιθέμενες γλυκοπρωτεΐνες. Καθώς τα πεπτίδια εισέρχονται στον αυλό του ΕΔ συχνά συνδέονται με γλυκάνες που αποτελούνται από δύο μόρια N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, εννιά μόρια μανόζης και τρία μόρια γλυκόζης. Τα μόρια γλυκόζης απομακρύνονται άμεσα από της γλυκοσιδάσες I και II [128] και το υπόλοιπο γλυκοζυλιωμένο πεπτίδιο αναγνωρίζεται από το σύστημα καλνεξίνη/καλρετικουλίνη για περαιτέρω αναδίπλωση και συναρμολόγηση. Η απομάκρυνση του τελευταίου μορίου γλυκόζης καταστρέφει την περιοχή πρόσδεσης για το σύστημα των συνοδών και επιτρέπει στην νέα πρωτεΐνη να μεταφερθεί στο σύμπλεγμα Golgi, εφόσον έχει ολοκληρωθεί η αναδίπλωση σωστά.

Το δεύτερο σύστημα που αποτελείται από τους συνοδούς GRP78/GRP94, εξαρτάται από την παρουσία μη αναδιπλωμένων περιοχών. Η πρωτεΐνη GRP78 που είναι γνωστή και με το όνομα BiP, είναι ομόλογη των πρωτεϊνών Hsp70 στο ΕΔ με

διατηρημένη περιοχή ATPασης και περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων [129]. Η GRP78 αναγνωρίζει και δεσμεύεται σε πρωτεΐνες με υδρόφοβα τμήματα σε μη διαμορφωμένες περιοχές. Επομένως κάποια από τα υποστρώματα του συστήματος καλνεξίνη/καλρετικουλίνη μπορούν να δεσμευτούν στην GRP78 εάν η N-γλυκοζυλίωση εμποδιστεί. Η GRP78 βρίσκεται σε ένα μεγάλο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο μαζί με ποικίλους μοριακούς συνοδούς (GRP94, PDI, ERp72, GRP170/ORP150, UGGT, κυκλοφιλίνη B και SDF2-L1) σχηματίζοντας ένα δίκτυο συνοδών που επεξεργάζεται τα μη διαμορφωμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα [130]. Σε αυτό το σύμπλοκο, η πρωτεΐνη GRP94 συχνά λειτουργεί ως ένα διμερές προσφέροντας μια πλατφόρμα για τη συναρμολόγηση ή τον ολιγομερισμό του πρωτεϊνικού φορτίου [131]. Τέλος, και τα δύο συστήματα μοριακών συνοδών συμβάλλουν στην αποθήκευση ασβεστίου στο ΕΔ (Εικόνα 1.27).



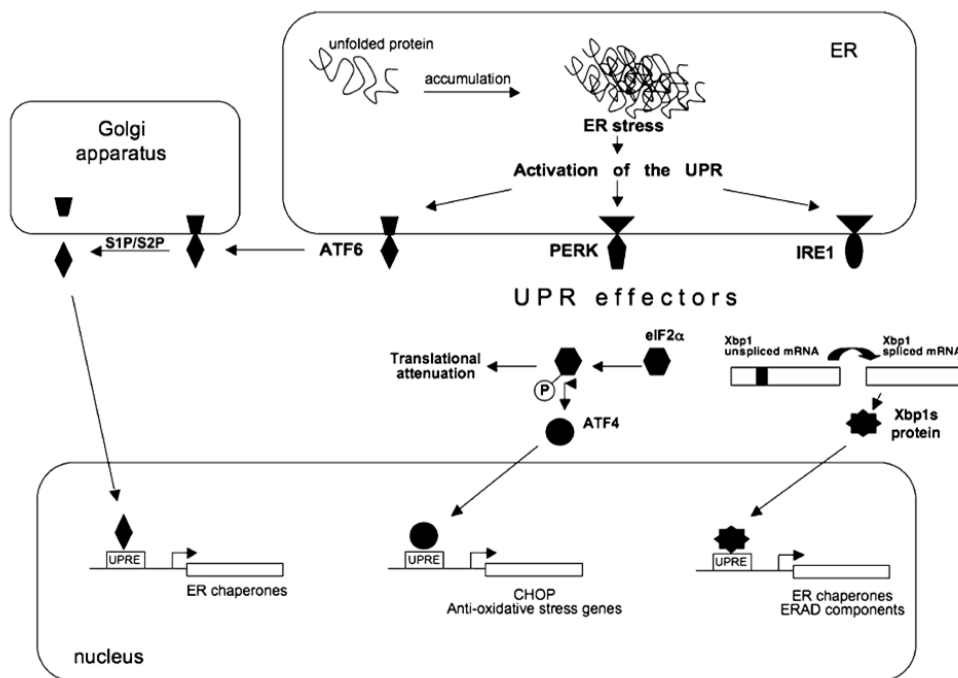
Εικόνα 1.27: Λειτουργίες στο ΕΔ κάτω από φυσιολογικές συνθήκες [127].

Οι πρωτεΐνες οι οποίες απέτυχαν στον έλεγχο ποιότητας του ΕΔ οδηγούνται στην αποικοδόμηση προκειμένου να εμποδιστεί η συσσώρευση τους στο ΕΔ, η οποία είτε μπορεί να μεταβάλει τη συγκέντρωση των μοριακών συνοδών είτε να σχηματίσει αδιάλυτα συσσωματώματα που θα μπορούσαν να είναι τοξικά για το κύτταρο. Ο μηχανισμός αυτός αποικοδόμησης ονομάζεται αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του ΕΔ (ER-Associated Degradation, ERAD) και είναι συντηρημένος από τα κατώτερα

ευκαρυωτικά μέχρι τα θηλαστικά [132]. Κατά τη διάρκεια του ERAD οι πρωτεϊνικοί στόχοι που έχουν επιλεγεί από τον έλεγχο ποιότητας μετατοπίζονται στο κυτοσόλιο και αποικοδομούνται από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Οι μοριακοί συνοδοί όπως καλνεξίνη, GRP78, EDEM και PDI κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή του υποστρώματος για αποικοδόμηση και στην διαλυτοποίησή του [127].

1.4.2 Μονοπάτια σηματοδότησης στην απόκριση του στρες του ΕΔ

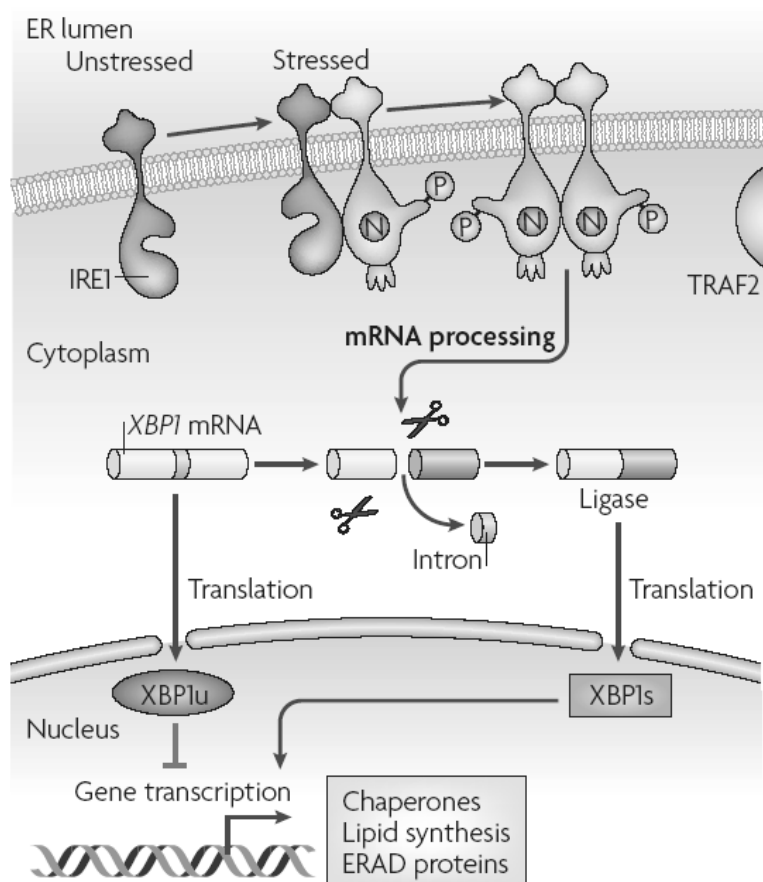
Έχουν αναγνωρισθεί τρεις διαφορετικές ομάδες μονοπατιών μεταγωγής σήματος του στρες του ΕΔ. Κάθε ομάδα ορίζει ένα ξεχωριστό μονοπάτι της UPR που διαμεσολαβείται από τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς IRE1 (Inositol-Requiring-Protein 1), ATF6 (Activating Transcription Factor-6) και PERK (protein kinase RNA, PKR-like ER kinase). Σε κάθε περίπτωση, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη αντιλαμβάνεται τη κατάσταση της αναδίπλωσης πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ και μεταδίδει την πληροφορία δια μέσου της μεμβράνης του ΕΔ στο κυτοσόλιο (Εικόνα 1.28).



Εικόνα 1.28. Αισθητήρες του στρες του ΕΔ και μονοπάτια του UPR [133].

IRE1

Ο πρώτος υποδοχέας του UPR που βρέθηκε στη ζύμη είναι ο IRE1, ο οποίος έχει μια περιοχή στον αυλό του ΕΔ και μια περιοχή στο κυτταρόπλασμα με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης [134]. Ως απόκριση σε λάθος διαμορφωμένες πρωτεΐνες, ο IRE1 ολιγομερίζεται στο επίπεδο της μεμβράνης επιτρέποντας την *trans* αυτοφωσφορυλίωση των περιοχών με δραστικότητα κινάσης. (Shamu & Walter, 1996).



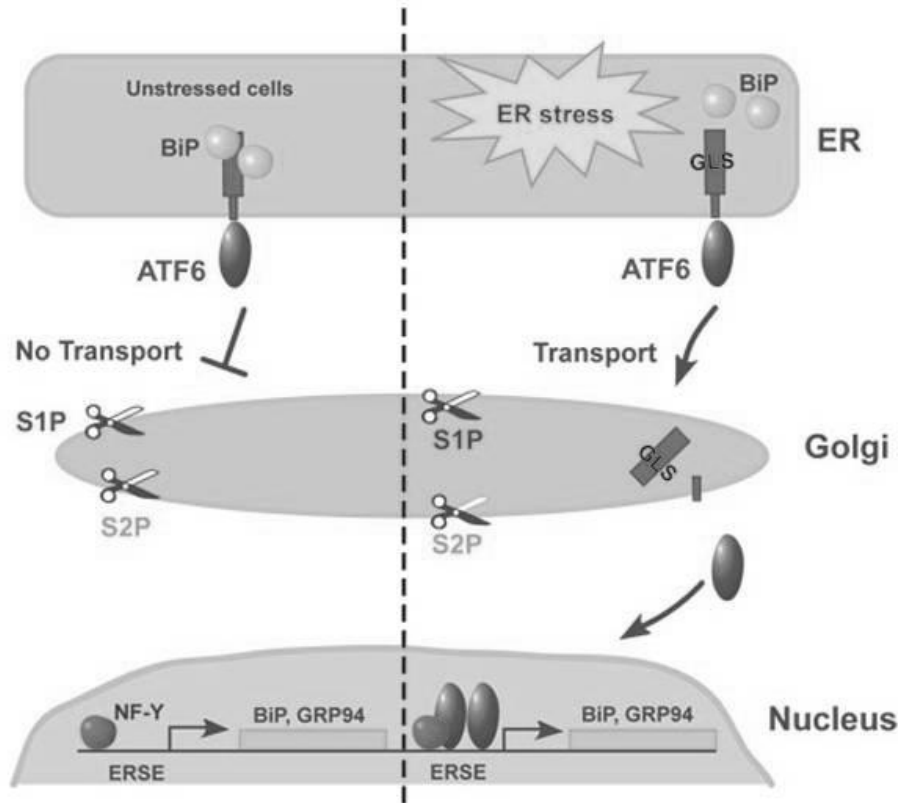
Εικόνα 1.29: Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα IRE1 [137].

Το μονοπάτι σηματοδότησης του IRE1 δε περιλαμβάνει το συνηθισμένο καταρράκτη φωσφορυλίσεων και ενεργοποίησης κινασών καθώς το μοναδικό γνωστό υπόστρωμα του IRE1 είναι η ίδια η πρωτεΐνη IRE1. Μέσω ενός μηχανισμού που δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, η *trans* αυτοφωσφορυλίωση των περιοχών κινάσης ενεργοποιεί δραστικότητα ενδοριβονουκλεάσης με ένα μόνο γνωστό υπόστρωμα, το mRNA που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Hac1 στη ζύμη ή XBP1 (X-box

binding protein-1) στα μετάζωα [135]. Επομένως ο IRE1 είναι ένα ένζυμο με διπλή δραστικότητα, πρωτεϊνικής κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης με εξειδίκευση στη θέση, η οποία δραστικότητα ρυθμίζεται από την εσωτερική μονάδα της κινάσης. Ο IRE1 κόβει το πρόδρομο μόριο mRNA του Hac1 ή του XBP1 δύο φορές, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται ένα παρεμβαλλόμενο κομμάτι ή ιντρόνιο (Εικόνα 1.29). Το 5' και 3' άκρο του mRNA στη συνέχεια ενώνονται, δημιουργώντας ένα ματισμένο (spliced) mRNA το οποίο με τη σειρά του κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή των γονιδίων στόχων του UPR. Στα μετάζωα, τόσο η πρόδρομη μορφή όσο και το προϊόν ματίσματος του XBP1 μεταφράζονται, σε αντίθεση με τη ζύμη. Ωστόσο οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται, οι οποίες διαφέρουν στην αλληλουχία έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Η μορφή του XBP1 που κωδικοποιείται από το προϊόν ματίσματος είναι πιο σταθερή και δρα ως ισχυρός ενεργοποιητής γονιδίων του UPR, ενώ η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το πρόδρομο mRNA είναι ασταθής και καταστέλλει τα γονίδια στόχους του UPR [136]. Η έλλειψη των γονιδίων IRE1 ή XBP1 σε έμβρυα ποντικών έχει αποδειχτεί ότι είναι θανάσιμη κατά την κυοφορία, προτείνοντας ότι συμμετέχουν σε ιδιαίτερα σημαντικές λειτουργίες του ΕΔ [137].

ATF6

Η μελέτη για πρόσθετες πρωτεΐνες του UPR οδήγησε στην αναγνώριση του υποδοχέα ATF6, ο οποίος αποτελεί μέλος μιας νέας ομάδας εξειδικευμένης στα μετάζωα, μεταγωγών σήματος του στρες του ΕΔ. Ο ATF6 συντίθεται ως μια ανενεργή πρόδρομη πρωτεΐνη, η οποία προσδένεται στη μεμβράνη του ΕΔ μέσω ενός διαμεμβρανικού τμήματος, το οποίο προεκτείνεται στον αυλό του ΕΔ (Haze, Yoshida, Yanagi, Yura, & Mori, 1999). Κάτω από συνθήκες που επάγουν το στρες του ΕΔ, ο ATF6, μεταφέρεται από το ΕΔ στη συσκευή Golgi, όπου υφίσταται πρωτεόλυση από δύο πρωτεάσες του Golgi, αρχικά από την S1P (Site 1 Protease) και στη συνέχεια από την S2P (Site 2 Protease) σε μια ενδομεμβρανική περιοχή, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση στο κυτοσόλιο τμήματος του ATF6 (ATF6 fraction). Στη συνέχεια το κομμάτι ATF6f μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του UPR (Haze, Yoshida, Yanagi, Yura, & Mori, 1999) (Εικόνα 1.30).



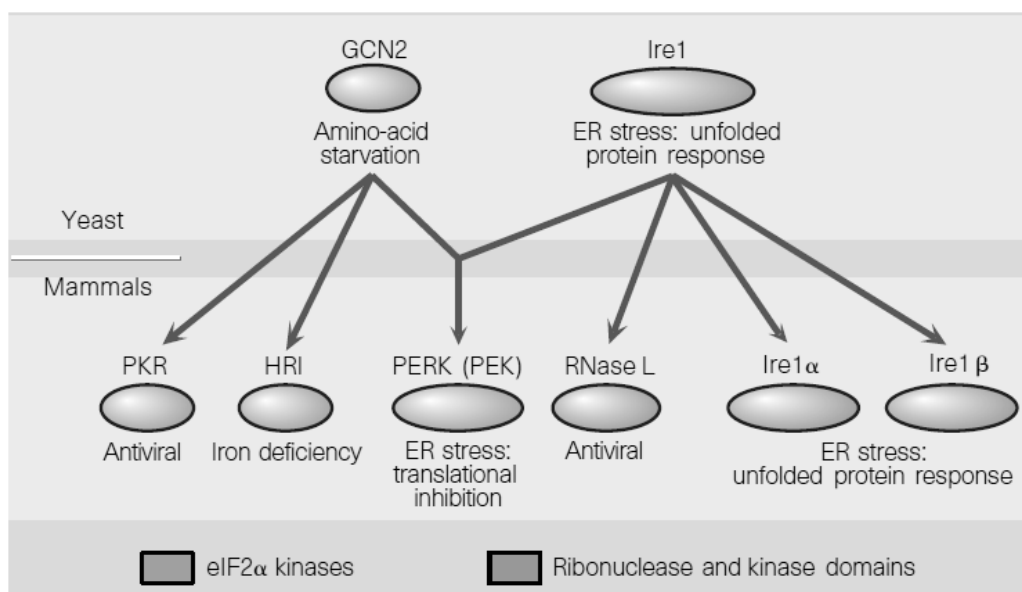
Εικόνα 1.30. Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα ATF6 [137].

PERK

Ο τρίτος υποδοχέας για τη σηματοδότηση του στρες του ΕΔ, ο υποδοχέας PERK παρουσιάζει ομοιότητα με τον IRE1 καθώς συσχετίζονται και φυλογενετικά. Στη ζύμη, η έλλειψη αμινοξέων γίνεται αντιληπτή από την πρωτεΐνη GCN2, η οποία φωσφορυλιώνει μια διατηρημένη περιοχή σερίνης στην α υπομονάδα του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων eIF2α (eukaryotic translation initiation factor-2). Οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στη ζύμη γίνονται αντιληπτές από τον υποδοχέα Ire1, ο οποίος έχει δράση τόσο πρωτεϊνικής κινάσης όσο και ενδοριβονουκλεάσης. Οι υποδοχείς GCN2 και Ire1 χρειάζονται και οι δύο να μπορούν να αναγνωρίσουν RNA και να φωσφορυλιώσουν άλλες πρωτεΐνες. Αποτελέσματα από λειτουργικά πειράματα αλλά και από ανάλυση πρωτοταγούς δομής του DNA δείχνουν ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τα λειτουργικά τμήματα των γονιδίων αυτών ανακατεύτηκαν, επιτρέποντας στα ζώα να ανταπεξέλθουν κάτω από ποικίλες συνθήκες στρες. Συγκεκριμένα οι GCN2 και Ire1 εξελίχθηκαν σε μια

οικογένεια θηλαστικών πρωτεϊνών που αποκρίνονται στο στρες, όπως φαίνεται στο (Εικόνα 1.31)..

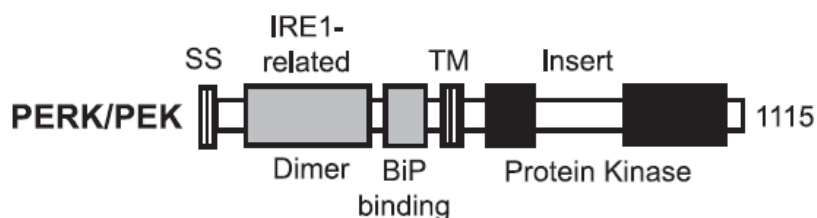
Το νεότερο μέλος αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών είναι ο υποδοχέας PERK [RNA dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase], γνωστός και ως PEK, (pancreatic eIF2 α kinase). Ο PERK συνδυάζει λειτουργικές ιδιότητες και από τους δύο υποδοχείς GCN2 και Ire1 και παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία με τις δύο ομόλογες πρωτεΐνες των θηλαστικών τις PKR και Ire1b αντίστοιχα (Εικόνα 1.31). Η περιοχή που σχετίζεται με τον Ire1b είναι πιθανόν αυτή που ανιχνεύει τις μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες, ενώ η αλληλουχία που σχετίζεται με τον PKR κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση. Με τη σύνδεση των δύο πρωτεϊνικών οικογενειών, στις οποίες συμμετέχουν οι δραστηριότητες κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης, η πρωτεΐνη PERK αντιπροσωπεύει τον χαμένο σύνδεσμο στην εξέλιξη των πρωτεϊνών που αποκρίνονται στο στρες (Εικόνα 1.31).



Εικόνα 1.31. Σχέση των πρωτεϊνών απόκρισης στο στρες του ΕΔ στη ζύμη και τα θηλαστικά [139].

Ο υποδοχέας PERK είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με περιοχές αισθητήρες του στρες στον αυλό του ΕΔ με παρόμοια δομή και λειτουργία με τον IRE1. Το κυτταροπλασματικό κομμάτι του PERK περιέχει επίσης μια περιοχή με δραστηριότητα κινάσης (Εικόνα 1.32), το οποίο υφίσταται ενεργοποίηση μέσω *trans*

αυτοφωσφορυλίωσης μετά από ολιγομερισμό του υποδοχέα. Ωστόσο αντίθετα με τον IRE1 για τον οποίο το μόνο υπόστρωμα είναι ο ίδιος ο υποδοχέας, το PERK φωσφορυλιώνει στην α υπομονάδα τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων eIF2α (eukaryotic translation initiation factor-2) στη σερίνη 51 (Ser51). Αυτή η φωσφορυλίωση αναστέλλει τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης eIF2B, το οποίο είναι ένα πενταμερές σύμπλοκο που ανακυκλώνει τον eIF2 στην ενεργή του μορφή συζευγμένη με GTP. Χαμηλά επίπεδα του ενεργού eIF2 έχουν ως αποτέλεσμα καταστολή της μεταγραφής, με επερχόμενη μείωση του φορτίου των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες προορίζονται να εισέλθουν στον αυλό του ΕΔ [140].



Εικόνα 1.32. Δομή του υποδοχέα PERK [141].

Εκτός από την καθολική μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης για τη μείωση του φορτίου πρωτεϊνών στο ΕΔ, η φωσφορυλίωση του eIF2 μέσω του PERK συμβάλλει επίσης στη μεταγραφική ενεργοποίηση στο UPR. Το προφίλ έκφρασης σε κύτταρα χωρίς το γονίδιο PERK και κάτω από την επίδραση στρες του ΕΔ έδειξε την ελλιπή επαγωγή ποικίλων mRNA που είναι υπεύθυνα για την επαγωγή του φυσιολογικού UPR [142]. Παρόμοιο ελάττωμα στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από το στρες του ΕΔ παρατηρήθηκε σε κύτταρα με μια μετάλλαξη σερίνης-αλανίνης (Ser51Ala) στο eIF2α, η οποία αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του eIF2α αλλά δεν επιδρά με άλλο τρόπο στη λειτουργία του [143].

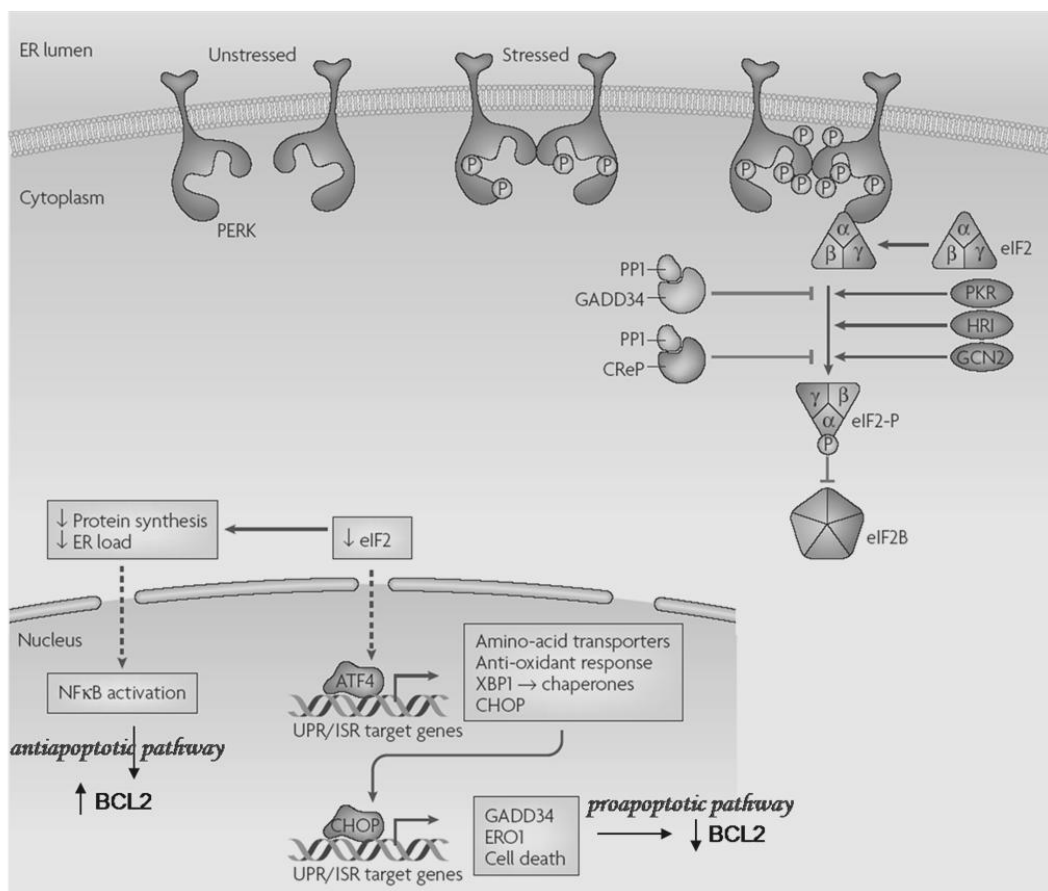
Η σύνδεση μεταξύ της φωσφορυλίωσης του eIF2α και της ενεργοποίησης της έκφρασης γονιδίων είναι διατηρημένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στη ζύμη, η φωσφορυλίωση του eIF2α από την κινάση Gcn2 (General control non-derepressible-2) οδηγεί σε μεταγραφική επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα Gcn4, ο οποίος είναι κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην έλλειψη αμινοξέων. Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *GCN4* περιέχει μικρά, ανασταλτικά ανοιχτά

πλαίσια ανάγνωσης (uORFs) τα οποία εμποδίζουν την μετάφραση των *GCN4* κωδικοποιούμενων ORF σε φυσιολογικά κύτταρα. Κάτω από συνθήκες που ελαττώνουν την δραστηριότητα του eIF2 (λόγω της φωσφορυλίωσης του eIF2α) τα ριβοσώματα παραλείπουν τα ανασταλτικά uORFs ώστε τα *GCN4* ORF να μπορούν να μεταφραστούν. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι διατηρημένο στο μεταγραφικό παράγοντα ATF4 των θηλαστικών (το ομόλογο του Gcn4 στα μετάζωα), ο οποίος επάγεται από τη φωσφορυλίωση του eIF2α [144](Εικόνα 1.32).

Σε υψηλά επίπεδα, η φωσφορυλίωση του eIF2α μπορεί να ενεργοποιήσει και το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, αλλά υπάρχουν διαφορετικές απόψεις πάνω στους μηχανισμούς που εμπλέκονται. Στη μια μελέτη, οι συνθήκες που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση του eIF2α οδήγησαν στη φυσική διάσπαση ενός ανασταλτικού συμπλόκου που περιέχει τον NF-κB [145]. Αντίθετα, άλλη μελέτη δείχνει ότι η μεταφραστική καταστολή που μεσολαβείται από τη φωσφορυλίωση του eIF2α οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα του καταστολέα του NFκB [146](Εικόνα 1.33).

Το γεγονός ότι τα κύτταρα πρέπει να ρυθμίζουν αυστηρά τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου eIF2α για να επιβιώσουν είναι υπό αμφισβήτηση. Η ενεργοποίηση του PERK από το στρες του ΕΔ είναι άμεσα αναστρέψιμη και μέσα σε λίγα λεπτά μετά την επαναφορά της ομοιόστασης στο ΕΔ, το ενεργοποιημένο PERK αποφωσφορυλιώνεται [147]. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί καθώς και οι φωσφατάσες που εμπλέκονται παραμένουν άγνωστες. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι το φωσφορυλιωμένο eIF2α υφίσταται αρνητική ρύθμιση. Μέσω γενετικών πειραμάτων σε σωματικά κύτταρα έχουν αναγνωριστεί δυο μέλη αυτής της διαδικασίας, τα οποία όταν υπερεκφραστούν, εμποδίζουν την ενεργοποίηση του PERK. Τα δύο αυτά γονίδια που αναγνωρίστηκαν είναι το *GADD34* (Growth Arrest and DNA-damage-inducible protein 34) και το *CREP* (Constitutive Repressor of eIF2a Phosphorylation), τα οποία κωδικοποιούν τις υπομονάδες δυο συμπλόκων φωσφατασών, τα οποία αποφωσφορυλιώνουν τον eIF2α ανεξάρτητα [148]. Η πρωτεΐνη CREP εκφράζεται σταθερά και συμβάλει στην αποφωσφορυλίωση του eIF2α σε βασικά επίπεδα, ενώ, η πρωτεΐνη GADD34 επάγεται ως μέρος του προγράμματος έκφρασης γονιδίων που ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση του eIF2α και συμβάλλει σε αρνητική επανατροφοδότηση [127](Εικόνα 1.33).

Η παύση του κυτταρικού κύκλου μετά το UPR συμβαίνει αρχικά στη φάση G1 [149] και προκύπτει από την ειδική απώλεια της κυκλίνης D1 μέσω αναστολής της μετάφρασής της. Όπως προκύπτει από πειραματικά δεδομένα η ενεργοποίηση του PERK είναι ικανή να μεσολαβήσει στην καταστολή της έκφρασης της κυκλίνης D1 και να προάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου [150]. Επομένως, ο υποδοχέας PERK λειτουργεί ως εγγύς ρυθμιστής της σηματοδότησης κατά το UPR, συνδέοντας το ΕΔ με τη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 1.33. Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα PERK [137].

Διασταύρωση μεταξύ των μονοπατιών του UPR

Ενώ η ενεργοποίηση των IRE1, PERK και ATF6 προχωρά ανεξάρτητα στα κύτταρα κατά την επαγωγή του στρες του ΕΔ, τα τρία μονοπάτια του UPR επικοινωνούν εκτενώς. Επιπλέον, οι μεταγραφικές δράσεις των τριών μονοπατιών του UPR αλληλεπικαλύπτονται σημαντικά, το οποίο επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω της κοινής θετικής ενίσχυσης. Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας XBP1 ενεργοποιείται μεταγραφικά από τον ATF6 [135] και από τη σηματοδότηση του

υποδοχέα PERK [151], το οποίο μπορεί να είναι υπεύθυνο για το ιδιαίτερα ελαττωματικό UPR στα κύτταρα με έλλειψη του PERK.

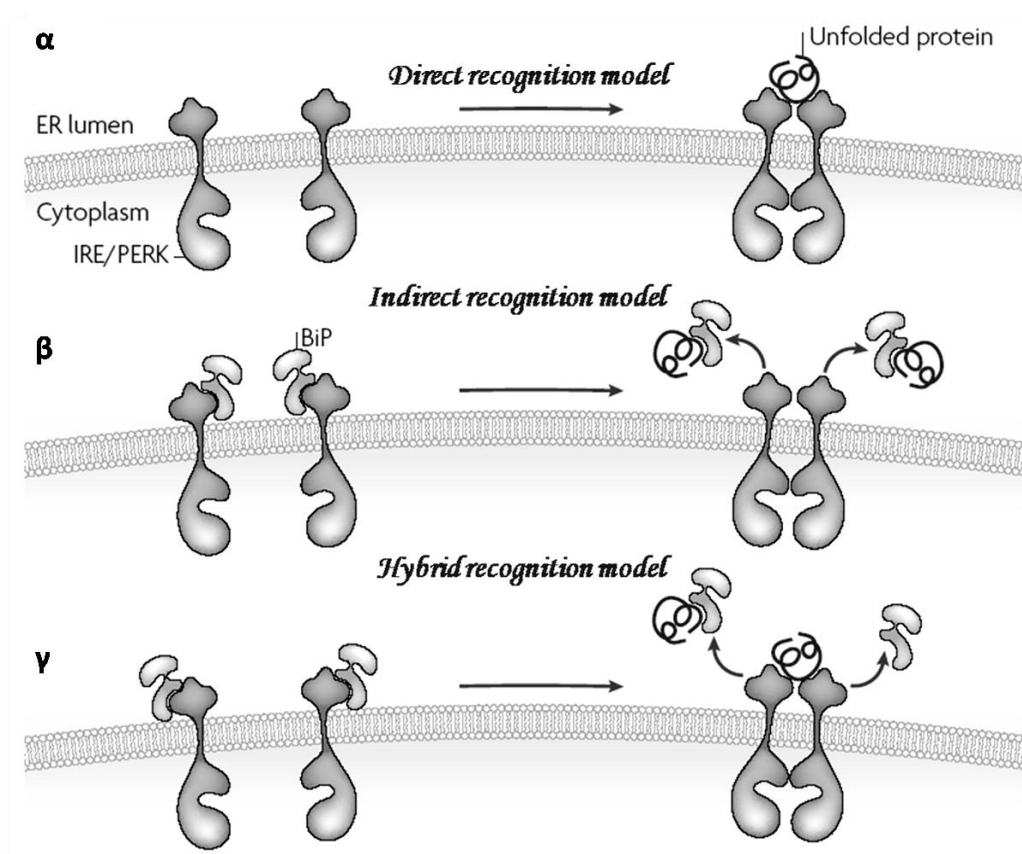
Επίσης πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το μονοπάτι PERK/p-eIF2 α /ATF4 είναι απαραίτητο όχι μόνο για τη ρύθμιση της μετάφρασης αλλά και για την ενεργοποίηση του ATF6 και των γονιδίων στόχων του, κάτι που αποδείχτηκε τόσο *in vivo* όσο και σε καλλιέργειες κυττάρων [151]. Το μονοπάτι του PERK διευκολύνει τη σύνθεση του ATF6 αλλά και τη μεταφορά του από το ΕΔ στο σύμπλεγμα Golgi για πρωτεόλυση και ενεργοποίηση [151]. Τέλος, πολλές πρωτεΐνες-συνοδοί ρυθμίζονται μεταγραφικά από μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από το UPR.

1.4.3 Αναγνώριση του στρες του ΕΔ από τους μοριακούς συνοδούς

Οι αισθητήρες του στρες του ΕΔ, IRE1 και PERK είναι οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς των οποίων η ενεργοποίηση μέσω ολιγομερισμού σχετίζεται με διαταραγμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών στο ΕΔ. Τόσο ο υποδοχέας IRE1 όσο και ο PERK περιέχουν εξελικτικά σχετιζόμενους αισθητήρες μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οι οποίοι μπορούν λειτουργικά να αντικαταστήσουν ο ένας τον άλλο και οι οποίοι εντοπίζονται στον αυλό του ΕΔ. Για τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι περιοχές διαισθάνονται το φορτίο των προβληματικών πρωτεϊνών έχουν διατυπωθεί τρία μοντέλα. Το μοντέλο άμεσης αναγνώρισης προτείνει ότι οι μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται κατευθείαν στις περιοχές των IRE1 και PERK στον αυλό του ΕΔ (Σχήμα 11, τμήμα α). Η κρυσταλλική δομή του IRE1 της ζύμης, συγκεκριμένα της περιοχής εντός του αυλού του ΕΔ, αποκάλυψε ότι το διμερές IRE1 σχηματίζει μια βαθιά αύλακα, με διαστάσεις που είναι σύμφωνες με την ικανότητα δέσμευσης ενός εκτεταμένου πεπτιδίου [152]. Η πιθανότητα της δέσμευσης του πεπτιδίου στον IRE1 (και PERK) προτείνει ότι η δέσμευση αυτή οδηγεί στον ολιγομερισμό του. Ένα εναλλακτικό μοντέλο έμμεσης αναγνώρισης προτείνει ότι η δέσμευση του μοριακού συνοδού BiP, που βρίσκεται σε αφθονία στο ΕΔ, «κλειδώνει» (σταθεροποιεί) τα IRE1 και PERK στην ανενεργή κατάσταση (Εικόνα 1.34β).

Πράγματι, σε κατάσταση ηρεμίας, και οι δύο υποδοχείς βρίσκονται σε σύμπλοκο που περιέχει το BiP. Το στρες του ΕΔ οδηγεί σε αποδέσμευση του BiP από τα σύμπλοκα αυτά προκειμένου να δεσμεύσει τις μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες στο

ΕΔ. Το μοντέλο αυτό όμως δεν εξηγεί εύκολα το πειραματικό εύρημα ότι τα αυξημένα επίπεδα του BiP δεν αναιρούν την ευαισθησία του UPR σε μικρές αλλαγές στα επίπεδα των μη διαμορφωμένων πρωτεϊνών. Επίσης, η δέσμευση του BiP δεν είναι απαραίτητη στη ρύθμιση του IRE1. Ένα τρίτο μοντέλο, υβρίδιο των δύο προηγούμενων προτείνει ότι τόσο η αποδέσμευση του BiP όσο και η δέσμευση του πεπτιδίου προκαλούν την ενεργοποίηση των υποδοχέων [137] (Εικόνα 1.34γ).



Εικόνα 1.34. Μοντέλα αναγνώρισης του στρες του ΕΔ από τους μοριακούς συνοδούς [137].

1.4.4 Στρες του ΕΔ και απόπτωση

Η ενεργοποίηση του UPR προκαλεί μια προσαρμοστική απόκριση προκειμένου το κύτταρο να ξεπεράσει τη συσσώρευση των λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, η ενεργοποίηση του UPR μπορεί να μην είναι αρκετή ώστε να ξεπεραστεί το στρες του ΕΔ και η συνεχής συσσώρευση των λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών μπορεί να επιφέρει τοξικές επιδράσεις, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Στα μεταξύα η

απόπτωση είναι μια σημαντική μορφή κυτταρικού θανάτου, που απαιτεί την ενεργοποίηση των κασπασών και τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 ώστε να εξαλειφθούν τα κύτταρα τα οποία μπορεί να είναι επιβλαβή για τον οργανισμό.

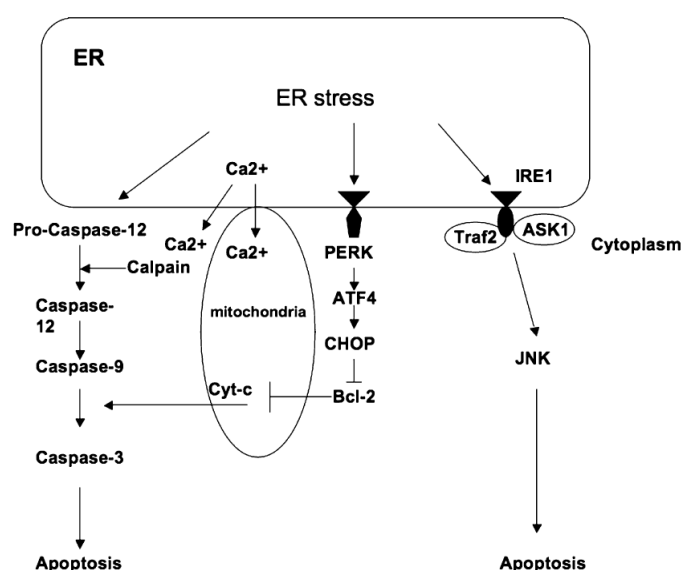
Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που βρίσκονται στο κύτταρο με τη μορφή ανενεργών πρόδρομων μορίων ή ζυμογόνων και στη συνέχεια υφίστανται πρωτεόλυση ώστε να σχηματιστούν οι ενεργές μορφές των ενζύμων που επάγουν την απόπτωση. Στα ποντίκια η πρώτη κασπάση που χαρακτηρίστηκε ως σημαντική στο πλαίσιο της επαγόμενης μέσω του στρες του ΕΔ απόπτωσης, είναι η κασπάση-12. Συγκεκριμένα κύτταρα από ποντίκια χωρίς κασπάση-12 είναι μερικώς ανθεκτικά στην μέσω του στρες του ΕΔ απόπτωση, αλλά υφίστανται κανονική απόπτωση με την επίδραση άλλων θανατηφόρων ερεθισμάτων [153]. Μετά την ενεργοποίηση της στο ΕΔ, η κασπάση-12 προκαλεί πρωτεολυτική ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και αυτή με τη σειρά της τη κασπάσης-3 [153] (Εικόνα 1.34). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 μέσω του στρες του ΕΔ μπορεί να πραγματοποιηθεί απουσία της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, το οποίο στηρίζει την ύπαρξη ενός μονοπατιού απόπτωσης ανεξάρτητου από αυτό που εξαρτάται από το μιτοχόνδριο [154] (Εικόνα 1.34).

Η ενεργοποίηση των κασπασών πραγματοποιείται επίσης μέσω των αισθητήρων του UPR και συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία κατέχει ο υποδοχέας PERK μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων ATF4 και CHOP [155]. Η απώλεια του γονιδίου *CHOP* σε κύτταρα ποντικών οδηγεί σε μείωση της απόπτωσης μέσω του στρες του ΕΔ και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης CHOP επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές [156]. Το CHOP μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα στην απόπτωση μέσω καταστολής του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 και επαγωγής του Bim, το οποίο είναι ένα προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 [156, 157] (Εικόνα 1.34). Ο υποδοχέας PERK επιπλέον συμμετέχει σε μια αντι-αποπτωτική απόκριση μέσω φωσφορυλίωσης του Nrf2, ενός μεταγραφικού παράγοντα που επάγει την επιβίωση του κυττάρου κατά το στρες του ΕΔ [158].

Ο υποδοχέας IRE1 εμπλέκεται επίσης στην απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των κινασών JNK (c-JUN N-terminal Kinase) με μηχανισμό ανεξάρτητο από αυτό της ενεργοποίησης του XBP1. Ο IRE1 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα Traf2 και ASK1 (apoptosis signal regulating kinase-1), το οποίο

φωσφορυλιώνει τη JNK και ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι σε νευρώνες που εκτέθηκαν σε στρες του ΕΔ λόγω παρουσίας υψηλών επιπέδων πολυγλουταμινικών πρωτεϊνών [159]. Συνεπώς, ο IRE1 εμπλέκεται σε δύο αποκρίσεις, ενεργοποίηση των JNK και μάτισμα του XBP1, οι οποίες ανεξάρτητα μπορούν να έχουν αντίθετη συμβολή στη ρύθμιση της απόπτωσης μέσω του στρες του ΕΔ. Μια σειρά πειραμάτων σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι το μάτισμα του XBP1 εξασθενεί σε προχωρημένα στάδια του στρες του ΕΔ, όταν επάγεται η απόπτωση και ότι η υπερέκφραση του ενεργοποιημένου XBP1 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση [160].

Η απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ παρατηρείται σε πολλές μορφές απόπτωσης και οι τοπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΕΔ και μιτοχονδρίων μπορούν να διευκολύνουν τη μεταφορά ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της απόπτωσης (Εικόνα 1.34). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, Bak και Bax απαιτούνται για επαγωγή της απόπτωσης από ποικίλα ερεθίσματα που περιλαμβάνουν το στρες του ΕΔ και ρυθμίζουν τόσο την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια όσο και την απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ [161, 162]. Επιπλέον παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι Bax και Bak δεσμεύονται στον IRE1 και χρειάζονται για το αποτελεσματικό μάτισμα του mRNA του XBP1 κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ, ανεξάρτητα από την προ-αποπτωτική τους δράση στα μιτοχόνδρια [163].



Εικόνα 1.34: Μηχανισμοί επαγωγής απόπτωσης από το στρες του ΕΔ [133].

Η απόπτωση των κυττάρων επάγεται κάτω από ισχυρό στρες του ΕΔ. Αντίθετα τα κύτταρα που εκτίθενται σε ήπιο στρες μπορούν να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν κάτω από αυτές τις συνθήκες, ακόμα και για μεγάλες περιόδους [164]. Σε συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, η απόφαση μεταξύ θανάτου και προσαρμογής στο στρες του ΕΔ εξαρτάται αρχικά από τη ένταση της ενεργοποίησης των αισθητήρων του UPR παρά από τα ειδικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται [164]. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι κάτω από είτε ήπιο ή ισχυρό στρες όλοι οι αισθητήρες του UPR ενεργοποιούνται και οδηγούν στην επαγωγή είτε προ-αποπτωτικών ή αντι-αποπτωτικών παραγόντων. Ωστόσο, σε καταστάσεις ήπιου στρες η προσαρμογή και η επιβίωση ευνοούνται, ενώ σε ισχυρό στρες ενεργοποιείται το αποπτωτικό πρόγραμμα. Πειράματα επίσης του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η πρωτεΐνη p21 παίζει κάποιο ρόλο στη μετάπτωση του στρες του ΕΔ στην προ-αποπτωτική φάση. Συγκεκριμένα, μείωση των επιπέδων της p21 που εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα CHOP φαίνεται ότι είναι απαραίτητη προϋπόθεση στο να γίνει επαγωγή της απόπτωσης, ενώ η καταστολή της p21 προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα σε παράγοντες που επάγουν στρες του ΕΔ [165].

1.5 AGEs και Στρες του ΕΔ

1.5.1 Στρες του ΕΔ και Μεταβολική Ομοιόσταση

Το ΕΔ θεωρείται ως ένα πολύπλοκο δίκτυο που εξαπλώνεται σε ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και μπορεί να εντοπίζει και να μεταδίδει σήματα που προέρχονται από οποιοδήποτε υποκυτταρικό διαμέρισμα. Εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η αποθήκευση ασβεστίου και μεταγωγή σήματος [167]. Εξειδικευμένες πρωτεΐνες μοριακοί-συνοδοί και ένζυμα που συμμετέχουν στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, όπως έχει αναφερθεί, ελέγχουν την ομοιόσταση του ΕΔ στα κύτταρα διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ της ανάγκης του κυττάρου για σύνθεση πρωτεϊνών και σωστή αναδίπλωσή τους. Παρόλα αυτά, διάφορες συνθήκες και εξωτερικά ερεθίσματα είναι ικανά να διαταράξουν το ομοιοστατικό περιβάλλον στο ΕΔ. Καταστάσεις όπως η περίσσεια θρεπτικών, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η φλεγμονή που συνήθως συνδέονται με την παχυσαρκία, επάγουν το στρες του ΕΔ, θέτοντας σε κίνδυνο την κυτταρική λειτουργία [143]. Άλλες διαταραχές που προκαλούν στρες του ΕΔ περιλαμβάνουν την διαταραγμένη ομοιόσταση του ασβεστίου, την απουσία ενέργειας ή γλυκόζης, τις αλλαγές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες, την ισχαιμία, τις μεταλλάξεις και τις λοιμώξεις από ιούς [167]. Η «αισθητηριακή» μηχανή του στρες του ΕΔ αποτελείται από τις τρεις πρωτεΐνες υποδοχείς που είναι αγκυροβολημένοι στη μεμβράνη του ΕΔ, τον PERK, τον IRE1 και τον ATF6. Κατόπιν ενεργοποίησης οι υποδοχείς αισθητήρες επάγουν έναν σηματοδοτικό καταρράκτη από το ΕΔ στον πυρήνα, το UPR. Αρκετοί καθοδικοί τελεστές ρυθμίζονται από το UPR το οποίο οδηγεί σε προσαρμοστική απόκριση, αναδραστικό έλεγχο και ρύθμιση της κυτταρικής μοίρας [168].

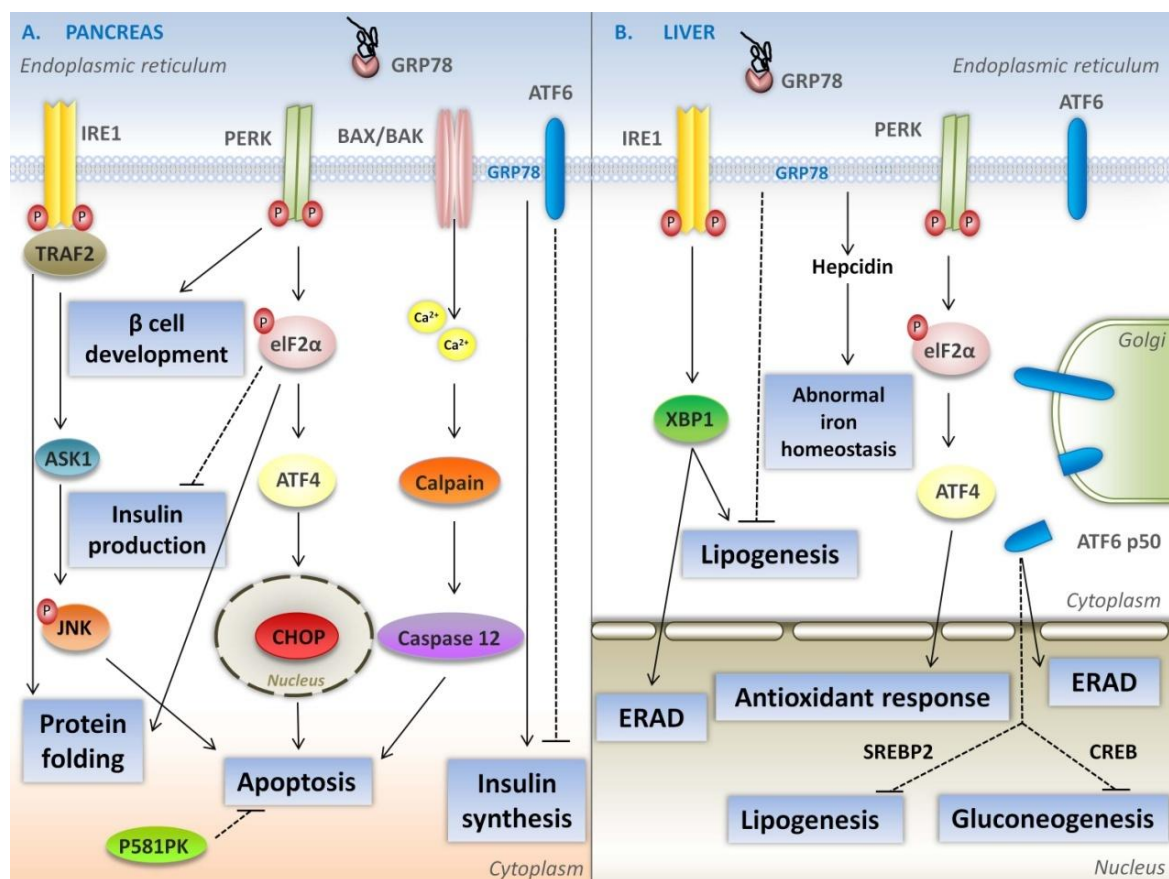
Η προσαρμογή αρχικά περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των μοριακών συνοδών και των ενζύμων αναδίπλωσης προκειμένου να επιτευχθεί ενισχυμένη δραστηριότητα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Αυτό οδηγεί στην μείωση του φόρτου εργασίας στο ΕΔ διαμέσου αποικοδόμησης του mRNA και εξασθένιση της μετάφρασης καθώς και σε αυξημένη αποικοδόμηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το ΕΔ και την εκκαθάριση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών μέσω αυτοφαγίας. Στην περίπτωση όμως, επιζήμιας υπερ-ενεργοποίησης του UPR, οι κύριοι ρυθμιστές του UPR απενεργοποιούνται μαζί με άλλα καθοδικά σηματοδοτικά μόρια ώστε να

αποφευχθούν οι βλαβερές συνέπειες [168]. Το UPR είναι γι' αυτό το λόγο, εκτός από την κυτταρική επιβίωση, υπεύθυνο για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 1.35) [166].

Πράγματι, σε καταστάσεις παρατεταμένου στρες του ΕΔ εξαιτίας είτε μακροχρόνιας έκθεσης σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης ή γενετικών μεταλλάξεων, το UPR ενεργοποιεί υποδοχείς θανάτου (death receptors) διαμέσου των ίδιων τριών αισθητήρων λειτουργώντας ως ένας «δυναδικός διακόπτης» και οδηγώντας τελικά στην απόπτωση [168].

Οι επιβλαβείς συνέπειες του ανεπίλυτου και παρατεταμένου στρες του ΕΔ όπως η διαταραγμένη ομοιόσταση του ασβεστίου, η συσσώρευση μη αναδιπλωμένων σωστά πρωτεϊνών, η απώλεια της λειτουργίας του ΕΔ και η απόπτωση έχουν συσχετισθεί με τη δημιουργία παθολογικών συνθηκών όπως η φλεγμονή, ο διαβήτης, η αθηρωμάτωση και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Η ομοιόσταση του ΕΔ είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον ανθρώπινο μεταβολισμό καθότι συντονίζει την απόκριση όλων των μεταβολικών οργάνων ρυθμίζοντας τη σύνθεση και τον καταβολισμό διάφορων θρεπτικών. Το ΕΔ ελέγχει τη σύνθεση της ινσουλίνης, την πρωτεϊνική αναδίπλωση και σύνθεση στο παγκρεατικό β-κύτταρο (Εικόνα 1.35Α). Ο μεταβολισμός της γλυκόζης περιλαμβάνει και τους τρεις κλάδους του UPR ενώ το ΕΔ εμπλέκεται στη μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων που ρυθμίζουν την γλυκόζη [169].

Πειραματικά ζωικά μοντέλα στα οποία υπήρχε ανεπάρκεια του UPR, στοχευμένη στον υποδοχέα PERK, ή μετάλλαξη που διακόπτει την φωσφορυλίωση του eIF2α έδειξαν ελαττωματική γλυκονεογένεση στο ήπαρ τους [170] και επακόλουθη κυτταρική δυσλειτουργία στις παγκρεατικές νησίδες ή κυτταρικό θάνατο που σχετίζονται με την έκπτωση της λειτουργίας του ΕΔ [171]. Επιπλέον, σε ποντίκια που εκφράζουν το θραύσμα του καρβοξυτελικού άκρου Gadd34 στο ήπαρ δείχθηκε επίσης προβληματική γλυκονεογένεση και μειωμένο ηπατικό γλυκογόνο που οδήγησαν σε προβλήματα στη διαχείριση της γλυκόζης κατά τη διάρκεια νηστείας [172]. Επιπρόσθετα, το στρες του ΕΔ διεγείρει μεταγραφικά δίκτυα τα οποία στοχεύουν γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή γλυκόζης και τη σύνθεση γλυκογόνου όπως τη συνθάση του γλυκογόνου-1, ένα στόχο του XBP1 [173].



Εικόνα 1.35: UPR-μονοπάτια στην μεταβολική ρύθμιση [166].

Ένα άλλο συστατικό της μηχανής του ΕΔ που εμπλέκεται στην παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ είναι ο υποδοχέας ATF6 ο οποίος ρυθμίζεται μέσω αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή του μεταγραφικού παράγοντα CREB (cAMP response element binding), CRTC2/TORC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2). Το στρες του ΕΔ οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση του CRTC2 και είσοδό του στον πυρήνα σε καλλιέργειες κυττάρων όπου προωθεί την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων του ΕΔ μέσω δέσμευσης στον ATF6. Η ενεργοποίηση του ATF6 ελαττώνει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ μέσω αποσύνδεσης του συμπλόκου CREB/CRTC2, αναστέλλοντας έτσι την αλληλεπίδραση του CRTC2 με υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στη γλυκονεογένεση [166].

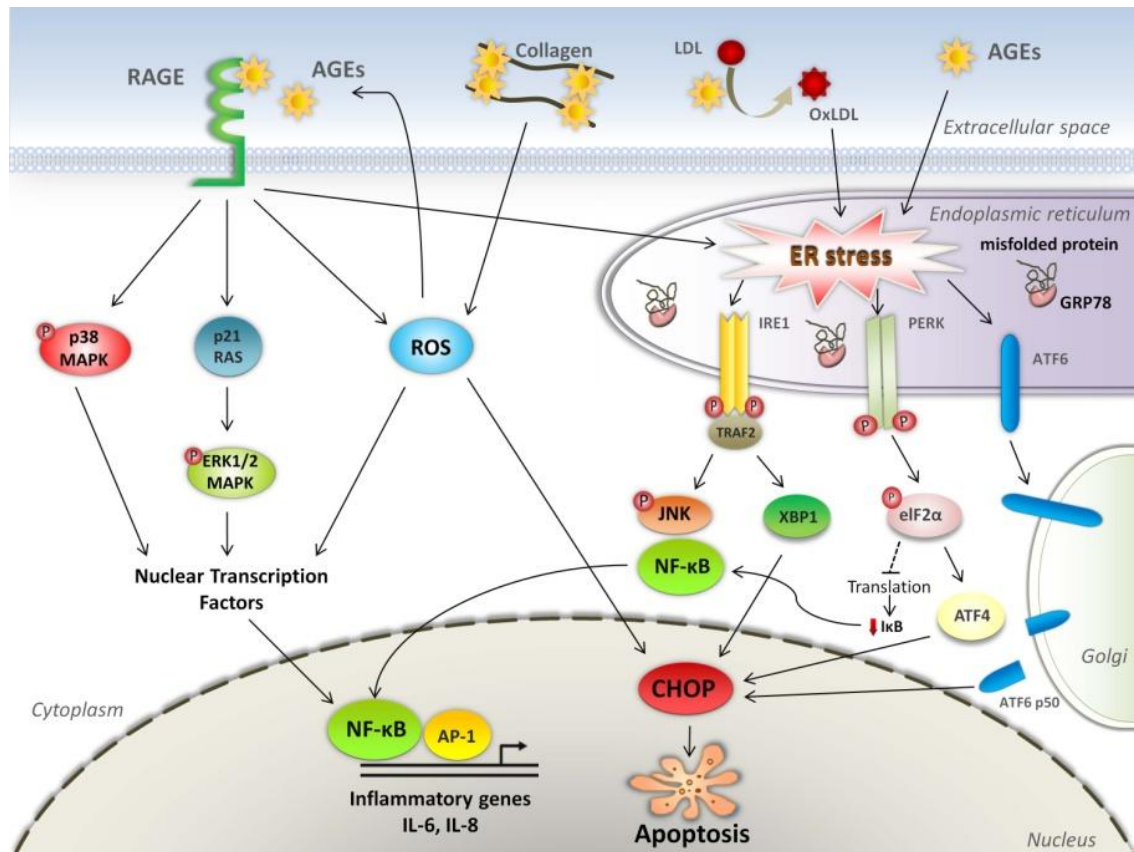
Η απόκριση του UPR εμπλέκεται επίσης στον έλεγχο της κυτταρικής λιπογένεσης καθώς το ΕΔ παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση των λιπαρών οξέων

και της χοληστερόλης. Αυτό μεσολαβείται από την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins), οι οποίοι εντοπίζονται στο ΕΔ [174]. Όταν τα επίπεδα στερολών και ινσουλίνης είναι χαμηλά οι SREBPs μετατοπίζονται στο Golgi, όπου υποβάλλονται σε επεξεργασία και ενεργοποιούνται [175]. Το στρες του ΕΔ μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση των SREBPs και έτσι να ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων που εμπλέκονται στη σύνθεση λιπιδίων (SREBP1c) ή στο μεταβολισμό της χοληστερόλης (SREBP1a, SREBP2) [176]. Το στρες του ΕΔ επίσης παρεμβαίνει στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ, σε συνδυασμό με την ομοιόσταση του σιδήρου και της γλυκόζης [166] (Εικόνα 1.35B).

Επιπλέον, το UPR συνδέεται με τη σηματοδότηση του στρες μέσω του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 και με τη φλεγμονή μέσω επαγωγής του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ [177]. Τα μονοπάτια αυτά παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στις μεταβολικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από ανώμαλη δράση της ινσουλίνης και επαγόμενη από την παχυσαρκία φλεγμονή. Η αλληλεπίδραση του στρες του ΕΔ και της φλεγμονής έχει δύο όψεις, με τους μεσολαβητές της φλεγμονής και αρκετά ενδοκυττάρια μονοπάτια να έχουν μια αρνητική συμβολή στην ομοιόσταση του ΕΔ. Η σχέση αυτή είναι εξαρτώμενη από τον κυτταρικό τύπο ενώ απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς μεσολαβητές της ευαισθησίας του κάθε κυττάρου στη φλεγμονή και την ομοιόσταση του ΕΔ.

1.5.2 Μοριακή διασυνομιλία μεταξύ σηματοδότησης των AGEs και του στρες του ΕΔ

Η προχωρημένη γλυκοζυλίωση όντας ένας βασικός ενεργοποιητής της φλεγμονώδους απόκρισης, της υποξίας και του οξειδωτικού στρες θα μπορούσε επίσης να εμπλέκεται στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ΕΔ (Εικόνα 1.36).



Εικόνα 1.36: Μοριακή διασυννομία της σηματοδότησης των AGEs και του UPR [166]

Δεδομένα που υποστηρίζουν την υπόθεση, της άμεσης επαγωγής του στρες του ΕΔ από τα AGEs προέρχονται από την πρωτότυπη μελέτη των Chen και συνεργατών [178], όπου ποδοκύτταρα από ποντίκια τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία AGEs, έδειξαν αυξημένη έκφραση του GRP78 (δείκτης του στρες του ΕΔ) και απόπτωση κατά ένα δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Η επίδραση αυτή ακολουθήθηκε από αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου και παρεμποδίστηκε από το ταυροουρσοδεοξυχολικό οξύ (taurooursodeoxycholic acid), έναν αναστολέα του ΕΔ με λειτουργία μοριακού συνοδού ο οποίος προάγει το την σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση και διακίνηση. Η αναστολή της απόπτωσης, η οποία παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας αυτόν τον αναστολέα υποδηλώνει την εμπλοκή του αποπτωτικού μονοπατιού του UPR στη μεσολάβηση των επιδράσεων των AGEs παρά την κανονική σηματοδότηση των AGEs μέσω RAGE, αποκαλύπτοντας έναν νέο σημαντικό μηχανισμό που εμπλέκεται στην διαβητική νεφροπάθεια [178]. Με ένα παρόμοιο τρόπο, όταν ανθρώπινα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εκτέθηκαν σε AGEs, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της GRP78, την οποία ακολούθησε

αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης-6 (interleukine-6, IL-6) και IL-8 (interleukine-8, IL-8). Η επίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη μεσολάβηση του RAGE, μέσω ενεργοποίησης της p38 MAP κινάσης, παρέχοντας έναν εναλλακτικό μηχανισμό ο οποίος συμβάλει στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας [179]. Μεταγενέστερες μελέτες με ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες έδειξαν ότι η δεοξυγλυκοζώνη (πρόδρομο μορφή AGE) σχετίζεται με την επαγόμενη από το στρες του ΕΔ απόπτωση. Συγκεκριμένα, το τροποποιημένο από την 3-δεοξυγλυκοζώνη κολλαγόνο τύπου I επάγει το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση διαμέσου του μονοπατιού του στρες του ΕΔ, μέσω ενεργοποίησης του CHOP, και όχι μέσω της σηματοδότησης του RAGE [180], παρέχοντας μια σύνδεση μεταξύ των AGEs και του στρες του ΕΔ στην παθογένεση των διαβητικών πληγών. Μια άλλη μελέτη σε ενδοθηλιακά κύτταρα από βόειο αορτή τα οποία επώαστηκαν με οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low-density lipoprotein, LDL) έδειξε αυξημένη έκφραση των δεικτών του στρες του ΕΔ, GRP78, p-PERK και ενεργοποιημένου ATF6 με τη μεσολάβηση της ενεργοποιημένης από AMP πρωτεϊνικής κινάσης [181]. Τα αποτελέσματα αυτά συνοδεύτηκαν από διαταραγμένη αγγειοδιαστολή του ενδοθηλίου και επακόλουθη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της ερευνητικής αυτής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) από εξωγενείς πηγές στο ενδοθήλιο καθώς και στο αναπαραγωγικό σύστημα βάσει μελέτης των ενδοκυττάρων μηχανισμών μεταγωγής σήματος των AGEs σε φυσιολογικό και παθολογικό ιστό. Συγκεκριμένα, οι στόχοι της παρούσας μελέτης περιλαμβάνουν τη διερεύνηση των πιθανών μονοπατιών της σηματοδότησης AGE-RAGE σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών και ωοθηκικών κυττάρων μετά από τη χορήγηση απομονωμένων μορφών AGEs καθώς επίσης και τη μελέτη των μονοπατιών μεταγωγής σήματος των AGEs σε παθολογικό και φυσιολογικό ενδοθηλιακό και ωοθηκικό ιστό, ασθενών με διαβήτη και σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ) που παρουσιάζουν αυξημένα ενδογενή επίπεδα αυτών των μορίων στην κυκλοφορία καθώς και αυξημένη συσσώρευση τους σε διάφορους ιστούς. Παράλληλα σκοπό της μελέτης αποτελεί η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης γονιδίων στόχων των επαγόμενων από τα AGEs μονοπατιών σηματοδότησης μέσω διερεύνησης της συμμετοχής συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τυποποιημένες κυτταρικές σειρές ενδοθηλιακής και ωοθηκικής προέλευσης αντίστοιχα:

- **HAECs** (*Human Aortic Endothelial Cells*): Ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτογενείς κυτταρικές σειρές ενδοθηλιακής και ωοθηκικής προέλευσης αντίστοιχα:

- **HUVECs** (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*): Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας
- **Κύτταρα θήκης** από ωοθήκες επίμυων (*rat theca cells*)

Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε κατάλληλο θάλαμο στειρών συνθηκών (θάλαμος νηματικής ροής) και με βάση τους προβλεπόμενους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες επιφανείας 25-75cm² ή σε μικροπλάκες καλλιέργειας, όπου αυτό ήταν απαραίτητο, σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37°C, υγρασίας 95% και 5% CO₂, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου.

Συγκεκριμένα τα HAECs προμηθεύτηκαν από την ECACC (European Collection of Cell Cultures) και καλλιεργήθηκαν σε ειδικό για ενδοθηλιακά κύτταρα θρεπτικό μέσο M200 εμπλουτισμένου με το συμπλήρωμα LSGS (Low Serum Growth Supplement) που περιέχει εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS, Fetal Bovine Serum) (2% v/v)¹, υδροκορτιζόνη (1 g/mL)¹, ανθρώπινο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (hEGF, human epidermal growth factor) (10 ng/mL)¹, βασικό αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (bFGF, basic fibroblast growth factor) (3 ng/mL)¹, ηπαρίνη (10 g/mL)¹, γενταμυκίνη (50 μg/mL)¹ και αμφοτερικίνη (50 ng/mL)¹.

Τα απομονωμένα HUVECs καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που αποτελούνταν από το βασικό θρεπτικό M199 εμπλουτισμένο με 20% θερμικά αδρανοποιημένου FBS, 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη, 0,25μg/ml

¹-Όλες οι αναφερόμενες τιμές αφορούν στην τελική συγκέντρωση των ουσιών στο θρεπτικό μέσο.

αμφοτερικίνη Β, πηγή αμινοξέων γλουταμίνη και ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, πάνω σε προ-επιστρωμένες με ζελατίνη² πλάκες καλλιέργειας.

Υλικά

- Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (L-γλουταμίνη, 4,5g/L D-γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Invitrogen)
- Medium M200 (Invitrogen)
- Low Serum Growth Supplement (Invitrogen)
- Medium McCoy's 5A (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (εμβρυϊκός βόειος ορός, Invitrogen)
- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Insulin (100ng/ml) (Lilly, Indianapolis, Indiana, USA)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (10000U/ml πενικιλίνη, 10000μg/ml στρεπτομυκίνη και 25μg/ml αμφοτερικίνη Β, Invitrogen)
- L-glutamine (100X) (200mM, L-γλουταμίνη)
- Trypsin-EDTA (0,5% w/v θρυψίνη και 0,53mM EDTA, Invitrogen)
- PBS (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ x7H₂O, Invitrogen)
- Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α, παράγοντας νέκρωσης όγκων-α)
- HEPES [σουλφονικό N-(2-υδροξυαιθυλο) πιπεραζινο-N'-2-αιθάνιο](Invitrogen)
- Human fibronectin (Sigma-Aldrich St. Louis, MO-Aldrich)
- Tunicamycin (τουνικαμυκίνη) AppliChem (Darmstadt, Germany)
- Human gelatin (Sigma-Aldrich St. Louis, MO-Aldrich)

²Προετοιμάζεται υδατικό διάλυμα ζελατίνης 0,1% στη συνέχεια αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο. Οι καλλιεργητικές επιφάνειες προ-επιστρώνονται (πχ 75άρα φλάσκα με 3 ml) και αφήνονται στο θάλαμο νηματικής ροής για 15-30 λεπτά. Αναροφάται το παραμένον υγρό και απομακρύνεται το καπάκι ώστε να στεγνώσει η επιφάνεια για άλλα 30-60 λεπτά. Η επιστρωμένη με ζελατίνη φλάσκα μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο έως 2 μήνες.

Τυποποιημένες μορφές AGEs

- Γλυοξάλη (G: Glyoxal)(Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Μέθυλο-γλυοξάλη (MG: Methylglyoxal)(Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Καρβοξυ-μεθυλ-λυσίνη (CML)
- AGE-bovine serum albumin (AGE/BSA) (Abcam, Cambridge, UK)

3.2 Απομόνωση πρωτογενών κυττάρων

3.2.1 Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs από ομφαλική φλέβα

Τα HUVECs απομονώθηκαν από φλέβα ομφαλίου λώρου μετά από επώαση με διάλυμα κολλαγενάσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Baudin και συνεργάτες [183]. Το τμήμα ομφαλίου λώρου λαμβάνεται μετά από καισαρική τομή ή μετά από φυσιολογικό τοκετό και τοποθετείται σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, Phosphate Buffered Saline), εμπλουτισμένου με αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, κολιστίνη) για την συντήρηση και τη μεταφορά του. Το διάλυμα μεταφοράς, αφού παρασκευαστεί καθώς και μετά την τοποθέτηση του τμήματος ομφαλίου λώρου, φυλάσσεται στους 4°C ενώ η διαδικασία απομόνωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιείται εντός 6 ωρών από τη λήψη του ιστού.

Τα τμήμα ομφαλίου λώρου μεταφέρεται σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου λαμβάνει χώρα η όλη διαδικασία της απομόνωσης υπό στείρες συνθήκες. Αρχικά μεταφέρεται τριβλίο με PBS όπου ξεπλένεται και απομακρύνονται οι τυχόν θρόμβοι από τη φλέβα με τη βοήθεια πλύσεων με PBS που γίνονται με τη χρήση σύριγγας από το στόμιο του αγγείου. Στη συνέχεια το τμήμα ομφαλίου λώρου δένεται με τη χρήση ράμματος πολυαμιδίου (νάιλον) από το ένα άνοιγμα και από το άλλο άνοιγμα εγχύεται διάλυμα κολλαγενάσης 0,2% στο εσωτερικό του αυλού της ομφάλιας φλέβας και ακολούθως δένεται με τη χρήση ράμματος. Το τμήμα ομφαλίου λώρου που περιέχει το διάλυμα κολλαγενάσης τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου falcon των 50ml ο οποίος περιέχει PBS και επώάζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 λεπτά.

Μετά το τέλος της επώασης αφαιρούνται τα ράμματα από το τμήμα ομφαλίου λώρου και το περιεχόμενο διάλυμα κολλαγενάσης εκπλένεται με 30 ml PBS με τη

βοήθεια σύριγγας που εφαρμόζεται στο ένα άνοιγμα του αγγείου και συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου falcon των 50ml, ο οποίος περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των HUVECs (κεφάλαιο 3.1). Στη συνέχεια το διάλυμα κολλαγενάσης με τα εκπλύματα PBS και το πλήρες θρεπτικό καλλιέργειας στο falcon φυγοκεντρώνεται στα 750 g για 10 λεπτά. Κατόπιν, το υπερκείμενο απομακρύνεται με απόχυση και τα κύτταρα μετρώνται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χρώσης Trypan Blue (Κεφάλαιο 3.3).

Τα κύτταρα από κάθε δείγμα καλλιεργούνται σε πλάκες καλλιέργειας έξι φρεατίων (εμβαδόν επιφάνειας 9.6 cm²/φρεάτιο). Σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται περίπου 40.000 κύτταρα. Οι πλάκες καλλιέργειας έχουν προεπιστρωθεί με διάλυμα φιμπρονεκτίνης προκειμένου να δημιουργηθεί ένα υπόστρωμα ώστε να ενισχυθεί η προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η επίστρωση με το διάλυμα φιμπρονεκτίνης πραγματοποιείται την προηγούμενη ημέρα της απομόνωσης των κυττάρων καλύπτοντας την επιφάνεια κάθε φρεατίου με μία σταγόνα διαλύματος φιμπρονεκτίνης και αφήνοντας στη συνέχεια να στεγνώσει κάτω από στείρες συνθήκες.

Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων, τμήμα ομφαλίου λώρου και βιοψία ωοθήκης για την απομόνωση ενδοθηλιακών και ωοθηκικών κυττάρων, θα πραγματοποιηθεί στην Β' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική (Διευθυντής Καθ. Γ. Κρεατσάς) του Αρεταίειου Νοσοκομείου σύμφωνα με προϋπάρχουσα έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Νοσοκομείου για την διδακτορική διατριβή του υποψήφιου διδάκτορα Γεώργιου Μπούτζιου (Αριθ. Πρωτοκόλλου: M-104/07/02/2008).

3.2.2 Απομόνωση κυττάρων θήκης από επίμυες (Rat theca cells).

Η απομόνωση κυττάρων θήκης επιτυγχάνεται από ωοθήκες αναπαραγωγικά ανώριμων (29 ημερών) θηλέων επίμυων Sprague-Dawley σύμφωνα με τους Duleba και συνεργάτες [184, 185]. Στους επίμυες πραγματοποιούνται καθημερινά για τρεις ημέρες (27η, 28η και 29η μέρα) υποδόριες ενέσεις 17β-οιστραδιόλης (1 mg/0.3 ml σησαμέλαιου) ώστε να είναι συγχρονιστεί η ανάπτυξη των ωοθηκών τους και η αύξηση των τριτογενών ή γραφιαανών ωοθυλακίων³. Περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία ένεση οιστραδιόλης τα ζώα αναισθητοποιούνται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση κεταμίνης-ξυλαζίνης και μετά από ενδοκαρδιακή αιμοδιάχυση με τη χρήση 0,9 % αλατούχου διαλύματος αφαιρούνται οι ωοθήκες προκειμένου να ακολουθήσει η απομόνωση των κυττάρων της θήκης μετά από επίδραση διαλύματος κολλαγενάσης. ειδική απομόνωση των κυττάρων θήκης πραγματοποιείται μέσω βελτιστοποιημένης διαδικασίας φυγοκέντρωσης σε διάλυμα διαβαθμισμένης πυκνότητας Percol. Στη συνέχεια πραγματοποιείται καλλιέργεια των κυττάρων θήκης. Οι κυτταροκαλλιέργειες αυτές πραγματοποιούνται με μέγιστη διάρκεια ζωής 48 ώρες.

- Θηλυκοί επίμυες Sprague Dawley – 27 ημερών (Ινστιτούτο Pasteur)
- Οιστραδιόλη (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Sesame oil (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Αποστειρωμένα εργαλεία ανατομής και μικροχειρουργικά εργαλεία και μικρό κομμάτι αλουμινόχαρτου, τριβλία
- M199 with Hank's Salts (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- McCoy5a (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- L-Glutamine (Invitrogen)
- Antibiotics/Antimycotics (Invitrogen)
- BSA (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

³ Το πλήρως ώριμο ωοθυλάκιο ονομάζεται τριτογενές η γραφιανό ωοθυλάκιο και είναι έτοιμο για ωορρηξία

3.3 Δοκιμασία με χρήση χρωστικής Trypan Blue

Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία αποκλεισμού κυττάρων μέσω χρώσης αποτελεί μια απλή και ταχεία μέθοδο προσδιορισμού της βιωσιμότητας κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ακέραη κυτταρική μεμβράνη η οποία αποκλείει την είσοδο συγκεκριμένων χρωστικών όπως η Trypan Blue (Κυανούν του Τρυπανίου) σε αντίθεση με τα νεκρά κύτταρα στα οποία εισέρχεται η χρωστική. Επομένως σύμφωνα με τη δοκιμασία αυτή, ένα ζωντανό κύτταρο θα έχει διαυγές κυτταρόπλασμα ενώ ένα νεκρό θα έχει μπλε κυτταρόπλασμα.

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Invitrogen)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (Invitrogen)
- PBS (Invitrogen)
- Trypsin-EDTA (Invitrogen)
- Trypan Blue (Invitrogen)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα αφού αποκολληθούν από την επιφάνεια καλλιέργειας χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης, αραιώνονται με θρεπτικό υλικό, μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου falcon όγκου 15ml και φυγοκεντρώνονται στις 1500rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1-5ml θρεπτικού. Από το κυτταρικό εναιώρημα λαμβάνονται 10μl και αναμιγνύονται με 10μl διαλύματος Trypan Blue και τοποθετούνται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer όπου μετρούνται τα ζωντανά κύτταρα στο μικροσκόπιο.

3.4 Δοκιμασία MTT

Αρχή της μεθόδου

Η τροποποιημένη μέθοδος του MTT στηρίζεται στη παρατήρηση ότι το κίτρινο άλας τετραζολίου [3-(4,5-dimethylthiazolyl -2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ανάγεται από μεταβολικώς ενεργά κύτταρα λόγω της δράσης της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης των μιτοχονδρίων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός αδιάλυτων μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και διαλυτοποιούνται με την προσθήκη ισοπροπανόλης. Οι κρύσταλλοι αυτοί παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε φάσμα 500-600nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 690nm. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η μεταβολική ενεργότητα των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση μπορεί να εκτιμηθεί η ζωτικότητα των κυττάρων.

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Invitrogen)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (Invitrogen)
- PBS 1X (Invitrogen)
- Διάλυμα εργασίας
 - 250ml DMEM phenol red free (Invitrogen)
 - 1ml NaHCO₃ 7,5% w/v
 - 2,5ml NEA (Invitrogen)
 - 2,5ml HEPES 1M (Invitrogen)
 - 5mg L-γλουταμίνη (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- 5 mg/ml Thiazolyl blue C₁₈H₁₆N₅SBr (MTT) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Ισοπροπανόλη (Merck)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πηγάδια μικροπλάκας καλλιέργειας 96-θέσεων, με αρχική πυκνότητα 1000 κύτταρα/πηγάδι σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά από 8 ώρες το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς ορό FBS και τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθεται ο ορός

ποντικίων και στα δείγματα μάρτυρες προστίθεται FBS. 48 ώρες αργότερα, το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS και προσθήκη 100μl διαλύματος MTT (παρασκευάζεται με προσθήκη 0,05g αντιδραστηρίου MTT σε 8ml διαλύματος εργασίας και 2ml PBS). Μετά την επώαση 3 ωρών στους 37°C, απομακρύνεται το υπερκείμενο των κυττάρων, διαλυτοποιούνται οι κρύσταλλοι φορμαζάνης με 100μl ισοπροπανόλης και μετράται η οπτική πυκνότητα (απορρόφηση) σε μήκος κύματος δοκιμής 550nm (OD_{550nm}) και μήκος κύματος αναφοράς 690nm (OD_{690nm}) με φωτόμετρο Hitachi U-2000.

3.5 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Invitrogen)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (Invitrogen)
- PBS (Invitrogen)
- Trypsin-EDTA (Invitrogen)
- Αναστολείς πρωτεασών
 - Μείγμα αναστολέων πρωτεασών 100x (Protease inhibitor Cocktail kit, Thermo Scientific)
 - 1mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)
- Αναστολείς φωσφατασών
 - 2,5mM sodium pyrophosphate,
 - 50mM NaF (sodium fluoride)
 - 1mM β-glycerophosphate,
 - 1mM Na₃VO₄ (sodium orthovanadate)
- Διάλυμα RIPA (Thermo Scientific)
 - 25mM Tris-HCl (pH 7,6)
 - 150mM NaCl
 - 1% NP-40
 - 1% Δεοξυχολικό νάτριο
 - 0,1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται διάλυμα θρυψίνης για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, η θρυψίνη απενεργοποιείται με την προσθήκη ίσης ποσότητας θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS και τα κύτταρα αφού αποκολληθούν φυγοκεντρούνται στις 1000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε 100μl διαλύματος RIPA στο οποίο έχει προστεθεί το μίγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών και αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά. Το κυτταρικό εκχυλίσμα που προκύπτει φυγοκεντρείται στις 14000rpm για 10 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο διατηρείται στους -20°C για άμεση χρήση ή στους -80°C για μακροπρόθεσμη χρήση. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης του κυτταρικού εκχυλίσματος γίνεται με τη βοήθεια της μεθόδου Bradford (Κεφάλαιο 3.8).

3.6 Απομόνωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Η απομόνωση του κυτοσολικού και πυρηνικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Schreiber και συνεργάτες (Schreiber, Matthias, Muller, & Schaffner, 1989). Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν περίπου $0.5-1 \times 10^6$ κύτταρα από την καλλιέργεια των PDL κυττάρων, εκλούστηκαν με 10ml TBS (+10mM NaF) (Tris Buffered Saline) και φυγοκεντρήθηκαν. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml TBS (+10mM NaF), μεταφέρθηκε σε σωλήνες eppendorf και ιζηματοποιήθηκε ξανά με φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα. Μετά την αφαίρεση του TBS, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 400μl παγωμένου εξισορροπητικού διαλύματος (buffer A), το οποίο περιείχε 10 mM HEPES pH 7.9; 10mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0.5 mM PMSF. Τα κύτταρα αφέθηκαν στον πάγο για 15 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε αν 25μl διαλύματος 10% Nonidet NP-40 και το ομογενοποίημα αναδεύτηκε για 10 δευτερόλεπτα. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο διάλυμα που περιείχε το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο και το RNA μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωληνάκι. Ακολούθησε αποθήκευση στους -80°C έως ότου γίνει ο περαιτέρω καθαρισμός του RNA.

3.7 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Το πυρηνικό ίζημα από το κεφάλαιο 3.7 επαναιωρήθηκε σε 50μl ενός τρίτου παγωμένου buffer C (20mM HEPES pH 7.5; 0.4 M NaCl; 20% Glycerol; 2mM MgCl₂; 30mM NaF; 0,1mM Na₃VO₄; 2 mM DTT; 2 mM PMSF; 5μg/ml aprotinin, 2μg/ml leupeptin) και το σωληνάκι ανακινήθηκε περιστροφικά για 30 λεπτά στους 4oC με ταυτόχρονη ανάδευση σε vortex ανά 5 λεπτά. Το πυρηνικό απόσταγμα φυγοκεντρήθηκε στα 15000 x g στους 4°C για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -80°C.

3.8 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι η μέγιστη απορρόφηση του όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει από μήκος κύματος 465nm σε 595nm όταν δεσμεύεται σε πρωτεϊνικά μόρια. Χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ουσία αλβουμίνη από βόειο ορό (Bovine Serum Albumin, BSA) κατασκευάζεται γραμμική καμπύλη αναφοράς αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης σε σχέση με την απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 595nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη και την εξίσωση που προκύπτει από αυτή, μπορούμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του υπό εξέταση δείγματος με βάση την τιμή της απορρόφησης που δίνει στα 595nm, όταν επωαστεί με το διάλυμα της χρωστικής. Για κάθε δείγμα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που υπολογίζεται πολλαπλασιάζεται με την αρχική αραίωση που έγινε σε αυτό.

Υλικά

- Αντιδραστήριο Bradford: Χρωστική G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Quick Start Bradford Dye Reagent 1x, Biorad)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκέντρωση 2mg/ml

Περιγραφή της μεθόδου

Σε σωλήνες τύπου eppendorf όγκου 1,5ml παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης συγκεντρώσεων 0μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 750μg/ml, και 1000μg/ml, 1500μg/ml και 2000μg/ml. Από κάθε ένα από τα

διαλύματα αυτά μεταφέρονται 20μl σε νέο erpendorf όπου προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται μέσα σε διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, κατά τη διάρκεια της οποίας το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική παραμένει σταθερό. Αφού πραγματοποιηθεί η πρότυπη καμπύλη, τα πρωτεϊνικά δείγματα αραιώνονται 1:10 (τελικός όγκος 20μl) με δις απιονισμένο νερό και στο διάλυμα αυτό προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford. Ως τυφλό δείγμα για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται διάλυμα RIPA-αναστολέων (Κεφάλαιο 3.7) αραιωμένο (1:10) με δις απιονισμένο νερό τελικού όγκου 20μl και 1ml αντιδραστηρίου Bradford.

3.9 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis-PAGE) χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μιας ουσίας που περιέχει ελεύθερες ρίζες, π.χ. υπερθειϊκό αμμώνιο (απαρχητής) και ενός καταλύτη, π.χ. TEMED που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Τελικά οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂, αφού αυτό δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να σταματάει η δημιουργία πηκτής.

Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης και την πηκτή διαχωρισμού, οι οποίες έχουν διαφορετικό μέγεθος πόρων, pH και ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός και σύγκριση της κινητικότητας των πρωτεϊνών.

Με την SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Το SDS συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS. Στα σύμπλοκα αυτά ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός, όλα τα σύμπλοκα αποκτούν αρνητικό φορτίο και η κινητικότητά τους στην πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσου των πόρων της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Συνήθως, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, π.χ. 2-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT, για το διαχωρισμό όλων των υπομονάδων. Γενικά, η μετακίνηση των πρωτεϊνών προς την άνοδο κατά την SDS-PAGE είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου της μοριακής τους μάζας. Με τη χρησιμοποίηση έτσι δεικτών μοριακών βαρών και τον υπολογισμό της σχετικής κινητικότητάς τους στην πηκτή είναι δυνατή η εκτίμηση της μοριακής μάζας μιας άγνωστης πρωτεΐνης.

Υλικά

- Διάλυμα ακρυλαμιδίου-δισακρυλαμιδίου 30%w/v (Biorad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl 1,5M pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοιβάξης Tris-HCl 0,5M pH 6,8
- N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθανο-1,2-διαμίνη (TEMED) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Υπερθειϊκό αμμώνιο (AmmoniumPerSulfate-APS) 0,1g/ml
- Διάλυμα θειοδωδεκυλικού νατρίου (SDS) 10%w/v
- Αποδιατακτικό διάλυμα SDS 5x (150mM Tris, 6% SDS, 0.3% μπλε της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη και 15% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης :
25mM Tris (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

192mM γλυκίνη (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

1% SDS (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

Περιγραφή της μεθόδου

Με βάση τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2) ετοιμάζονται οι πηκτές διαχωρισμού (separating gel, 12% ακρυλαμίδιο) και επιστοιβαξης (stacking gel, 5% ακρυλαμίδιο) και τοποθετούνται μεταξύ των πλακών σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πάχους 0,75mm. Αρχικά προστίθεται η πηκτή διαχωρισμού μέχρι ύψους 0,5cm κάτω από τις εγκοπές της χτένας και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αφού πρώτα καλυφθεί με 1ml ισοπροπανόλη προκειμένου να αποκλειστεί το οξυγόνο που θα εμποδίσει τον πολυμερισμό. Στη συνέχεια αφού πολυμεριστεί η πηκτή διαχωρισμού και απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται η πηκτή επιστοιβαξης και τοποθετείται η πλαστική χτένα που επιτρέπει το σχηματισμό 10 πηγαδιών στην ήδη πολυμερισμένη πηκτή επιστοιβαξης και αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά.

	Πηκτή διαχωρισμού 12%	Πηκτή επιστοιβαξης 5%
30% ακρυλαμίδιου- Δισακρυλαμίδιου	4 ml	0,83 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5ml	-
0,5M Tris pH 6,8	-	2,5ml
ddH ₂ O	3,3ml	1,57ml
10% SDS	100μl	50μl
TEMED	10μl	5μl
APS (0,1g/ml)	100μl	50μl

Πίνακας 3.1 Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοιβαξης

Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά δείγματα ίσης συγκέντρωσης, όπως έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο Bradford (Κεφάλαιο 3.8), αναμειγνύονται με αναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα SDS σε αναλογία όγκου 5:1 αντίστοιχα. Ακολουθεί θέρμανση

στους 95°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 14000rpm. Τα υπερκείμενα καθώς και ο δείκτης μοριακών βαρών φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που έχει παρασκευασθεί και ηλεκτροφορούνται στα 90-130Volt.

3.10 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Αρχή της μεθόδου

Τα μετουσιωμένα πολυπεπίδια, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά με SDS-PAGE μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Στο αποτύπωμα μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των πρωτεϊνών (αντιγόνων) έμμεσα. Αρχικά χρησιμοποιείται ένα μη-σημασμένο αντίσωμα ειδικό έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο, το οποίο είναι συζευγμένο με κατάλληλο ιχνηθέτη συνήθως ένα ένζυμο όπως π.χ υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horse-Radish Peroxidase, HRP) ή αλκαλική φωσφατάση, ικανό να μετατρέψει το υπόστρωμα σε ανιχνεύσιμο φωτεινό σήμα με φωτογραφικά/απεικονιστικά μέσα.

Υλικά

- Πρωτογενή αντισώματα:
 - πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της PC-2 (G-20) (Santa Cruz Bt)
 - πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής (GFP, Green Fluorescent Protein)
 - μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ακτίνης (C-4)(Chemicon)
- Δευτερογενή αντισώματα:
 - αιγός έναντι ποντικού συζευγμένου HRP (Millipore)
 - αιγός έναντι κουνελιού συζευγμένου HRP (Millipore)
 - όνου έναντι αιγός συζευγμένου HRP (Santa Cruz Bt)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBST pH 7,5 :
 - 20mM Tris (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
 - 150mM NaCl

0,05% Tween-20

- Διάλυμα μεταφοράς :

25mM Tris (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

192mM γλυκίνη (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

20% μεθανόλη (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

- Διάλυμα γάλακτος (0% λιπαρά) 5% σε TBST ρυθμιστικό διάλυμα
- ECL Kit (Pierce): Χημειοφωταυγές υπόστρωμα για την υπεροξειδάση, με το οποίο εμποτίζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε αναλογία 125μl ανά 1cm² μεμβράνης. Παρασκευάζεται με την ανάμιξη ίσων όγκων (1ml) σταθερού διαλύματος υπεροξειδάσης και διαλύματος ενίσχυσης.
- Διαλύματα εμφάνισης (developer) και μονιμοποίησης (fixer) φωτογραφικού φιλμ (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Φωτογραφικό φιλμ (KODAK)

Περιγραφή της μεθόδου

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, τόσο το πήκτωμα όσο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένονται στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται ως εξής: Τοποθετούνται στη σχετική συσκευή μεταφοράς με προσανατολισμό από την κάθοδο (μαύρη επιφάνεια) προς την άνοδο ένα ακρυλικό σφουγγαράκι, δύο κομμάτια χαρτιού Whatman στο μέγεθος της πηκτής, η πηκτή, η μεμβράνη, δύο ακόμη κομμάτια χαρτιού Whatman και ένα ακόμη ακρυλικό σφουγγαράκι. Τέλος, η συσκευή εμβυθίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού 90V για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία 4°C.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος σε TBST για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να παρεμποδιστούν όλες οι μη-ειδικές αντιγονικές θέσεις. Ακολουθούν η επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση που προτείνει ο κατασκευαστής σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST υπό ανακίνηση για 16 περίπου ώρες στους 4°C. Ακολουθούν πλύσεις με TBST (4 φορές από 10 λεπτά) και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση που προτείνει ο κατασκευαστής σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά από πλύσεις με διάλυμα TBST (3 φορές από 10 λεπτά), η μεμβράνη επωάζεται για 2 λεπτά με (βασισμένο στην λουμινόλη) χημειοφωταυγές υπόστρωμα του ενζύμου HRP, καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με επώαση πρώτα στο διάλυμα εμφάνισης και έπειτα στο διάλυμα μονιμοποίησης και τέλος έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για την ημι-ποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώνονται και κατόπιν αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Image-J, <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/index.html>).

3.11 Ανοσοδοκιμασία τύπου ELISA που βασίζεται σε κύτταρα (CASE-kit)

Πρωτόκολλο για την μέτρηση του βαθμού ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στόχων με τη χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA που βασίζεται σε κύτταρα (Case kit, CASETM Cellular Activation of Signaling ELISA). Προηγείται προσεκτικός πειραματικός σχεδιασμός, που περιλαμβάνει δύο σειρές από κύτταρα σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Η μία θα επωαστεί με το ειδικό αντίσωμα για την φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης (phospho-protein specific Ab) και η άλλη με το ειδικό αντίσωμα για την ολική πρωτεΐνη (pan protein specific Ab).

CASE-kit: Cellular Activation of Signaling ELISA

A. Προετοιμασία κυττάρων

1. Στρώσιμο κυττάρων $1,5-2,0 \times 10^4$ /well στην μικροπλάκα καλλιέργειας (96well) με προσθήκη 100μl θρεπτικού μέσου. Περιλαμβάνονται:

- Blank wells (χωρίς κύτταρα)
- Detection control wells (κύτταρα επώαση μόνο με δευτερογενές Ab)
- Experimental control wells (κύτταρα χωρίς πειραματική επεξεργασία)

2. Καλλιέργεια για 18-24h (37°C - επωαστήρα).

3. Μονιμοποίηση κυττάρων (προσκολλημένα κύτταρα):

Προσεκτική απομάκρυνση του θρεπτικού και προσθήκη 100μl - 4% Cell Fixing Buffer/well (Για να αποφευχθεί η εξάτμιση της φορμαλδεΐδης καλύπτεται η πλάκα με παράφιλμ και σκεπάζεται με το καπάκι της). Στο στάδιο αυτό τα

μονιμοποιημένα κύτταρα μπορούν να μην χρησιμοποιηθούν αλλά μπορούν αφού καλυφθούν με πάραφιλμ να αποθηκευτούν για αρκετές εβδομάδες στους 4°C.

4. Απομάκρυνση του Cell Fixing Buffer και πλύσεις δύο φορές των κυττάρων με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).

5. Απομάκρυνση του Washing Buffer, προσθήκη 100μl από Quenching Buffer και επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Απομάκρυνση του Quenching Buffer και πλύση των κυττάρων μία φορά με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).

7. Απομάκρυνση του Washing Buffer, προσθήκη 100μl από 1×Antigen Retrieval Buffer. Τοποθέτηση με το καπάκι ανοιχτό της πλάκας μέσα σε φούρνο μικροκυμάτων. Θέρμανση της πλάκας στα 375 Watts για 3 min (υπολογίζουμε από τον συνολικό αριθμό των Watts). Απομακρύνουμε προσεκτικά την πλάκα από τον φούρνο, την καλύπτουμε με το καπάκι και την αφήνουμε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Απομάκρυνση του Antigen Retrieval Buffer και πλύση των κυττάρων μία φορά με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).

9. Απομάκρυνση του Washing Buffer, προσθήκη 100μl από Blocking Buffer και επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.

B. Επώαση με το πρωτογενές και το δευτερογενές αντίσωμα

1. Απομάκρυνση του Blocking Buffer και πλύση των κυττάρων μία φορά με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).

2. Απομάκρυνση του Washing Buffer, προσθήκη 50μl από αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα (είτε το phosphor-protein specific Ab είτε το pan protein specific Ab) στο αντίστοιχο well. Στους αρνητικούς μάρτυρες (detection control wells) γίνεται προσθήκη αντί του πρωτογενούς αντισώματος 50μl Andibody Dilution Buffer.

3. Επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος και πλύση των κυττάρων δύο φορές με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).

5. Απομάκρυνση του Washing Buffer, προσθήκη 100μl από αραιωμένο δευτερογενές αντίσωμα σε κάθε well και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Εντωμεταξύ γίνεται μεταφορά της αναγκαίας ποσότητας από Developing Solution (100μl ανά well) σε ένα καθαρό σκαφίδιο (Washing Buffer Reservoir) και αφήνεται να ζεσταθεί σε θερμοκρασία δωματίου ενώ προστατεύεται από το φως.

Γ. Φωτομετρικός προσδιορισμός:

1. Απομάκρυνση του δευτερογενούς αντισώματος πλύση των κυττάρων δύο φορές με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking). Στη συνέχεια πλύση των κυττάρων μία φορά με 200μl από PBS διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).
2. Απομάκρυνση του PBS, προσθήκη 100μl από Developing Solution σε κάθε well. Προστασία της πλάκας από το φως. Επώαση από 1 έως 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Παρακολούθηση της ανάπτυξης του μπλε χρώματος μέχρι το εντονότερα βαμμένο well να είναι μέτριο προς σκούρο μπλε (medium to dark blue).
4. Προσθήκη 100μl από του Stop Solution σε κάθε well ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Το Stop Solution μετατρέπει το μπλε χρώμα σε κίτρινο.
5. Μέσα σε 5min μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm.

Δ. Καθορισμός του Σχετικού Αριθμού Κυττάρων:

1. Απομάκρυνση των διαλύματος της δοκιμασίας και πλύση των κυττάρων μια φορά με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking). Στη συνέχεια πλύση των κυττάρων μία φορά με 200μl από dH₂O διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking). Προσεκτική απομάκρυνση κάθε υγρού με ήπιο ανάποδο χτύπημα της πλάκας πάνω σε στοίβα από χαρτί. Στέγνωμα στον αέρα για 5min
2. Προσθήκη 100μl από το Cell Staining Buffer (διάλυμα χρώσης κυττάρων) σε κάθε well και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Ξέπλυμα της πλάκας δύο φορές με 200μl από dH₂O και πλύση των κυττάρων δύο φορές με 200μl από 1×Washing Buffer διάρκειας 5min με ανακίνηση (rocking).
4. Προσθήκη 100μl από 1% SDS σε κάθε well και επώαση σε αναδευτήρα (rocker) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Διάβασμα της απορρόφησης στα 595nm σε ELISA Plate Reader.
6. Κανονικοποίηση της απορρόφησης του αντισώματος με τον σχετικό αριθμό κυττάρων: Διαίρεση των μετρήσεων στα 450nm για κάθε well προς τις μετρήσεις στα

$$\frac{595\text{nm για το κάθε well.}}{\text{OD450 / OD595 για κάθε well}}$$

7. Για να διαπιστωθεί ο σχετικός βαθμός της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης στόχου γίνεται κανονικοποίηση του λόγου OD450 / OD595 για το phosphor-protein specific Ab με τον λόγο OD450 / OD595 για το pan protein specific Ab για την ίδια πειραματική συνθήκη.

$$\frac{\text{OD450 / OD595 για το phosphor-protein specific Ab}}{\text{OD450 / OD595 για το pan protein specific Ab}}$$

- ▶ Το νόμμερο που προκύπτει είναι και το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στόχου στην περίπτωση μας δηλαδή της Erk1/2 και της cJUN
- ▶ Δηλαδή είναι ο συντελεστής της σχετικής φωσφορυλίωσης που μας δείχνει τον βαθμό της ενεργοποίησης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

3.12 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με τη χρήση της τυποποιημένης δοκιμασίας RNeasy (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.13 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Το RNA υποβάλλεται σε σύνθεση ενός κλώνου cDNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης AMV (Avian Myeloblastosis Virus, AMV), η οποία είναι μία RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία συνθέτει τον ένα cDNA κλώνο από το υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, στο οποίο πρώτα έχουν υβριδοποιηθεί τα τυχαία

συνθετικά μόρια εκκινητών. Το παραγόμενο cDNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί περαιτέρω μέσω PCR (Κεφάλαιο 3.13).

Υλικά

- Διάλυμα τυχαίων εκκινητών σε συγκέντρωση 300ng/μl (Promega)
- Δείγματα ολικού RNA με συγκέντρωση 0,4ng/μl έως 1000ng/μl
- Μείγμα dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) με συγκέντρωση 2,5mM στο καθένα (Promega)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X (Promega)
- Αναστολέας ριβονουκλεάσης (RNase inhibitor) με συγκέντρωση 40U/μl (Invitrogen)
- Αντίστροφη μεταγραφή AMV με συγκέντρωση 200U/μl (Promega)

Περιγραφή της μεθόδου

1. Σε ένα μικροσωλήνα τύπου eppendorf όγκου 0,5ml προστίθενται τα αντιδραστήρια του μίγματος A που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2).

Μίγμα A	Όγκος
Διάλυμα τυχαίων εκκινητών	1μl
Δείγμα ολικού RNA	2μl
ddH ₂ O αποστειρωμένο	7μl

Πίνακας 3.2 Σύσταση μίγματος A

2. Το δείγμα θερμαίνεται στους 70°C για 5 λεπτά με στόχο να αποδιαταχθούν όλες οι μη-μονόκλωνες αλυσίδες RNA και στη συνέχεια ψύχεται στους 4°C απότομα για 5 λεπτά.

3. Στη συνέχεια στο ίδιο eppendorf προστίθεται το μίγμα B σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3) και ακολουθεί ήπια ανάμιξη. Ο συνολικός όγκος του δείγματος ανέρχεται πλέον σε 25μl.

Μίγμα Β	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα 5X (Promega)	5μl
dNTPs	2,5μl
Αναστολέας ριβονουκλεάσης	1μl
AMV	1μl
ddH ₂ O αποστειρωμένο	5,5μl

Πίνακας 3.3 Σύσταση μίγματος Β

4. Στο τελευταίο στάδιο το δείγμα θερμαίνονται στους 37°C για 1 ώρα ώστε να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση και στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται με επώαση στους 70°C για 10 λεπτά. Ακολουθεί ενίσχυση του cDNA μέσω PCR (Κεφάλαιο 2.13) χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές.

3.14 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική PCR συνίσταται στην επιλεκτική ενίσχυση τμήματος DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας με τη χρήση ειδικών συνθετικών ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδίων που ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι απόλυτα συμπληρωματικοί με τις δύο μονόκλωνες αλυσίδες εκμαγείου DNA. Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση εισαγωγής θέσης περιορισμού στα προϊόντα της αντίδρασης PCR οπότε και η συμπληρωματικότητα των εκκινητών με τις δύο αλυσίδες του υποστρώματος δεν είναι 100%. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης PCR είναι δίκλωνο DNA, του οποίου τα άκρα καθορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και θα περιλαμβάνει και την μεταξύ τους απόσταση. Επιπλέον, προϊόντα λίγο μεγαλύτερου μεγέθους παράγονται σε αμελητέα, όμως, ποσότητα καθώς δεν πολλαπλασιάζονται εκθετικά όπως συμβαίνει με την αλληλουχία στόχο. Η αντίδραση PCR συνίσταται σε επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τα παρακάτω τρία (3) στάδια:

1. Θερμική αποδιάταξη των αλυσίδων του υποστρώματος DNA σε θερμοκρασία 95°C για 30 έως 60 δευτερόλεπτα.

2. Υβριδισμός των μορίων εκκινητών στους συμπληρωματικούς κλώνους του υποστρώματος DNA, που πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών 52°C -64°C.

3. Επιμήκυνση των εκκινητών και αντιγραφή του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί, που λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία 72°C.

Τα παραπάνω στάδια θέρμανσης-ψύξης επαναλαμβάνονται πολλές φορές (28-40 κύκλοι) με σκοπό τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA. Πριν από τους θερμικούς κύκλους υπάρχει ένα κοινό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 3 λεπτά και μετά την ολοκλήρωσή τους υπάρχει ένα επίσης κοινό στάδιο επιμήκυνσης των παραγόμενων προϊόντων στους 72°C για 10 λεπτά. Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται σε θερμικό κυκλοποιητή και το ευρέως χρησιμοποιούμενο ένζυμο είναι η Taq πολυμεράση η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση έχει μέγιστη απόδοση στους 72°C και ο χρόνος ημιζωής της είναι 40 λεπτά στους 95°C.

Το ένζυμο αντιγράφει το DNA με ταχύτητα περίπου 1000 βάσεις ανά λεπτό. Το διάλυμα της αντίδρασης εκτός από το υπόστρωμα DNA περιέχει το ζεύγος εκκινητών, το μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα για διατήρηση σταθερού pH, ιόντα Mg⁺² και την Taq πολυμεράση.

Τα ακόλουθα σημεία είναι κρίσιμα για την επιτυχία της τεχνικής PCR:

A) Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα DNA, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των εκκινητών και την περιεκτικότητά τους σε ζεύγη γουανίνης και κυτοσίνης. Είναι σημαντικό να μην είναι πολύ χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών διότι σε αυτή την περίπτωση ευνοείται η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων πολυμερισμού. Αντίθετα μια θερμοκρασία πολύ υψηλότερη βέλτιστης για ένα δεδομένο ζεύγος εκκινητών είναι πιθανό να μην οδηγήσει σε παραγωγή προϊόντος πολυμερισμού.

B) Η επιλογή του χρόνου επιμήκυνσης των εκκινητών κατά το τρίτο στάδιο να κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 30-60 δευτερολέπτων ανάλογα με την απόσταση μεταξύ των εκκινητών και επομένως με το μέγεθος του προϊόντος πολυμερισμού.

Γ) Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης να περιορίζεται στους ελάχιστους απαραίτητους, με σκοπό την αποφυγή λαθών κατά την αντιγραφή και παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

Δ) Η αρχική ποσότητα του DNA να κυμαίνεται μεταξύ 10-500ng ανάλογα με την καθαρότητά του και τον αριθμό των αντιγράφων του τμήματος προς ενίσχυση.

Ε) Η τελική συγκέντρωση του $MgCl_2$ να κυμαίνεται μεταξύ 1mM και 8mM. Τα ιόντα Mg^{2+} είναι σημαντικά για την ειδικότητα της υβριδοποίησης των εκκινητών με το υπόστρωμα DNA και την απόδοση του ενζύμου.

ΣΤ) Οι εκκινητές να έχουν μήκος 17-30 βάσεις (σε ειδικές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιούνται εκκινητές μήκους μέχρι και 60 βάσεων) και η τελική τους συγκέντρωση να κυμαίνεται από 0,1μM έως 1μM. Είναι απαραίτητο να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα ζευγών γουανίνης-κυτοσίνης 50-60%, να μην έχουν συμπληρωματικότητα κυρίως στα 3' άκρα τους προς αποφυγή σχηματισμού ολιγομερών και τέλος να μην εμφανίζουν δευτεροταγείς δομές.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής PCR συνίστανται στο ότι είναι δυνατή η αναγνώριση της αλληλουχίας-στόχου ακόμα και όταν το αρχικό εκμαγείο DNA βρίσκεται σε μικρή ποσότητα ή περιορισμένη καθαρότητα (π.χ. ιστοί εγκλεισμένοι σε παραφίνη), στην ευαισθησία, στην ακρίβεια, στο μικρό κόστος, στην ευκολία και στην ταχύτητά της συγκριτικά με άλλες τεχνικές κλωνοποίησης.

Οι ιδανικές συνθήκες της αντίδρασης π.χ. θερμοκρασίες και χρόνοι επώασης, συγκεντρώσεις της Taq πολυμεράσης, του μίγματος των εκκινητών, των ιόντων Mg^{2+} και του υποστρώματος DNA) ποικίλλουν και χρειάζονται βελτιστοποίηση για κάθε ξεχωριστή αντίδραση.

Υλικά

- Εκκινητές (primers), αρχικής συγκέντρωσης 5μM (Invitrogen)
- Taq DNA πολυμεράση (GoTaq® Flexi DNA polymerase) σε συγκέντρωση 5U/μl, μη ανασυνδιασμένη, τροποποιημένη μορφή της Taq DNA πολυμεράσης η οποία δεν έχει 5'→3' εξονουκλεοτιδική δραστηριότητα (Promega)
- 25mM $MgCl_2$ (Promega)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X Green GoTaq® Flexi Buffer 5X (Promega)
- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) σε αρχική συγκέντρωση 2mM (Promega)

Περιγραφή της μεθόδου

Σε φιαλίδιο τύπου erpendorf 0,5ml προσθέτονται τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.4) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Μίγμα PCR	
ddH ₂ O	10,6μl
MgCl ₂ (25mM)	1,2μl
Buffer (5x)	4μl
dNTPs (2mM)	2μl
Primers (5μM)	1μl
Taq polymerase (5U/μl)	0,2μl
DNA	1μl
Σύνολο	20μl

Πίνακας 3.4 Σύσταση μίγματος PCR

Τα αντιδραστήρια αναδεύονται με τη βοήθεια μικροπιπέτας για να εξασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου ενώ όλη η διαδικασία διεξάγεται σε θερμοκρασία 4°C για να αποφύγουμε πρόωμη έναρξη της αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται στους -20°C. Οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου καθώς και ο αριθμός των κυκλικών επαναλήψεων) διαφοροποιούνται ανάλογα με την νουκλεοτιδική αλληλουχία που ενισχύεται, όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 3.5.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Αριθμός κύκλων
BiP	BIP-S	TAGCGTATGGTGCTGCTGTC	241	60	25
	BIP-AS	TTTGTCAGGGGTCTTTCACC			
CHOP	CHOP-S	AGTGCCACGGAGAAAGCTAA	209	55	36
	CHOP-AS	CCATACAGCAGCCTGAGTGA			
ATF4	ATF4-S	AACCGACAAAGACACCTTCG	674	60	25
	ATF4-AS	AGGGATCATGGCAACGTAAG			
GRP94	GRP94-S	TGGGAAGAGGTTCCAGAATG	220	60	25
	GRP94-AS	GTTGCCAGACCATCCGTACT			

(S: sense, AS: antisense)

Πίνακας 3.5 Εκκινητές και βέλτιστες συνθήκες PCR

3.15 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθοδολογίας

Τα πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA καθώς και προϊόντα της τεχνικής PCR διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Η επιλογή της συγκέντρωσης της αγαρόζης καθορίζεται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν και συγκεκριμένα, η συγκέντρωσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους των τμημάτων DNA.

Υλικά

- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Διάλυμα TBE 10X (Tris, βορικό οξύ και δινάτριο EDTA) pH 8
- 10 mg/ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, Promega)
- Δείκτης μοριακών βαρών του DNA (DNA ladder, Promega): 100bp ή 1kb

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 2% διαλύονται 2g αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι τη θερμοκρασία βρασμού ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Το διάλυμα τοποθετείται σε εκμαγείο οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφού τοποθετηθούν τα ειδικά χτενάκια που δημιουργούν τις θέσεις προσθήκης του δείγματος, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα του DNA (προϊόντα PCR, πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA) μαζί με διάλυμα φόρτωσης αν χρειάζεται. Παράλληλα με τα δείγματα DNA φορτώνεται και δείκτης μοριακών βαρών. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό ηλεκτρικού ρεύματος. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι θερμοκρασία δωματίου, 100 Volts, 30 mA, 30 λεπτά. Οι ζώνες του DNA είναι ορατές χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβαλλόμενο ανάμεσα στους κλώνους του DNA γίνεται ορατό με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας

3.16 Ποσοτική PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR GREEN

Υλικά

- Εκκινητές (primers), αρχικής συγκέντρωσης 5μM (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) (Πίνακας 3.6)
- 2x SYBR® Green PCR Master Mix

Περιγραφή μεθοδολογίας

Σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων προστίθενται τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.6) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Μίγμα ποσοτικής PCR	
2x SYBR® Green PCR Master Mix	12,5μl
Primers (5μM)	1,5μl
cDNA (500ng)	10μl
ddH ₂ O	1
Σύνολο	25μl

Πίνακας 3.6. Σύσταση μίγματος ποσοτικής PCR

Ρυθμίζεται το παρακάτω πρόγραμμα στη real time PCR Applied Biosystems

1. 10min/95°C
2. 15sec/95°C
3. 1min/60°C

Επανάληψη των βημάτων 2-3 για 40 κύκλους

Ακολουθεί καμπύλη τήξεως :

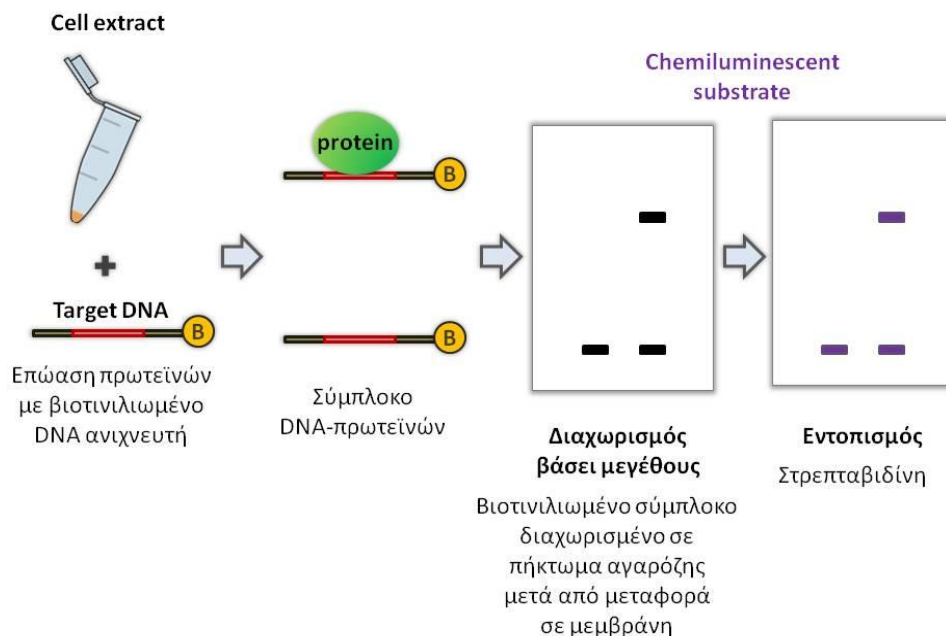
1. 15sec/95°C
2. Θέρμανση από 60°C μέχρι 95°C με ρυθμό 2°C ανά λεπτό

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Delta-Delta Ct (M.W. Pfaff Nucleic Acids Res. 2001, 29(9):e45) και τον παρακάτω τύπο που προκύπτει (Τύπος Pfaffl) :

$$\text{Ratio} = \frac{2^{\text{D}Ct_{\text{γονίδιο στόχος}}(\text{control-δείγμα})}}{2^{\text{D}Ct_{\text{γονίδιο αναφοράς}}(\text{control-δείγμα})}}$$

3.17 Δοκιμασίας μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA)

Η τεχνική της δοκιμασίας μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας ή EMSA (Electro-Mobility Shift Assay) είναι μια *in vitro* δοκιμασία έλεγχου πρόσδεσης πρωτεϊνών στο DNA η οποία χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση περιοχών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων.



Εικόνα 3.1 Σχηματική παρουσίαση της δοκιμασίας της EMSA

Η EMSA βασίζεται στην ελαττωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα του συμπλόκου DNA-πρωτεΐνης συγκρινόμενο με ελεύθερο DNA. Αποτελεί, δηλαδή, μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με το DNA και το RNA. Με τη διαδικασία αυτή γίνεται δυνατός ο έλεγχος πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης (π.χ. μεταγραφικού παράγοντα) σε μια αλληλουχία DNA ή RNA (Εικόνα 3.1).

Η ανάλυση κινητικότητας είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεΐνης-DNA σε γέλη πολυακρυλαμίδης. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα διαφορετικά μόρια (και συνδυασμοί τους) ανάμεσα στη γέλη καθορίζεται από το μέγεθος και το φορτίο, καθώς επίσης και μερικώς από το σχήμα τους. Η λωρίδα ελέγχου (DNA κλώνος χωρίς την παρουσία πρωτεΐνης) θα περιέχει μια μονάχα ζώνη που αντιστοιχεί στο μη προσδεμένο DNA. Όμως, υποθέτοντας ότι η πρωτεΐνη είναι δυνατόν να προσδεθεί στο κομμάτι DNA, η λωρίδα με την πρωτεΐνη θα περιέχει ακόμα μια ζώνη που εκπροσωπεί ένα μεγαλύτερο και λιγότερο κινητικό σύμπλοκο, αυτό του κλώνου του νουκλεϊκού οξέος στο οποίο έχει προσδεθεί η πρωτεΐνη και το οποίο είναι μετατοπισμένο ψηλότερα στη γέλη (αφού κινείται πιο αργά).

Η δέσμευση πρωτεΐνης-μεταγραφικού παράγοντα με το σεσημασμένο DNA ανιχνευτή γίνεται *in vitro* στους 20°C για 20 λεπτά. Τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-DNA που δημιουργούνται όταν τεθούν κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε πήκτωμα ακρυλαμίδης μεταναστεύουν πιο αργά από ότι τα ελεύθερα τμήματα DNA ή δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Η αλληλεπίδραση παραγόντων μεταγραφής και DNA πιστοποιείται αυτοραδιογραφικά με την εμφάνιση ζώνης-επάρματος στο πήκτωμα που έχει διανύσει μικρότερο διάστημα από ότι το ελεύθερο τμήμα του DNA (probe). Η ειδικότητα της δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής στη συγκεκριμένη αλληλουχία DNA αποδεικνύεται με πειράματα «ανταγωνισμού» και προσθήκη αντισώματος. Συγκεκριμένα, πυρηνικές πρωτεΐνες επωάζονται με μοριακή περίσσεια μη σεσημασμένου DNA, ίδιας και διαφορετικής ειδικότητας με τον σημασμένο με βιοτίνη ανιχνευτή πριν τη προσθήκη του σημασμένου ανιχνευτή. Η περίσσεια του ειδικού ψυχρού ανιχνευτή θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δέσμευσης του ειδικού θερμού (εξαφάνιση ζώνης συμπλόκου), ενώ η περίσσεια του μη ειδικού δεν θα αναστείλει τη δέσμευση (παραμονή ζώνης συμπλόκου). Η περαιτέρω πιστοποίηση του συμπλόκου γίνεται με την προσθήκη του ειδικού για τον μεταγραφικό παράγοντα αντισώματος, το οποίο ανάλογα με τη στερεοδιάταξη του συμπλόκου, είτε

μετατοπίζει το σύμπλοκο της πρωτεΐνης-DNA ψηλότερα στη γέλη ή μειώνει σημαντικά τη ζώνη του συμπλόκου (εάν το αντίσωμα συνδέεται στην περιοχή σύνδεσης του DNA στην πρωτεΐνη).

3.17.1 Προσθήκη βιοτίνης στο 3' άκρο των ανιχνευτών

Αρχικά, σημαίνουμε με βιοτίνη στο 3' άκρο (Biotin 3' End DNA Labeling Kit-PIERCE) το τμήμα του DNA που αντιστοιχεί στη θέση δέσμευσης του υπό μελέτη μεταγραφικού παράγοντα (π.χ. NF-κB ή AP-1). Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιεί την τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-TdT) ώστε να ενσωματώσει 1-3 βιοτινυλιωμένα ριβονουκλεοτιδία στο 3' άκρο του DNA κλώνου.

Υλικά

- 5x TdT Reaction buffer
- TdT
- Biotin-11-dUTP
- Μη σημασμένο ανιχνευτή ως μάρτυρα
- Σημασμένο ανιχνευτή ως μάρτυρα
- Νερό μεγάλης καθαρότητας
- 1μM ανιχνευτή προς σήμανση
- 0.2M EDTA, pH 8.0
- Χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24:1)

Περιγραφή της μεθόδου

Για την EMSA βιοτινυλιώνουμε και τους 2 κλώνους DNA χωριστά.

Συγκεκριμένα:

1. Αραιώνουμε 1/5 το TdT σε 1x TdT reaction buffer σε τελική συγκέντρωση 2U/μl.
2. Προετοιμάζουμε την αντίδραση σήμανσης όπως φαίνεται στον πίνακα:

Συστατικό	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Νερό ultrapure	25μl	---
5x TdT Reaction Buffer	10μl	1X
DNA ανιχνευτής	5μl	5pmol
Biotin-11-dUTP (5μM)	5μl	0.5 μM
Αραιωμένο TdT (2U/μl)	5μl	0.2 U/μl
Συνολικός όγκος	50μl	---

3. Επωάζουμε την αντίδραση στους 37°C για 30 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 2.5μl 0.2M EDTA για να σταματήσει η αντίδραση.
5. Προσθέτουμε 50μl χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης για την αφαίρεση του TdT. Ανακινούμε προσεκτικά, φυγοκεντρούμε 2 λεπτά σε υψηλή ταχύτητα ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις και κρατάμε την ανώτερη φάση.
6. Αναμειγνύουμε ίσες ποσότητες από τους 2 σημασμένους συμπληρωματικούς κλώνους και τους αφήνουμε να αποδιαταχθούν για ένα λεπτό στους 90°C και στη συνέχεια να συνενωθούν συμπληρωματικά σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

3.17.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Κατόπιν, αφού έχουμε απομονώσει τα πυρηνικά εκχυλίσματά μας και μετρήσει το ποσό της πρωτεΐνης των δειγμάτων μας, σε στείρο φιαλίδιο τύπου erpendorf προσθέτουμε κατά σειρά τα ακόλουθα:

- 10 x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (*Binding Buffer*)(1x στον τελικό όγκο) (PIERCE)
- 100ng/μl *poly dIdC* (SIGMA-ALDRICH ST. LOUIS, MO)
- 50% γλυκερόλη (2.5% στον τελικό όγκο)
- 1% NP-40 (0.05% στον τελικό όγκο) (PIERCE)
- 200mM EDTA (PIERCE)
- 10μg πυρηνικής πρωτεΐνης (δείγμα)
- *Inhibitor mix* (NaF+DTT+PIC+NA₃VO₄+PMSF)

- προσθέτουμε με *d.H2O* μέχρι *Vτελ.* = 20μl.

Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται η σεσημασμένη με βιοτίνη δίκλωνη DNA αλληλουχία 50fmol στον τελικό όγκο (NF-κB ή AP-1 DNA probe). Η δέσμευση πρωτεϊνών-σεσημασμένου DNA γίνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος της επώασης προσθέτουμε 5μl διάλυμα φόρτωσης πηκτής (gel loading buffer) και τοποθετούμε τα δείγματά μας προσεκτικά στα φρεάτια της πηκτής του ακρυλαμιδίου (5% χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες).

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων TBE, αρχικά παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 10 φορές συγκεντρωμένο, δηλαδή:

- 10.8 gr Tris-Base
- 5.5gr Boric acid
- 0.83gr EDTA
- ddH2O έως τα 100ml

Πήκτωμα διαχωρισμού 5%: Σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml προστίθενται με τη σειρά τα ακόλουθα:

- 2ml διάλυμα ακρυλαμίδιο-δισ-ακρυλαμίδιο (30% / 0.8%)
- 1.2ml TBEx10
- 150μl APS 10%
- 20μl TEMED
- 8.8ml ddH2O

Αραιώνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10 φορές με ddH2O, φορτώνουμε τα δείγματα μας στα πηγαδάκια του πηκτώματος και εφαρμόζουμε ρεύμα σταθερής έντασης 35mA για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού δούμε στη γέλη ότι gel loading buffer έχει μετατοπιστεί κατά τα 2/3 του μήκους της γέλης, ξεκινάμε τη διαδικασία της μεταφοράς των συμπλόκων σε ειδικό χαρτί νιτροκυτταρίνης με τρόπο παρόμοιο με αυτόν της τεχνικής Western blot αλλά χρησιμοποιούμε και πάλι TBEx1 ως ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Στοιβάζουμε με τη σειρά (sandwich) τα ακόλουθα στην πλευρά της καθόδου της κασέτας μεταφοράς:

- Σπόγγο διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς (TBEx1)
- 2 χαρτιά Whattman No3
- Πήκτωμα (gel)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης
- 2 χαρτιά Whattman No3
- Σπόγγο διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς

Ρυθμίζουμε την ηλεκτροφορητική συσκευή στα 100V , 380mA για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Στη συνέχεια τοποθετούμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που περιέχει τα συμπλέγματά μας σε UV-light για 10-15 λεπτά ώστε να μονιμοποιηθούν οι δεσμοί πρωτεΐνης και DNA (cross-linking). Έπειτα γίνεται έκλυση της μεμβράνης με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (Blocking Buffer) (PIERCE) κάλυψης των ελευθέρων θέσεων καθώς και με διάλυμα που περιέχει Streptavidin-Horseradish Peroxidase conjugate αραιωμένο κατά 1:3000 για 15 λεπτά (PIERCE). Ακολουθούν τέσσερις πεντάλεπτες πλύσεις με καθαριστικό διάλυμα (wash buffer) και μία τελική πλύση με Substrate Equilibration Buffer για 5 λεπτά (PIERCE).

Η ανίχνευση των δεσμευμένων στο DNA πρωτεϊνών πραγματοποιείται με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας προσθέτοντας στη μεμβράνη ίσες ποσότητες Luminol/Enhancer solution και Stable Peroxide solution (PIERCE). Τα συμπλέγματα πρωτεϊνών/DNA τελικά αποτυπώθηκαν ως ζώνες αμαύρωσης σε ευαίσθητο φωτογραφικό film Kodak.

Παρατηρήσεις μεθόδου:

Το dIdC το χρησιμοποιούμε για την αποφυγή δέσμευσης μη ειδικών μορίων στις θέσεις δέσμευσης του υπό μελέτη παράγοντα.

NaF: Αναστολέας φωσφατασών

DDT: Προστατεύει τις SH-ομάδες, μειώνει τη δημιουργία δισουλφιδίων

PIC: Περιέχει πεπτατίνη, λευπεπτίνη και απροτινίνη οι οποίες αναστέλλουν τις πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης και ασπαρτικού.

Na3VO4: Αναστέλλει τη δράση των ATPασών και τις φωσφατάσες της τυροσύνης

PMSF: Αναστέλλει τις πρωτεάσες σερίνης και κυστεΐνης.

3.17.3. Ποσοτικοποίηση και εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Η ποσοτικοποίηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα ImageJ software με το οποίο υπολογίστηκε και συγκρίθηκε η ένταση και το μέγεθος των αποτυπωμένων ζωνών αμαύρωσης στο φωτογραφικό φιλμ.

3.18 Ανοσοϊστοχημεία

Υλικά

- Ευλόλη, αιθανόλη (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Διάλυμα ανάκτησης αντιγονικών επιτόπων Tris/EDTA pH 9.0 (Target Retrieval Solution 3-in-1, Dako)
- Πρωτεΐνάση-K (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)
- Υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (w/w) 30% (H₂O₂) (Applichem)
- Πρωτογενή αντισώματα:
 - έναντι του RAGE, AGEs, LOX, ET-1 (Santa Cruz Bt)
- Δεξτράνη συζευγμένη με μόρια HRP και μόρια δευτερογενούς αντισώματος αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού/ποντικού (Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse) (Dako)
- Χρωμογόνο 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB) (Dako)
- Αιματοξυλίνη (Applichem)
- Μέσο στερέωσης

Περιγραφή της μεθόδου

Ιστικές τομές πάχους 5μm θερμάνθηκαν σε κλίβανο στους 59°C για 30 λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση της παραφίνης. Αφού εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε διαλύματα ξυλόλης και αιθανόλης 100%, 96%, 80% και 70% τοποθετήθηκαν, μετά την ενυδάτωση, σε φούρνο μικροκυμάτων (95-97°C) μέσα σε διάλυμα Tris/EDTA pH 9.0 (Target Retrieval Solution 3-in-1, Dako) για την ανάκτηση των αντιγονικών επιτόπων όσον αφορά στην PC-1. Για την PC-2, η ανάκτηση πραγματοποιήθηκε με

διάλυμα πρωτεΐνάσης K στους 37°C για 20 λεπτά. Ακολούθησε επώαση σε διάλυμα H₂O₂ 3% για την αναστολή δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης και εφαρμογή των πολυκλωνικών πρωτογενών αντισωμάτων στους 4°C για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε δευτερογενές αντίσωμα με τη μέθοδο Envision για 30 λεπτά και, ακολούθως, το χρωμογόνο DAB. Οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης και αφυδατώθηκαν κατά σειρά σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 80%, 96% και 100% και τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης. Η μονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε με υλικό μονιμοποίησης και τοποθέτηση καλυπτρίδων. Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

3.19 Κυτταρομετρία ροής

Υλικά

- Διάλυμα PBS
- Διάλυμα 1% (w/v) παραφορμαλδεύδης σε PBS
- Διάλυμα 1% (w/v) Triton-X100 σε PBS
- Διάλυμα 5% (v/v) FBS σε PBS
- Πρωτογενή αντίσωματα:
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι του υποδοχέα RAGE (Fitzerald)
 - πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της LOX (Santa Cruz Bt)
 - πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ET-1 (Santa Cruz Bt)
- Δεύτερογενη αντίσωματα:
 - έναντι κουνελιού συζευγμένου με φθοριόχρωμα Texas Red (Santa Cruz Bt)
 - έναντι ποντικού συζευγμένου με φθοριόχρωμα FITC (Santa Cruz)
 - έναντι αιγός συζευγμένου με φθοριόχρωμα FITC (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)

Περιγραφή μεθοδολογίας

48 ώρες μετά τη διαμόλυνση με το πλασμίδο *PKD2-pEGFP-N1* τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μονιμοποιήθηκαν σε παραφορμαλδεύδη 1% (20 λεπτά, 20°C),

επώστηκαν με διάλυμα 5% FBS (20 λεπτά, 20°C) και ακολούθως με διάλυμα διαπερατότητας 1% Triton-X100 (20 λεπτά, 20°C). Έγινε επώαση για μία ώρα με τα πρωτογενή αντισώματα έναντι της RAGE, της LOX και της ET-1. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με τα δευτερογενή, συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα, αντισώματα. Η απόκτηση και ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο τύπου FACSCalibur μέσω του λογισμικού CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.20 Στατιστική ανάλυση

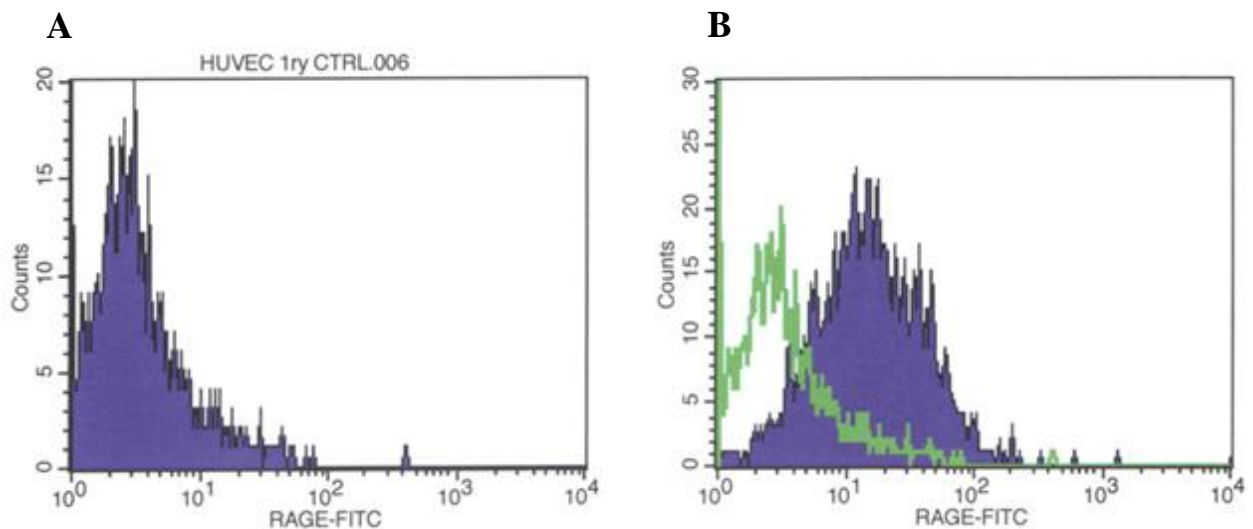
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το Student's T-test ή two-tailed t test και τα αποτελέσματα που προέκυψαν αξιολογήθηκαν ως στατιστικώς σημαντικά όταν $p < 0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε HUVECs

Έκφραση του RAGE στην επιφάνεια των HUVECs

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε πως ο υποδοχέας RAGE εκφράζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων HUVECs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1B.



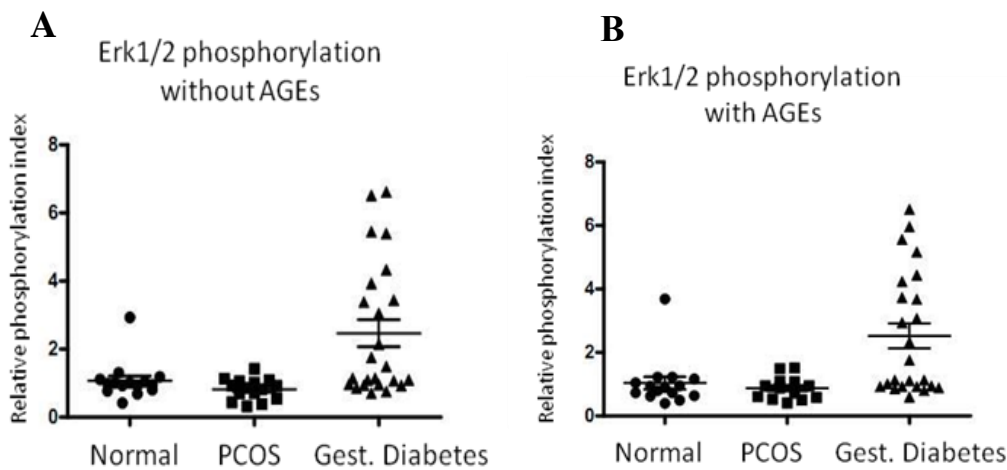
Εικόνα 4.1: Έλεγχος μέσω κυτταρομετρίας ροής της έκφρασης του RAGE στην μεμβρανική επιφάνεια των HUVECs: **A.** Συνολικός πληθυσμός των HUVECs **B.** Πληθυσμός των κυττάρων HUVECs που εκφράζουν τον RAGE.

Στο αρχικό στάδιο της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η επίδραση των AGEs σε φυσιολογικά και παθολογικά ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω χορήγησης AGE-BSA. Πραγματοποιήθηκε για το σκοπό αυτό μελέτη της ενεργοποίησης/φωσφορύλιωσης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού των AGEs, των MAP-κινασών ERK1/2 και την c-JUN σε καλλιέργειες HUVECs προερχόμενων από φυσιολογικές γυναίκες καθώς και προερχόμενων από γυναίκες με ΣΠΩ και Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II (Πίνακας 4.1). Η ανάλυση αυτή έγινε με τη χρήση της τυποποιημένης ανοσοδοκιμασίας τύπου ELISA που βασίζεται σε κύτταρα (CASE-kit) (Κεφάλαιο 3.11)

Φυσιολογικά	ΣΠΩ	Διαβήτης Κύησης
15	15	24

Πίνακας 4.1: Ο συνολικός αριθμός δειγμάτων HUVECs που μελετήθηκαν ήταν 54. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία two-tailed t test.

Ι) Ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση της ERK1/2 με ή χωρίς AGEs

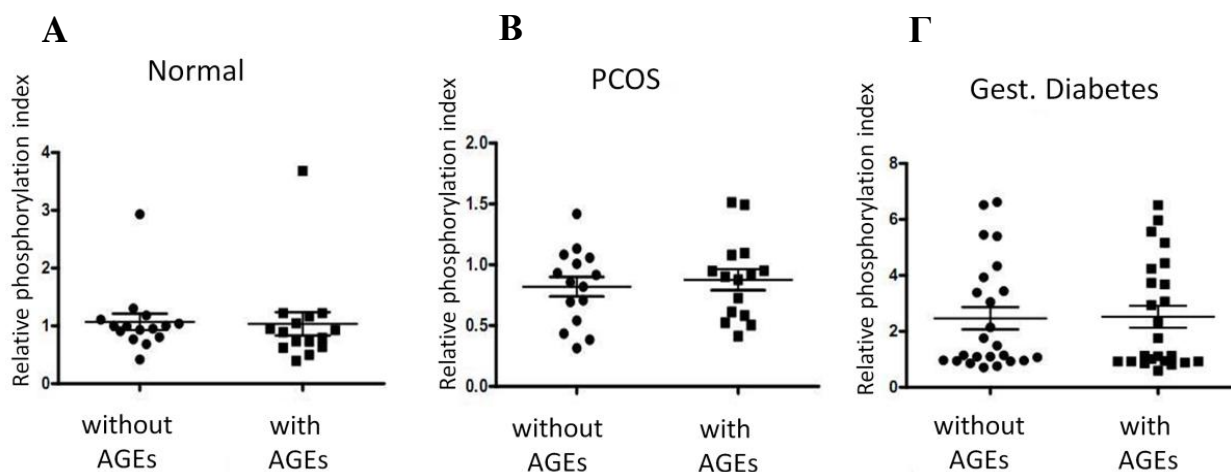


Εικόνα 4.2: Διαγράμματα του συντελεστή σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ERK1/2 σε HUVECs φυσιολογικών γυναικών (Normal), γυναικών με ΣΠΩ (PCOS: polycystic ovary syndrome) ή διαβήτη κύησης (Gest. Diabetes) χωρίς (A) ή με την παρουσία AGE-BSA (B).

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,0105$) μεταξύ των ομάδων των φυσιολογικών γυναικών και αυτών με διαβήτη κύησης καθώς και μεταξύ της ομάδας με ΣΠΩ και με διαβήτη κύησης ($p=0,0026$) ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$) μεταξύ των ομάδων των φυσιολογικών και γυναικών με ΣΠΩ. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,0071$) παρατηρήθηκε μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με διαβήτη κύησης καθώς και μεταξύ γυναικών με ΣΠΩ και γυναικών με διαβήτη κύησης ($p=0,0023$) ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά

σημαντική διαφορά ($p>0,05$) μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με ΣΠΩ (Εικόνα 4.2).

II) Συγκριτική ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση της ERK1/2 με και χωρίς AGEs

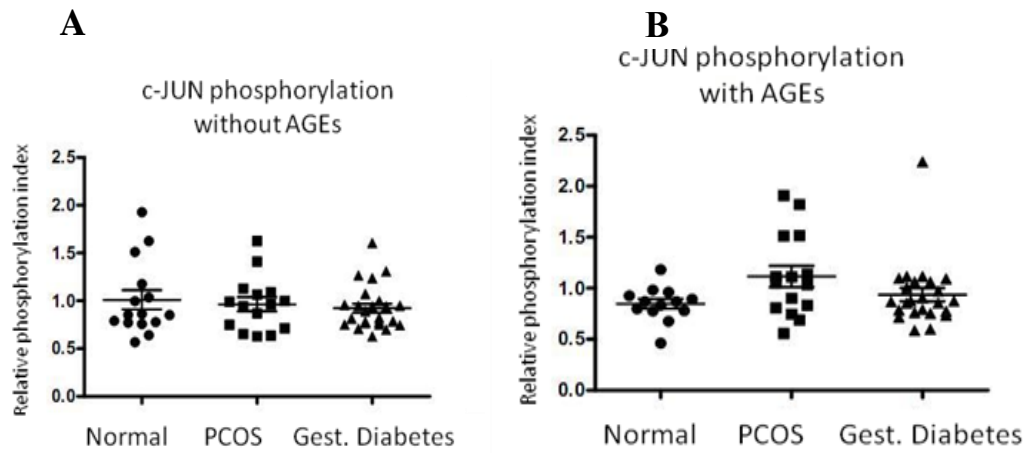


Εικόνα 4.3: Συγκριτικά διαγράμματα των συντελεστών σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ERK1/2 χωρίς (without AGEs) ή με την παρουσία AGE-BSA (with AGEs) σε HUVECs φυσιολογικών γυναικών (Normal) (A), γυναικών με ΣΠΩ (PCOS) (B) ή διαβήτη κύησης (Gest. Diabetes) (C).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$) σε καμία από τις τρεις ομάδες δειγμάτων γυναικών: φυσιολογικών, με ΣΠΩ ή με διαβήτη κύησης, μεταξύ δειγμάτων χωρίς την επίδραση AGEs αλλά και μεταξύ των δειγμάτων με 12ωρη επώαση με AGE/BSA (100μg/ml) (Εικόνα 4.3).

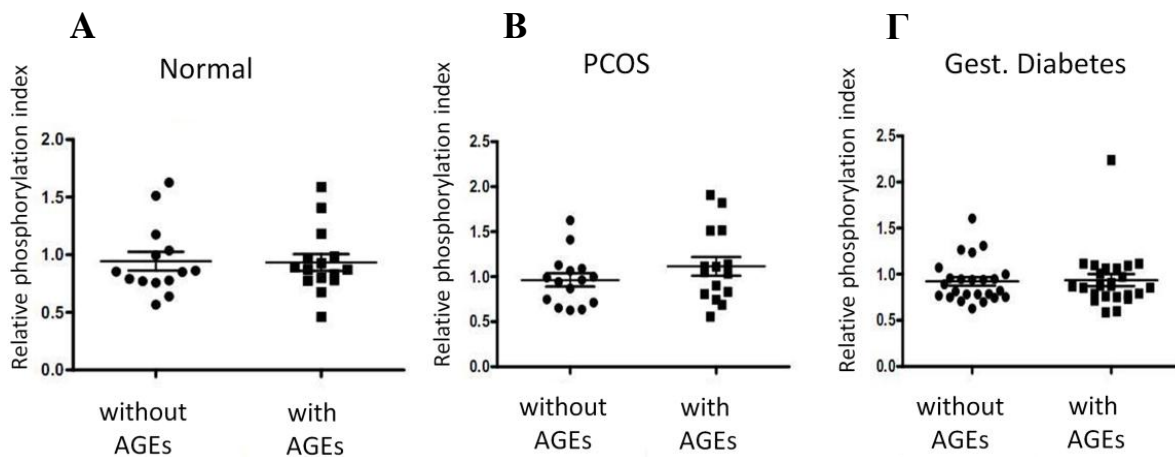
III) Ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση της c-JUN με ή χωρίς AGEs

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p>0,05$) τόσο μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με ΣΠΩ όσο και μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με διαβήτη κύησης. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,0352$) παρατηρήθηκε μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με ΣΠΩ. Μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με διαβήτη κύησης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



Εικόνα 4.4: Διαγράμματα του συντελεστή σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης c-JUN σε HUVECs φυσιολογικών γυναικών (Normal), γυναικών με ΣΠΩ (PCOS) ή διαβήτη κύησης (Gest. Diabetes) χωρίς (A) ή με την παρουσία AGE-BSA (B).

iv) Συγκριτική ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση της c-JUN με και χωρίς AGEs



Εικόνα 4.5: Συγκριτικά διαγράμματα των συντελεστών σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης c-JUN χωρίς (without AGEs) ή με την παρουσία AGE-BSA (with AGEs) σε HUVECs φυσιολογικών γυναικών (Normal) (A), γυναικών με ΣΠΩ (PCOS) (B) ή διαβήτη κύησης (Gest. Diabetes) (Γ).

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,0105$) στην ομάδα με ΣΠΩ μεταξύ δειγμάτων χωρίς την επίδραση AGEs και δειγμάτων με 12ωρη επώαση με AGE/BSA (100μg/ml). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0,05$) στα φυσιολογικά δείγματα καθώς και στα δείγματα από διαβήτη μεταξύ

αυτών χωρίς την επίδραση AGEs και αυτών με 12ωρη επώαση με AGE/BSA (100μg/ml).

Συνοψίζοντας παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση των AGEs δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της κινάσης ERK1/2 μεταξύ φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων και από ΣΠΩ και διαβήτη κύησης. Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της c-JUN στα ενδοθηλιακά κύτταρα από ΣΠΩ κατόπιν χορήγησης AGEs σε σχέση με τα φυσιολογικά ή στα προερχόμενα από διαβήτη κύησης. Η αυξημένη ενεργοποίηση του c-JUN στο ΣΠΩ οφείλεται στη χορήγηση των AGEs.

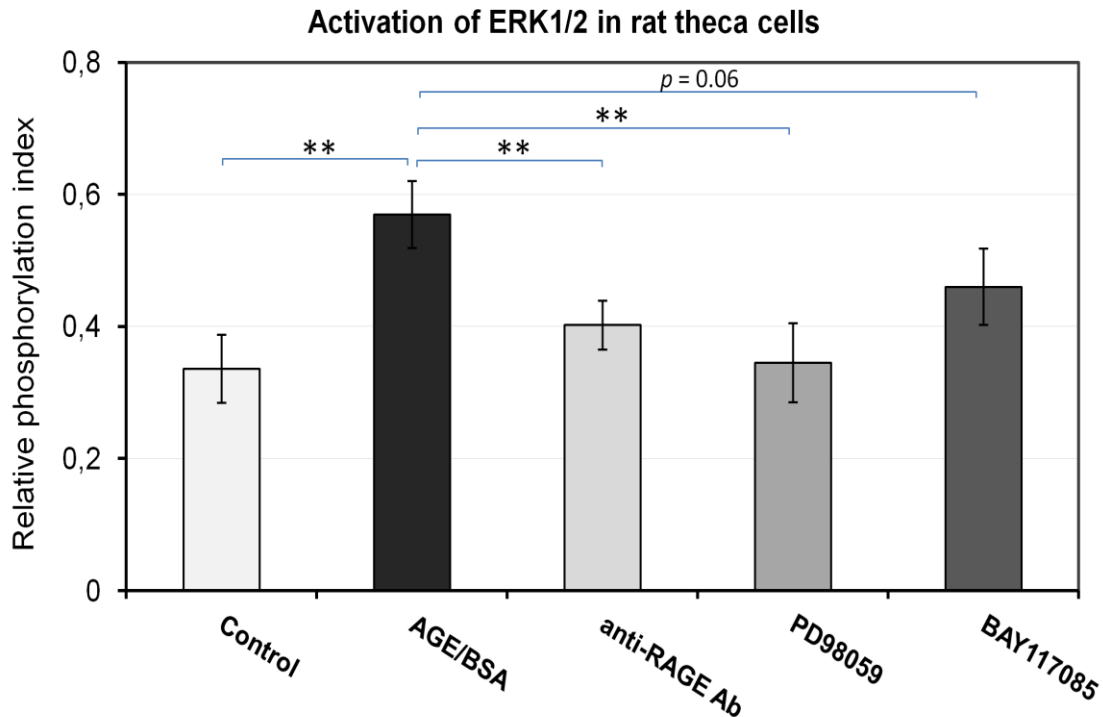
4.2 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε κύτταρα θήκης επίμυων

Διερεύνηση της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών στόχων MAP-κινασών (ERK1/2, c-JUN και p38) πραγματοποιήθηκε και σε καλλιέργειες κυττάρων θήκης που απομονώθηκαν από ωοθήκες 7 φυσιολογικών αρουραίων Sprague-Dawley 30 ημερών και στις οποίες χορηγήθηκε AGE-BSA για 12 ώρες (Κεφάλαιο 3.2.1).

Η μελέτη της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης των MAP-κινασών ERK1/2, c-JUN και p38 έγινε με τη χρήση ανοσοδοκιμασίας τύπου ELISA που βασίζεται σε κύτταρα (Κεφάλαιο 3.11) που βασίζεται στον φωτομετρικό προσδιορισμό της φωσφορυλιωμένης/ενεργοποιημένης μορφής των phospho-c-JUN, phospho-ERK1/2 και phospho-p38 και της ολικής μορφής των πρωτεϊνών c-JUN, ERK1/2 και p38 αντίστοιχα, μετά από επώαση των κυττάρων με ειδικά αντισώματα για την κάθε μορφή. Στο τέλος για την κάθε πρωτεΐνη προκύπτει ο συντελεστής ενεργοποίησης, δηλαδή ο λόγος της φωσφορυλιωμένης προς την ολική μορφή της πρωτεΐνης.

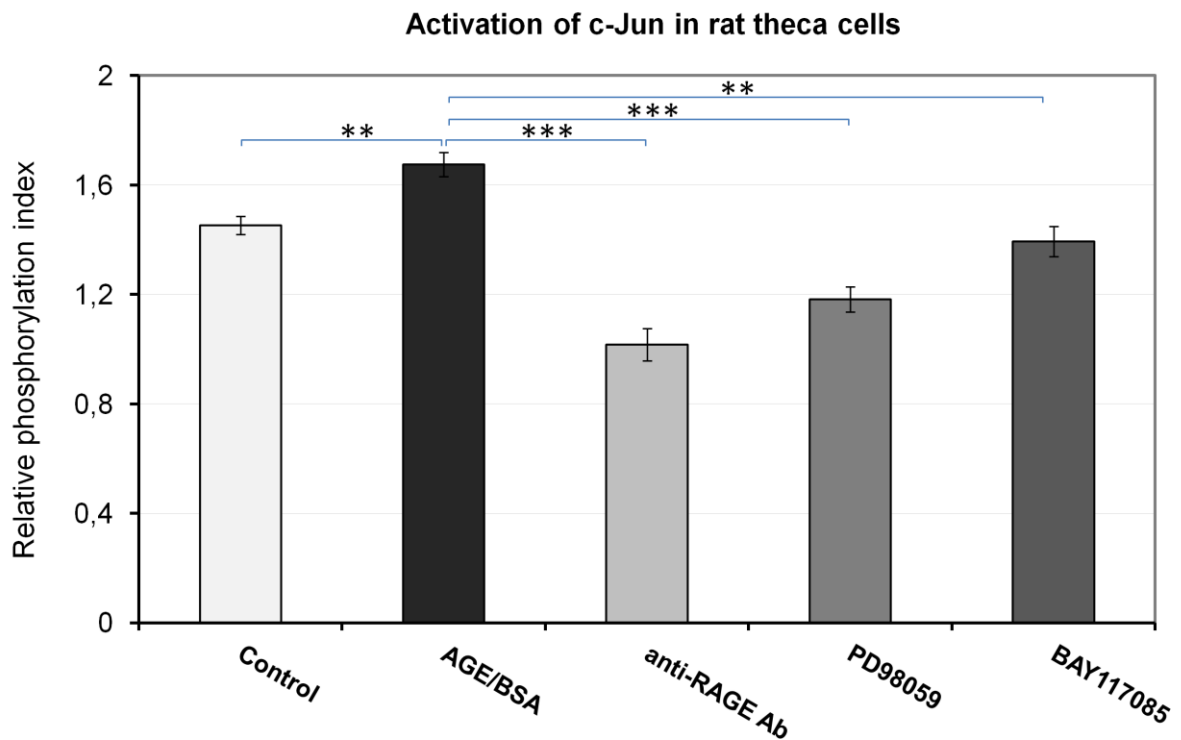
Στα απομονωμένα κύτταρα θήκης αρουραίου και προκειμένου να διερευνηθεί εάν η ενδεχόμενη ενεργοποίηση από την χορήγηση του AGE/BSA γίνεται μέσω του άξονα RAGE – MAP-κινασών – NF-κB, πραγματοποιήθηκε επώαση: α) χωρίς την επίδραση AGEs στα κύτταρα (Controls), β) Μετά από επίδραση με AGEs (AGE/BSA) για 12ώρες σε συγκέντρωση 100μg/ml, γ) Μετά από επίδραση με AGEs (AGE/BSA) για 12ώρες σε συγκέντρωση 100μg/ml αφού όμως είχε προηγηθεί επώαση των κυττάρων για 1,5 ώρα i) με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα RAGE (anti-RAGE Ab), ii) με τον αναστολέα PD98059 έναντι των MEK κινασών που αναστέλλει την ενεργοποίηση MAP κινασών ERK1/2, iii) με τον αναστολέα BAY117085 που αναστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται ο συντελεστής ενεργοποίησης της c-JUN, της ERK1/2 και της p38 με η χωρίς AGEs απουσία ή παρουσία των αναστολέων (anti-RAGE Ab, PD98059, BAY117085).



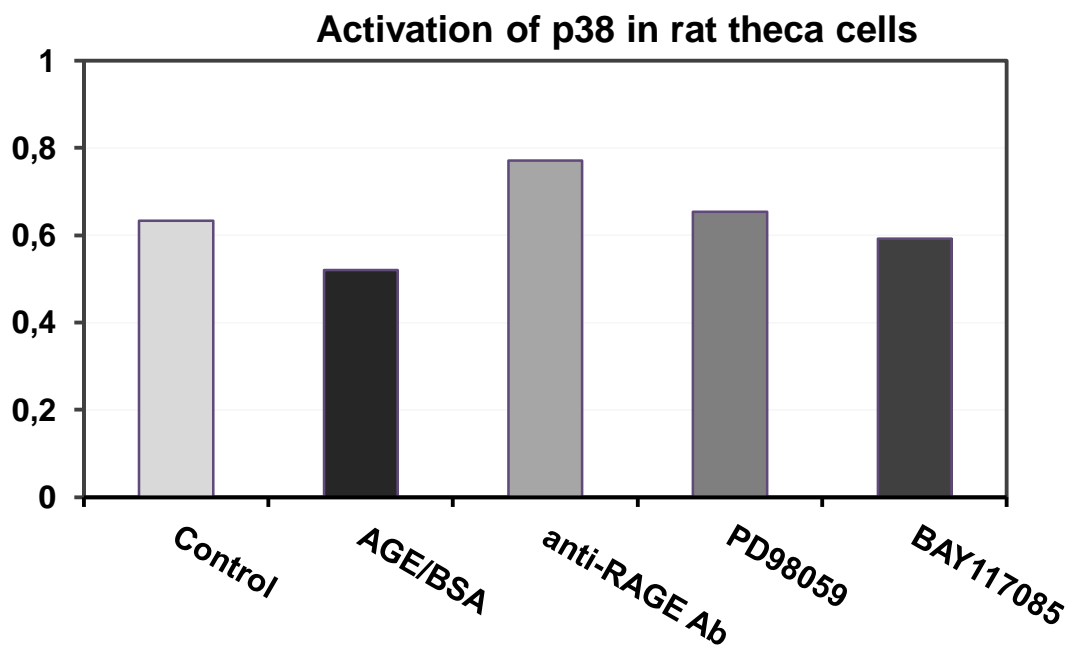
Εικόνα 4.6: Διάγραμμα του συντελεστή σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ERK1/2 σε καλλιέργειες κυττάρων θήκης αρουραίων χωρίς (Control) ή μετά την 12ωρη επώαση με AGEs (AGE-BSA) και μετά από προ-επώαση με αναστολείς anti-RAGE Ab, PD98059 και BAY117085.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αυξημένη ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση της ERK1/2 ($p=0,005$) και της c-JUN μετά από 12ωρη επώαση με AGE/BSA σε σχέση με τους μάρτυρες (Control). Η αύξηση αυτή της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και της c-JUN αναστράφηκε μετά από τη 12ωρη επώαση με AGE/BSA όταν είχε προηγηθεί προ-επώαση για 1,5 ώρα με το αντίσωμα έναντι του υποδοχέα RAGE ($p=0,008$), τον αναστολέα των MAP κινασών, PD98059 ($p=0,008$), και τον αναστολέα του NF-κB, BAY117085 ($p=0,06$)(Εικόνα 4.6 και 4.7).



Εικόνα 4.7: Διάγραμμα του συντελεστή σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης c-JUN σε καλλιέργειες κυττάρων θήκης αρουραίων χωρίς (Control) ή μετά την 12ωρη επώαση με AGEs (AGE-BSA) και μετά από προ-επώαση με αναστολείς anti-RAGE Ab, PD98059 και BAY117085.

Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης της MAP-κινάσης p38 μετά από επώαση με AGE/BSA στις καλλιέργειες των κυττάρων θήκης Εικόνα 4.8.

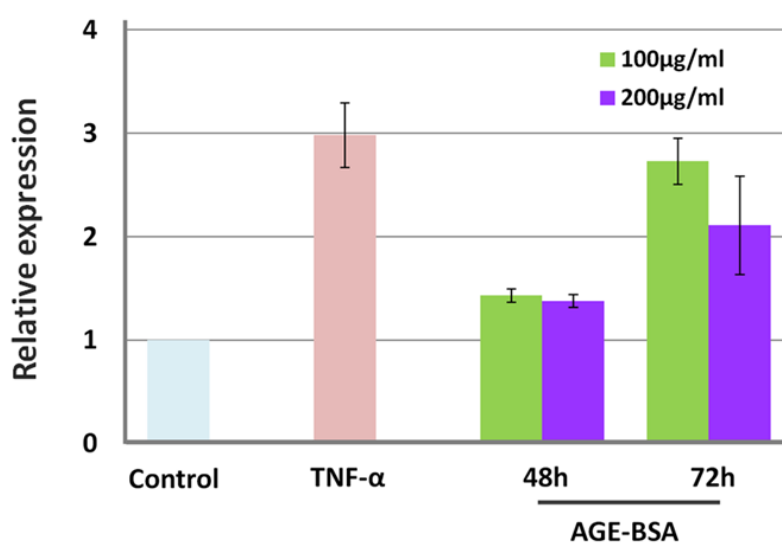


Εικόνα 4.8: Διάγραμμα του συντελεστή σχετικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p38 σε καλλιέργειες κυττάρων θήκης αρουραίων χωρίς (Control) ή μετά την 12ωρη επώαση με AGEs (AGE-BSA) και μετά από προ-επώαση με αναστολείς anti-RAGE Ab, PD98059 και BAY117085.

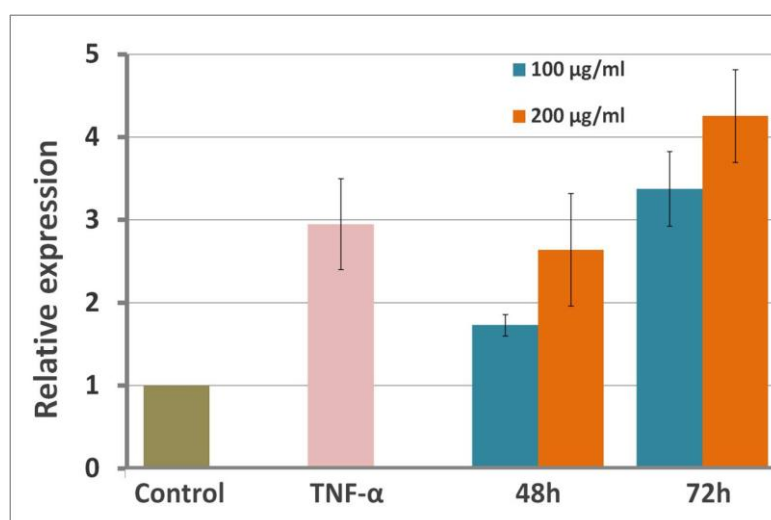
4.3 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε HAECs

Επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της ET-1 και της LOX μετά την επώαση των HAECs με AGEs

Η επαγόμενη γονιδιακή έκφραση (επίπεδα mRNA) της ET-1 και της LOX μετά τη χορήγηση AGE-BSA σε συγκεντρώσεις 100 και 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και για χρόνους επώασης 48 και 78 ωρών, μελετήθηκε μέσω ποσοτικής PCR (Κεφάλαιο 3.16). Η χορήγηση AGE-BSA σε καλλιέργειες HAECs επάγει σημαντικά την μεταγραφή των γονιδίων της ET-1 και της LOX κατά ένα δοσο- και χρόνο εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνες 4.11 & 4.12). Ο TNF- α χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

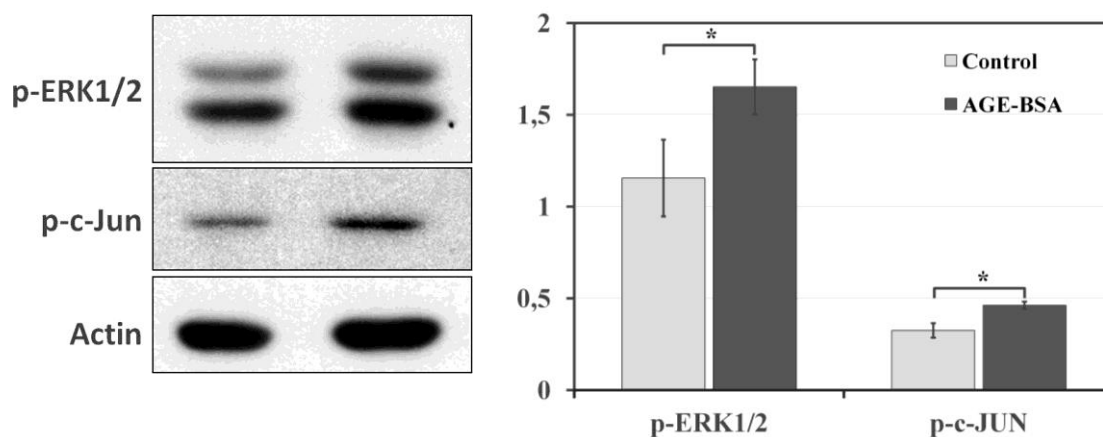


Εικόνα 4.11: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) της ET-1 μέσω ποσοτικής PCR μετά τη χορήγηση AGE-BSA.



Εικόνα 4.12: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) της LOX μέσω ποσοτικής PCR μετά τη χορήγηση AGE-BSA.

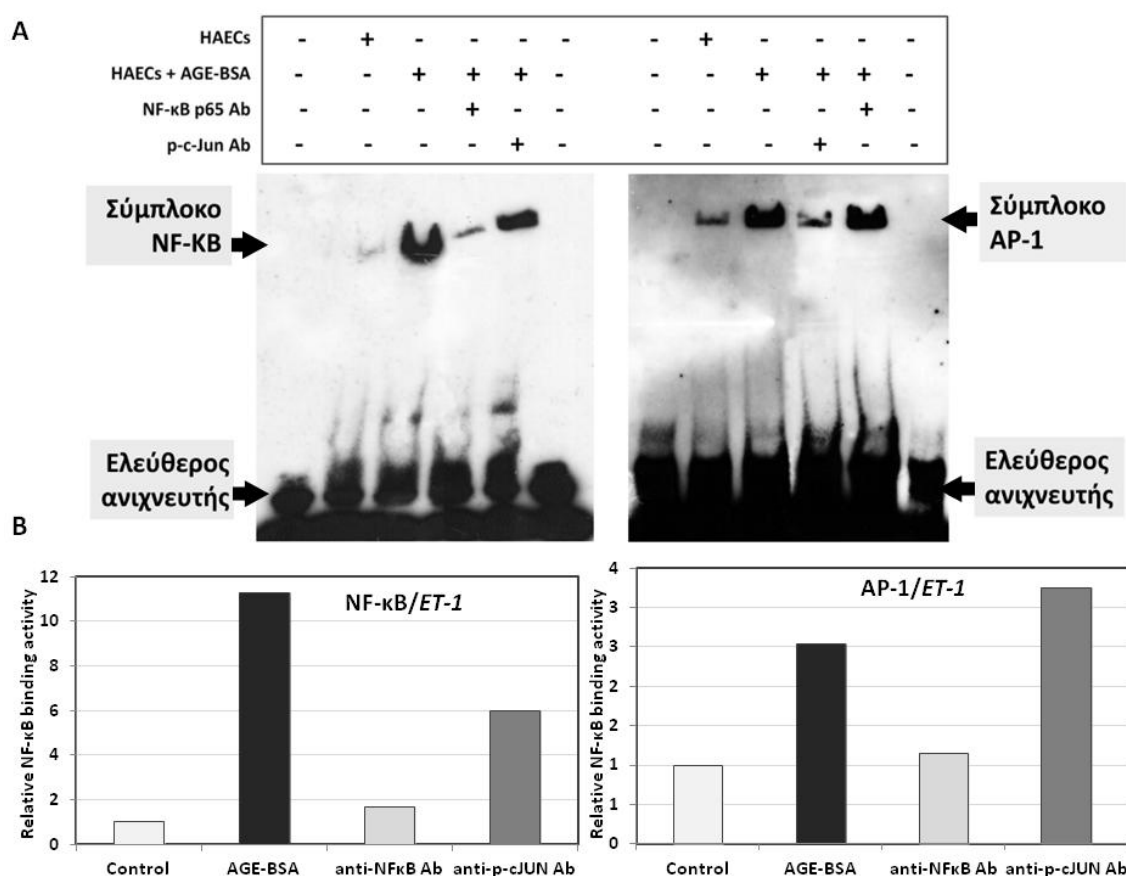
Η χορήγηση AGE-BSA στα HAECs αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των p-ERK1/2 και p-c-JUN



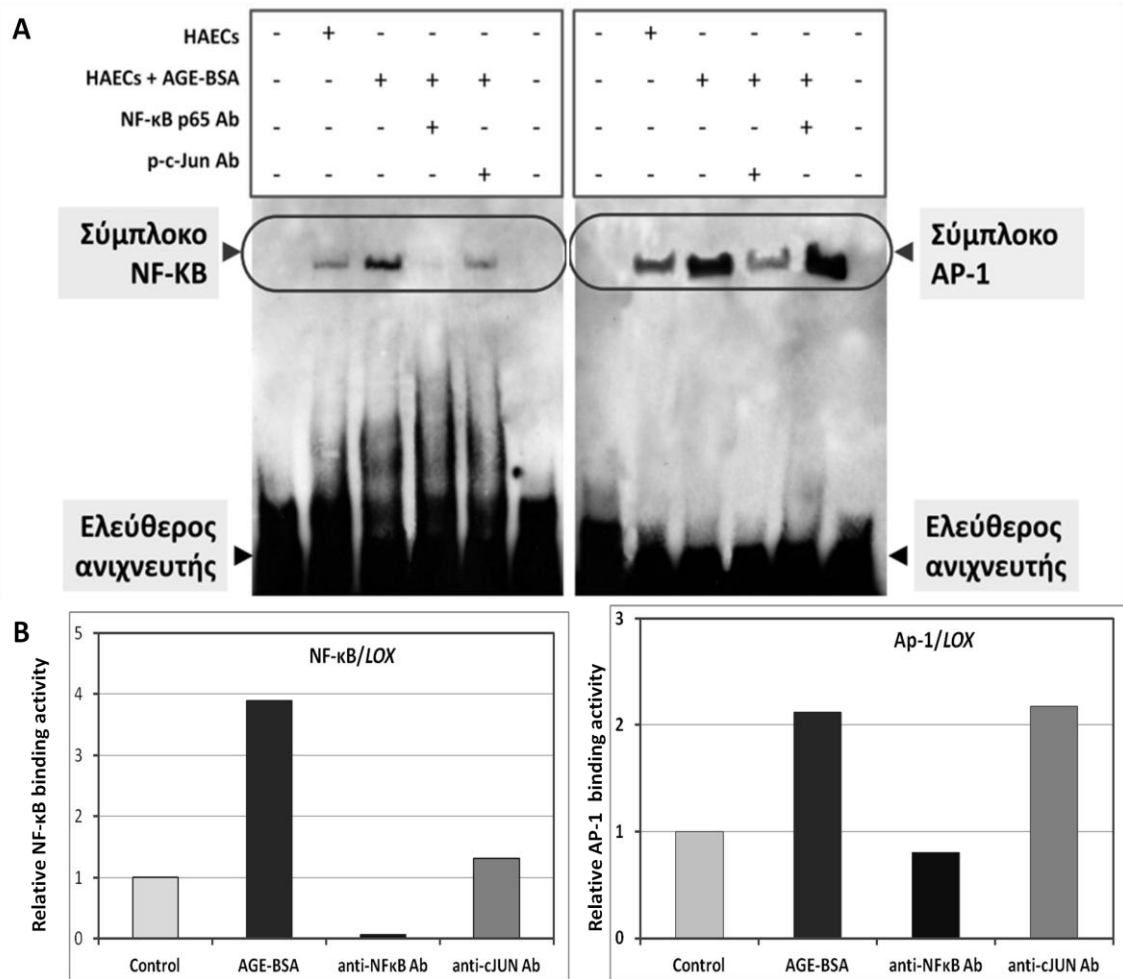
Εικόνα 4.13: Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Κεφάλαιο 3.10) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (κεφάλαιο 3.7) HAECs μετά από την επώαση τους με AGE-BSA για 72 ώρες και σε συγκέντρωση 200 µg/ml έδειξε ότι η πρωτεϊνική έκφραση των ενεργοποιημένων/ φωσφορυλιωμένων μορφών των MAP-κινασών ERK1/2 και p-c-JUN αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά.

Η επώαση των HAECs με AGE-BSA προκάλεσε την ενεργοποίηση και πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στους υποκινητές των γονιδίων ET-1 και LOX

Προκειμένου να διαπιστωθεί η συμμετοχή των επαγόμενων από τα AGEs μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στη γονιδιακή ρύθμιση της ET-1 και της LOX μετά τη χορήγηση AGE-BSA, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της προσδετικής ικανότητας των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στους υποκινητές των γονιδίων των ET-1 και LOX μέσω EMSA (Κεφάλαιο 3.17). Η επώαση των HAECs με AGE-BSA για 72 ώρες και σε συγκέντρωση 200 μg/ml προκάλεσε αυξημένη προσδετική ικανότητα των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στον υποκινητή τόσο του γονιδίου της ET-1 όσο και της LOX σε (Εικόνες 4.14 & 4.15).



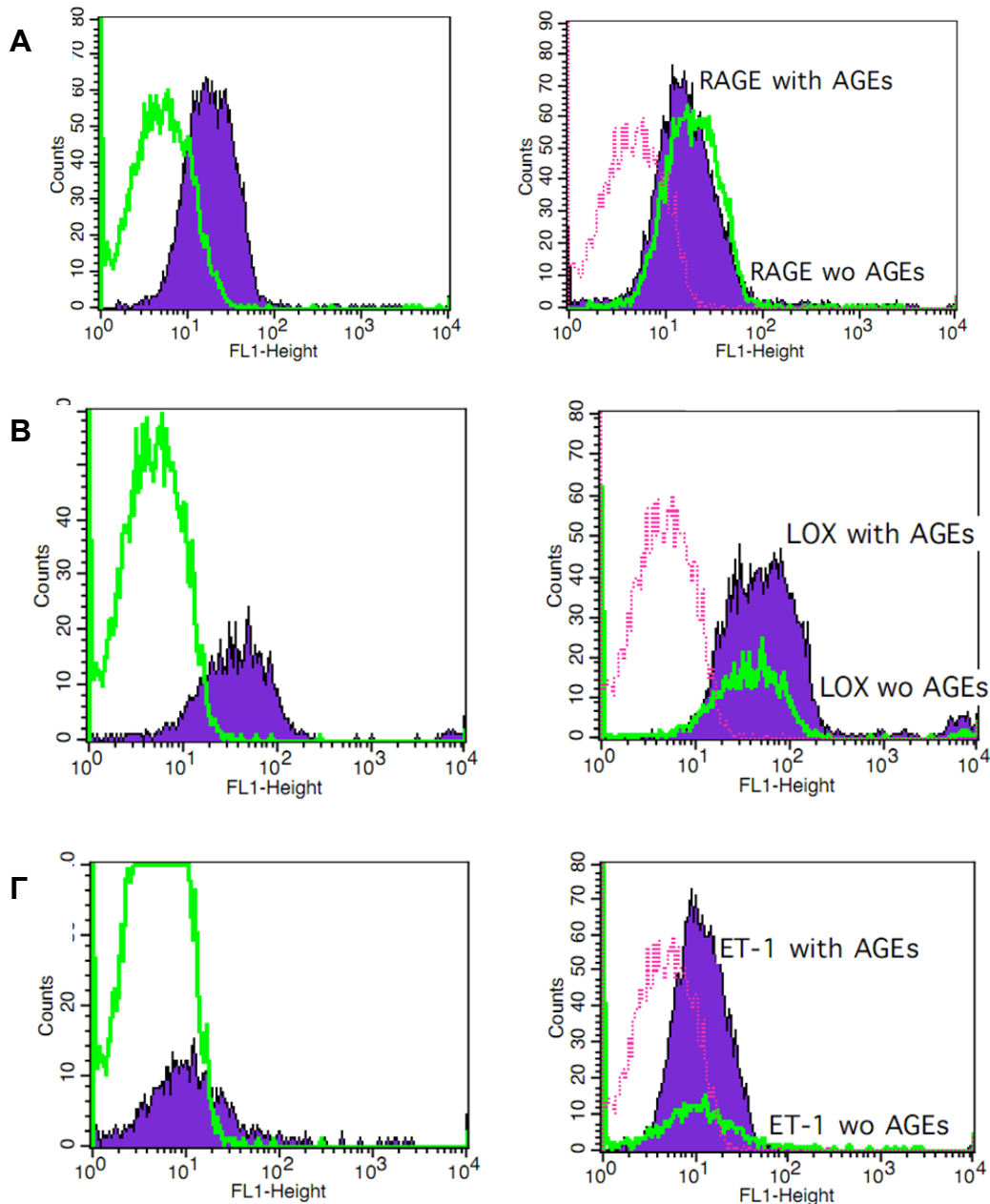
Εικόνα 4.14: Ανάλυση της προσδετικής ικανότητας με EMSA των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στον υποκινητή του γονιδίου της ET-1. **A.** AGE-επαγόμενη δέσμευση των NF-κB και AP-1 στον υποκινητή του γονιδίου της ET-1. **B.** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 4.15: Ανάλυση της προσδετικής ικανότητας με EMSA των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 στον υποκινητή του γονιδίου της LOX. **A.** AGE-επαγόμενη δέσμευση των NF-κB και AP-1 στον υποκινητή του γονιδίου της LOX. **B.** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης του RAGE και των ET-1 και LOX μετά την επώαση με AGE-BSA

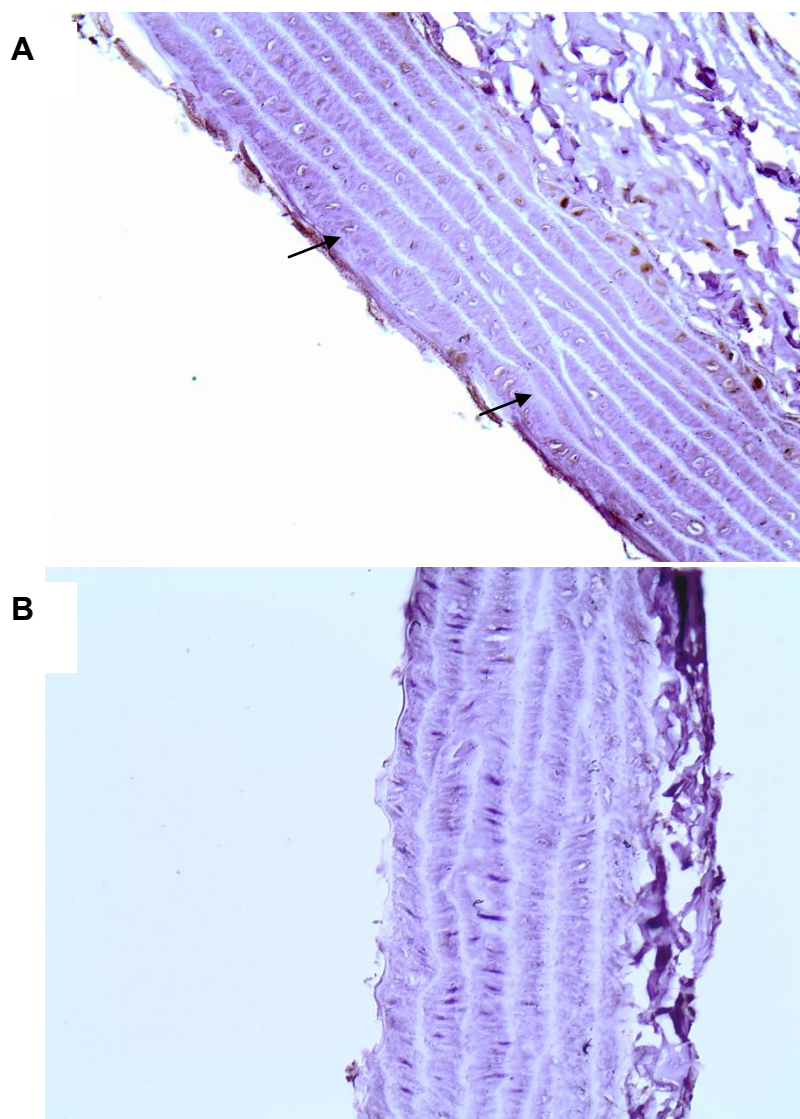
Για να μελετηθεί η πρωτεϊνική έκφραση του RAGE καθώς και των ET-1 και LOX μετά τη χορήγηση AGE-BSA (72h, 100 µg/ml) σε HAECs πραγματοποιήθηκε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Κεφάλαιο 3.19). Η ανάλυση αυτή έδειξε πως η πρωτεϊνική έκφραση του RAGE στα HAECs, μετά την επίδραση του AGE-BSA, δεν επηρεάστηκε ενώ αυτές των ET-1 και LOX αυξήθηκαν (Εικόνα 4.16).



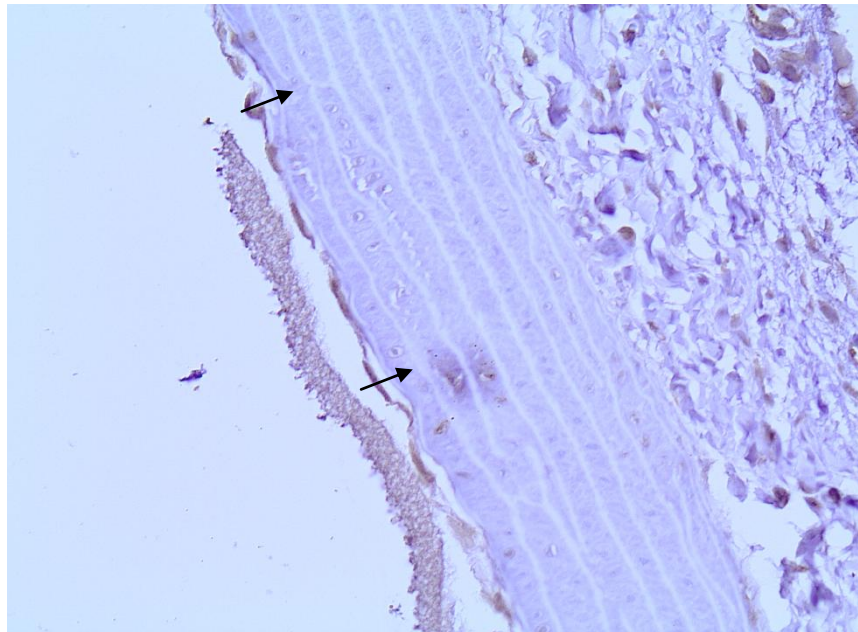
Εικόνα 4.16: Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της έκφρασης του RAGE (Α), της ET-1 (Β) και της LOX (Γ).

4.4 Μελέτη της σηματοδότησης των AGEs σε αορτικό ενδοθήλιο επίμυων

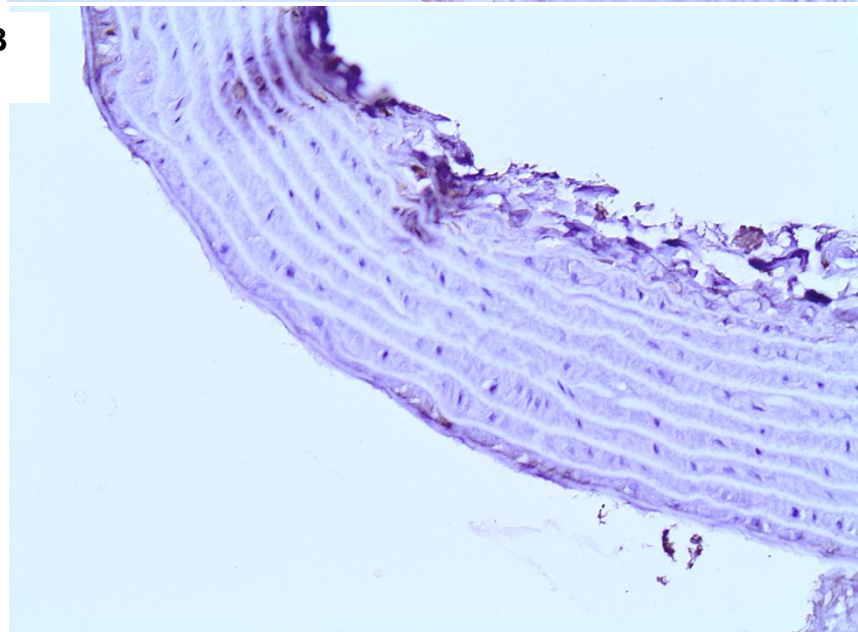
Προκειμένου να γίνει ένας *in vivo* συσχετισμός με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε ένα λειτουργικό μοντέλο φυσιολογικών επίμυων στους οποίους είχε χορηγηθεί για 3 μήνες δίαιτα χαμηλής ή υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs (LOW-AGEs και HIGH-AGEs αντίστοιχα)(Κεφάλαιο 3.18). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε τομές από το ενδοθήλιο αορτής έδειξε υψηλή έκφραση και συνεντοπισμό των μορίων AGEs (Εικόνα 4.17), RAGE (Εικόνα 4.18), ET-1 (Εικόνα 4.19) και LOX (Εικόνα 4.20) στο αορτικό ενδοθήλιο της ομάδας που είχε λάβει HIGH-AGEs δίαιτα σε σχέση με τους μάρτυρες.



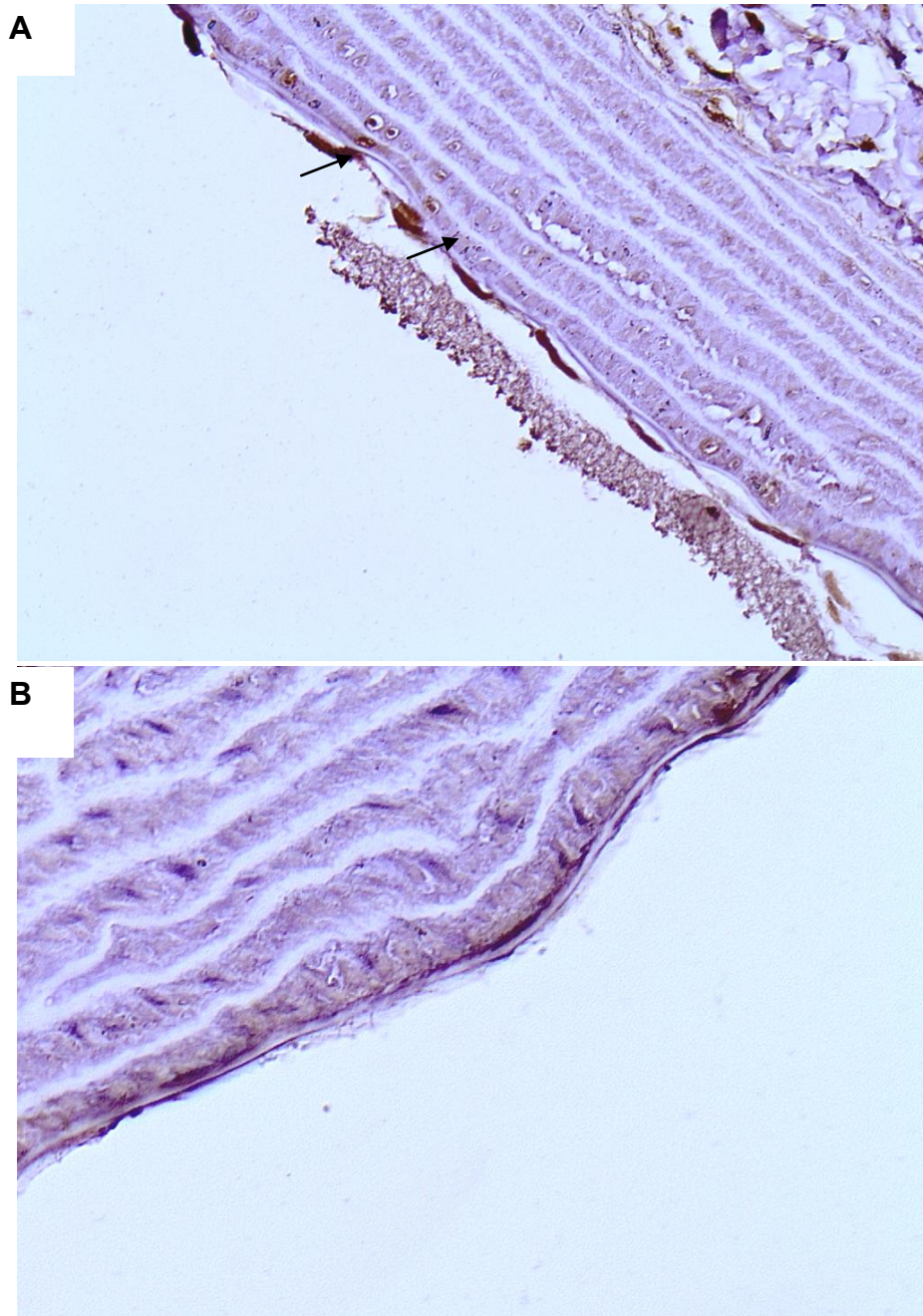
Εικόνα 4.17: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των AGEs στο αορτικό ενδοθήλιο φυσιολογικών επίμυων οι οποίοι είχαν λάβει δίαιτα πλούσια σε AGEs (A) σε σχέση με ζώα μάρτυρες (B).



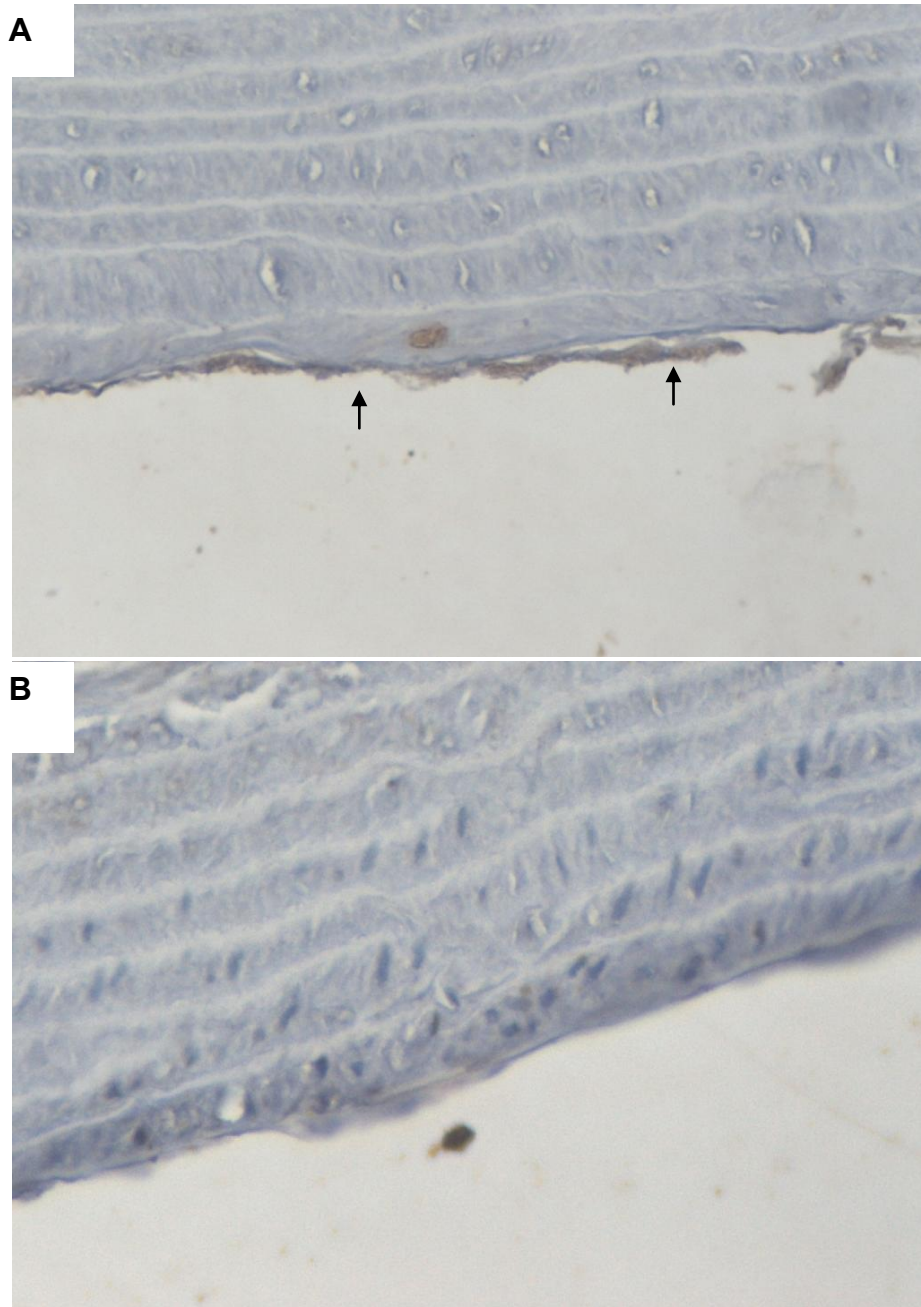
B



Εικόνα 4.18: Ανοσοιστοχημικός εντοπισμός του RAGE στο αορτικό ενδοθήλιο φυσιολογικών επίμυων οι οποίοι είχαν λάβει διαίτα πλούσια σε AGEs (A) σε σχέση με ζώα μάρτυρες (B).



Εικόνα 4.19: Ανοσοιστοχημικός εντοπισμός της ET-1 στο αορτικό ενδοθήλιο φυσιολογικών επίμυων οι οποίοι είχαν λάβει δίαιτα πλούσια σε AGEs (A) σε σχέση με ζώα μάρτυρες (B).

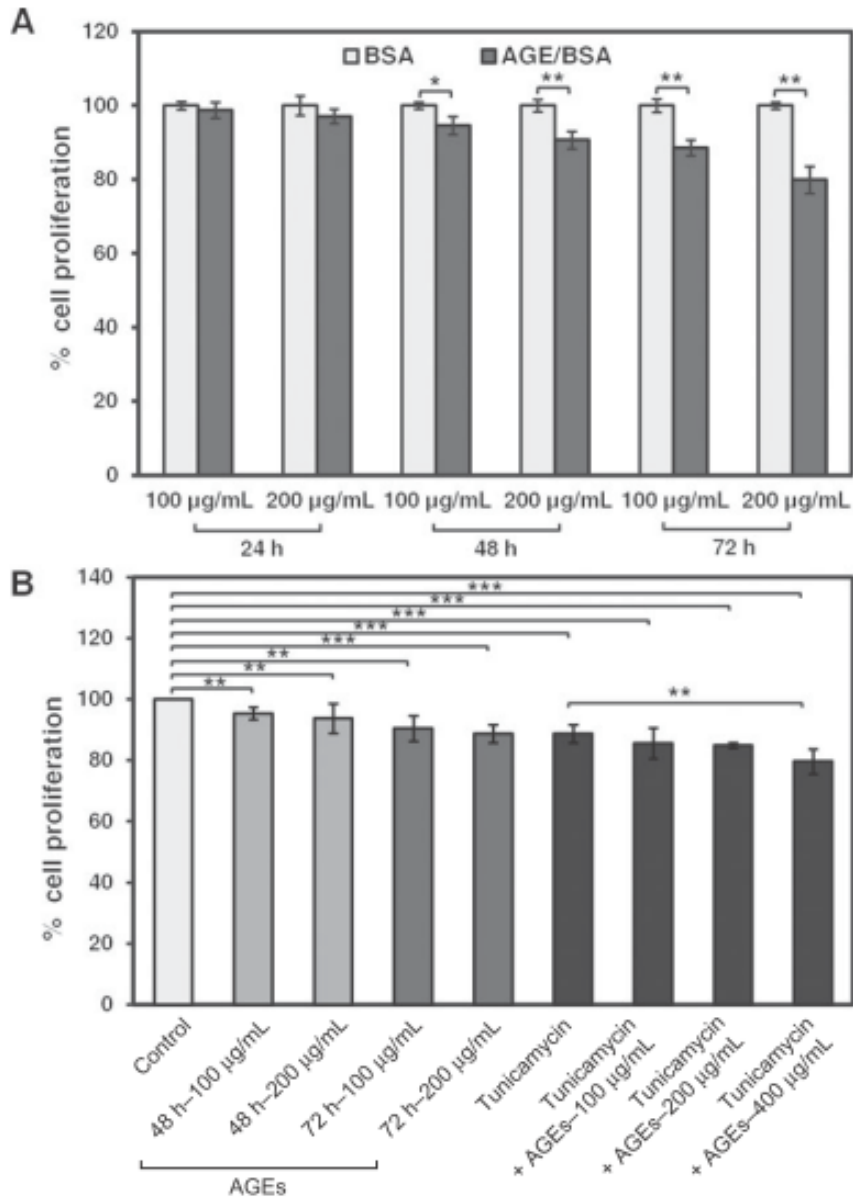


Εικόνα 4.20: Ανοσοιστοχημικός εντοπισμός της LOX στο αορτικό ενδοθήλιο φυσιολογικών επίμυων οι οποίοι είχαν λάβει δίαιτα πλούσια σε AGEs (A) σε σχέση με ζώα μάρτυρες (B).

4.6 Αλληλεπίδραση της σηματοδότησης των AGEs και του Στρες του ΕΔ

Η χορήγηση AGE-BSA ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των HAECs κατά ένα δοσο- και χρόνο εξαρτώμενο τρόπο

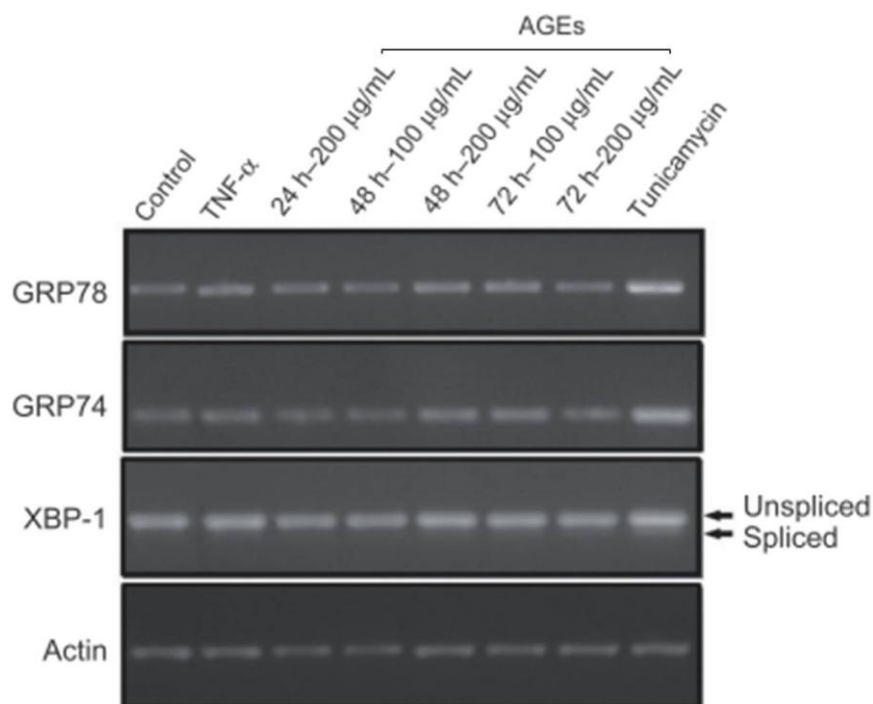
Για να διαλευκανθεί η επίδραση των AGEs στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, χορηγήθηκαν στα HAECs αυξητικές συγκεντρώσεις (100, 200 $\mu\text{g/ml}$) μη τροποποιημένης βόειου αλβουμίνης (bovine serum albumin, BSA) ή AGE-BSA για διαφορετικούς χρόνους (24, 48, 72 ώρες). Η δοκιμασία MTT (Κεφάλαιο 3.4) υπέδειξε ότι η χορήγηση των ελάττωσε στατιστικά σημαντικά την επιβίωση των HAECs κατά ένα χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (48 ώρες - 100 $\mu\text{g/mL}$ AGE-BSA: $p<0,01$; 48 ώρες - 200 $\mu\text{g/mL}$ AGE-BSA: $p<0,05$; 72 ώρες - 100 $\mu\text{g/mL}$ AGE-BSA: $p<0,05$; 72h - 200 $\mu\text{g/mL}$ AGE-BSA: $p<0,001$) (Εικόνα 4.21 Α). Επιπρόσθετα τη χορήγηση του φαρμακευτικού επαγωγέα του στρες του Ε, τουνικαμυκίνης (tunicamycin), είχε το ίδιο αποτέλεσμα με την δόση υψηλότερης συγκέντρωσης του AGE-BSA (200 $\mu\text{g/mL}$) και μεγαλύτερης διάρκειας επώασης (72 ώρες) ($p<0,001$). Η συνδυαστική χορήγηση τουνικαμυκίνης και υψηλότερων συγκεντρώσεων AGE-BSA έδειξε μικρή ελάττωση του πολλαπλασιασμού των HAECs προτείνοντας έναν μη συνεργιστικό αποτέλεσμα μεταξύ αυτών των δύο παραγόντων (Εικόνα 4.21 Β).



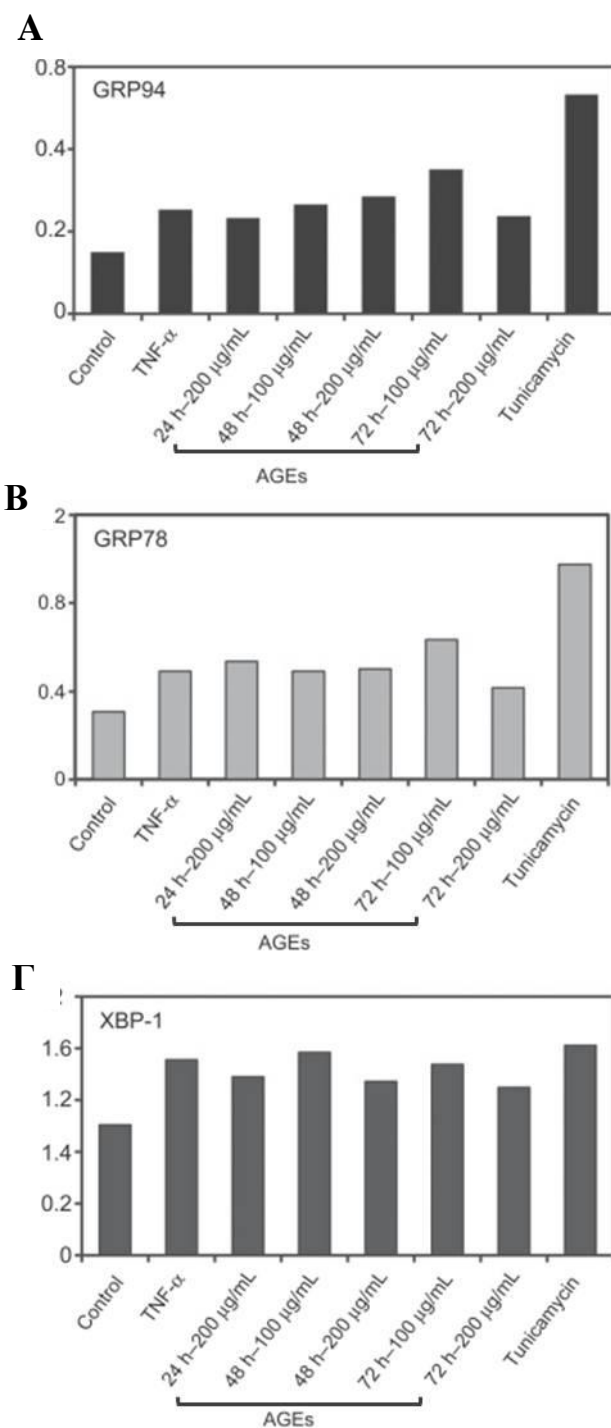
Εικόνα 4.21: Αναστολή του πολλαπλασιασμού των HAECs μετά από χορήγηση AGE-BSA και τουνικαμκίνης.(A) Σε κύτταρα που επώαστηκαν με BSA ή AGE-BSA σε συγκεντρώσεις 100 και 200 µg/ml για 24, 48 και 72 ώρες πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία MTT (B) Ανεξάρτητα πειράματα με συνδυαστική χορήγηση τουνικαμκίνης (5 µg/ml) για 24 ώρες και αυξητικές συγκεντρώσεις AGE-BSA (100-400 µg/ml). Η επιβίωση των κυττάρων, μαρτύρων, στα οποία δεν χορηγήθηκε καμία ουσία (control) θεωρήθηκε 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Η επώαση με AGE-BSA προκάλεσε την επαγωγή του στρες του ΕΔ στα HAECs

Βασιζόμενοι σε πρόσφατες μελέτες που περιγράφουν την εμπλοκή των AGEs στη σηματοδότηση του στρες του ΕΔ, διερευνήσαμε την πιθανή επαγωγή του στρες του ΕΔ και την έκφραση των συστατικών του UPR μετά από χορήγηση AGE-BSA. Ημιοσοτική ανάλυση με PCR (Κεφάλαιο 3.13) έδειξε αυξημένη έκφραση των μοριακών συνοδών GRP78 και GRP94, των βασικών δεικτών της επαγωγής του στρες του ΕΔ σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν (Εικόνα 4.22). Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση στα επίπεδα του mRNA του XBP-1 στους μικρότερους χρόνους (24 και 48 ώρες) και στην χαμηλότερη συγκέντρωση (100μg/ml) καθώς και του προϊόντος εναλλακτικού ματίσματος του XBP-1 (spliced XBP-1) στις 72 ώρες (Εικόνα 4.22 Α κάτω βέλος), προτείνοντας την άμεση ενεργοποίηση του μονοπατιού του IRE-1 παρουσία των AGEs (Εικόνα 4.23).

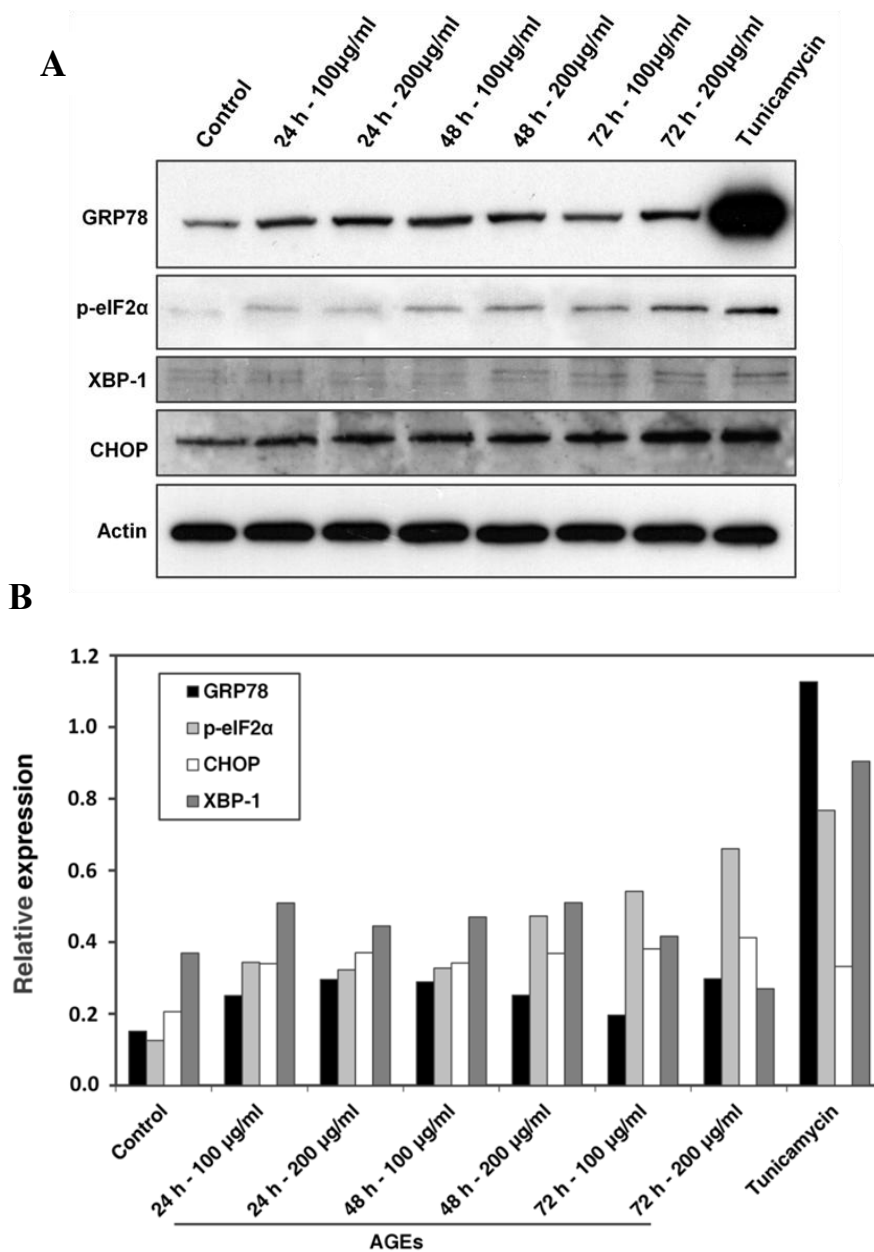


Εικόνα 4.22: Η χορήγηση AGE-BSA επάγει την αύξηση των επιπέδων mRNA των συστατικών του UPR στα HAECs. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (Κεφάλαιο 3) των προϊόντων που δείχνουν τα επίπεδα των έκφρασης του mRNA των GRP78, GRP74, XBP-1 μετά από ανάλυση με RT-PCR.



Εικόνα 4.23: Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την ποσοτικοποίηση (Image J) των προϊόντων της RT-PCR: (Α) *GRP94*, (Β) *GRP78*, (Γ) *XBP1* (Εικόνα 4.22) μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης.

Επιπλέον, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των πρώιμων τελεστών του UPR, *GRP78* και των τελικών τελεστών *p-eIF2α* και *CHOP* *XBP-1* που ακολουθούν την επώαση με AGE-BSA.



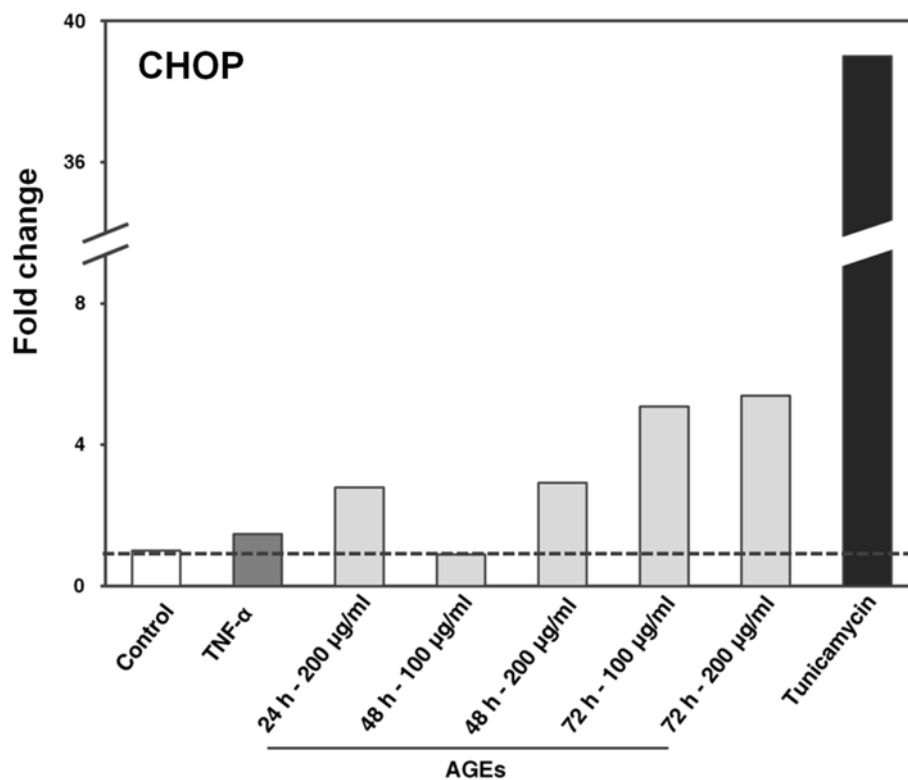
Εικόνα 4.24: Η χορήγηση AGE-BSA αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GRP78 και άλλων συστατικών του UPR. (A) Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GRP78, p-eIF2 α , XBP-1 και CHOP αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, μετά από χορήγηση AGE-BSA σε HAECs σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (100, 200μg/ml) για διαφορετικούς χρόνους (24, 48 και 72 ώρες). (B) Στο διάγραμμα απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων (κανονικοποίηση με τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης). Η τουνικαμυκίνη (5 μg/ml για 24 ώρες) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της επαγωγής του στρες του ΕΔ.

Η έκφραση του GRP78 βρέθηκε να είναι αυξημένη σε όλες τις δόσεις και χρόνους επώασης (Εικόνα 4.24) σε συμφωνία με τα επίπεδα έκφρασης του mRNA

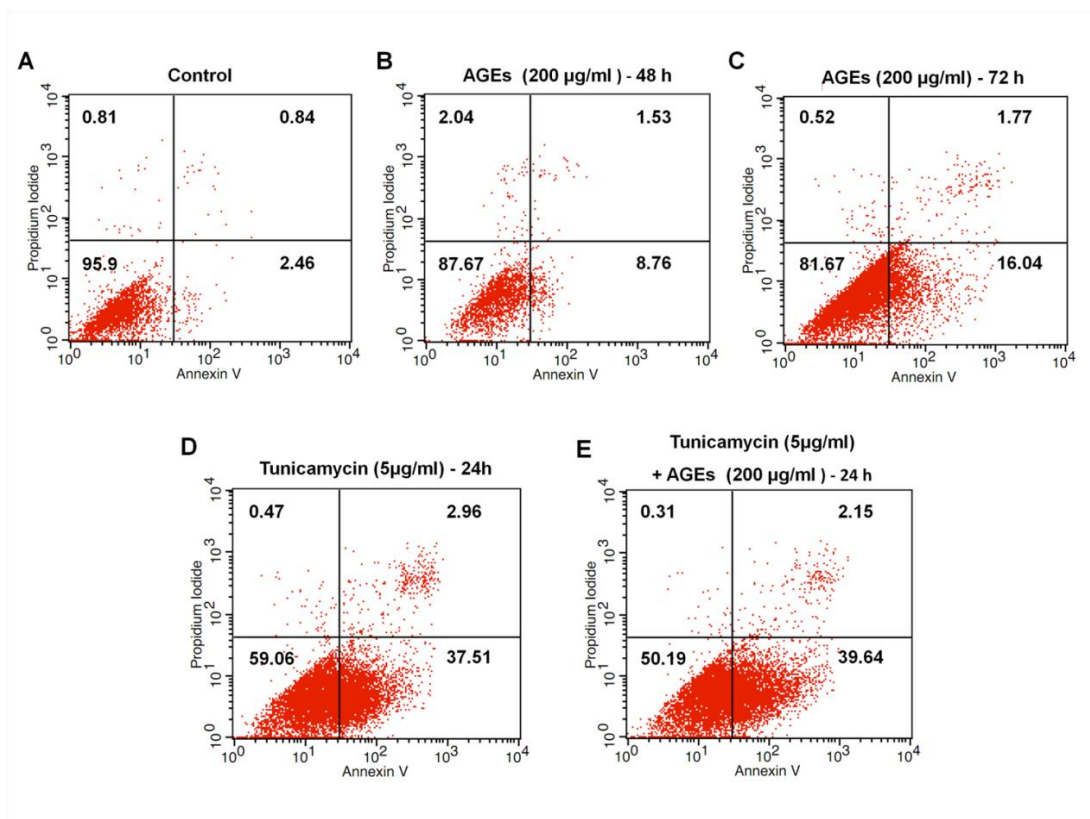
(Εικόνα 4.23). Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε επίσης στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του XBP-1 τα οποία παρέμειναν αυξημένα στους μικρότερους χρόνους επώασης (24 και 48 ώρες) και μειωμένα στις 72 ώρες επώασης και για τις δύο συγκεντρώσεις AGE-BSA (Εικόνα 4.24). Για να διερευνηθεί η εμπλοκή των τελικών τελεστών του UPR στο επαγόμενο από τα AGEs στρες του ΕΔ, μελετήθηκαν μόρια κλειδιά του μονοπατιού PERK. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.24, η χορήγηση AGE-BSA στα HAECs αύξησε την έκφραση του φωσφορυλιωμένου τύπου του eIF2α και του προ-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα CHOP κατά ένα χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στις 48 ώρες για την μεγαλύτερη συγκέντρωση AGE-BSA και στις 72 ώρες και για τις δύο συγκεντρώσεις.

Η χορήγηση AGE-BSA προκάλεσε την επαγόμενη από το στρες του ΕΔ απόπτωση στα HAECs

Για να επιβεβαιωθεί η επαγωγή του προ-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα CHOP μετά από την χορήγηση των AGEs, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια υψηλότερο στατιστικά σημαντικό βαθμό επαγωγής των επιπέδων mRNA του CHOP συγκρινόμενο με τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης στις 72 ώρες επώασης και για τις δύο συγκεντρώσεις (Εικόνα 4.25). Το εύρημα αυτό υπέδειξε την πρόκληση απόπτωσης που διαμεσολαβείται από τον CHOP στα HAECs μετά από επώαση με AGEs, η οποία διερευνήθηκε περαιτέρω μέσω ανάλυσης δέσμησης του συμπλόκου αννεξίνης-V/iodide με τη χρήση κυτταρομετρίας ρόης (Εικόνα 4.26). Η υψηλή συγκέντρωση των AGEs (200 µg/ml) για 48 και 72 ώρες επώασης προκάλεσε μια σημαντική αύξηση του πρώιμου αποπτωτικού κλάσματος των HAECs (4- και 8-φορές, αντίστοιχα). Επιπλέον, η συνεπώαση με τουνικαμυκίνη και AGEs δεν αύξησε περαιτέρω το ποσοστό των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων συγκρινόμενη με μόνη της την τουνικαμυκίνη (39.64% έναντι 37.51% των οριοθετημένων κυττάρων). Το αποτέλεσμα αυτό είναι συμβατό με τα δεδομένα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνας 4.26B), παρέχοντας περαιτέρω ενδείξεις για ένα κοινό μηχανισμό μεταξύ των AGEs και της τουνικαμυκίνης στην επαγωγή της απόπτωσης στα HAECs μέσω ενεργοποίησης της σηματοδότησης του UPR.



Εικόνα 4.25: Επαγωγή του προ-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα CHOP μετά από χορήγηση AGE-BSA. Τα επίπεδα mRNA του CHOP αξιολογήθηκαν μέσω ποσοτικής PCR (Κεφάλαιο 3.16) σε HAECs μετά από χορήγηση AGE-BSA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις AGE-BSA σε HAECs σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (100, 200µg/ml) για διαφορετικούς χρόνους (24, 48 και 72 ώρες). Ο TNF- α (50 ng/mL για 4 ώρες) και η τουνικαμυκίνη (5 µg/mL για 24 ώρες) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. * $p < .05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Εικόνα 4.26: Το AGE-BSA προκάλεσε απόπτωση στα HAECs κατά ένα χρόνο εξαρτώμενο τρόπο. Η απόπτωση των HAECs διαπιστώθηκε μέσω της δοκιμασίας δέσμευσης του συμπλόκου αννεξίνη V/PI. Στα HAECs δεν είχε χορηγηθεί καμία ουσία, μάρτυρες (control) (A) ή είχαν χορηγηθεί AGE-BSA (200 µg/ml) για 48 ώρες (B) και για 72 ώρες (Γ), τουνικαμυκίνη (5 µg/ml) για 24 ώρες (Δ) και τουνικαμυκίνη (5 µg/ml) μαζί με AGE-BSA (200 µg/ml) για 24 ώρες (E). Το ποσοστό των οριοθετημένων (gated) κυττάρων δείχνεται σε κάθε τεταρτιμόριο (Πάνω αριστερά: % νεκρωτικών κυττάρων, Πάνω δεξιά: % αποπτωτικών κυττάρων, Κάτω αριστερά: % αποπτωτικών κυττάρων, Κάτω δεξιά: % πρόιμων αποπτωτικών κυττάρων).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα AGEs είναι δραστικά μόρια διασύνδεσης, τα οποία σχηματίζονται από μη ενζυμική αντίδραση των ανηγμένων σακχάρων με τις αμινομάδες πρωτεϊνών και λιπιδίων. Μπορεί να προκαλέσουν βλάβη σε ιστούς τόσο άμεσα, μέσω φαινομένων όπως παγίδευση και διασύνδεση, όσο και έμμεσα μέσω δέσμευσης στον μεμβρανικό υποδοχέα τους RAGE στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων (ενδοθηλιακών, μονοπύρηνων, φαγοκύτταρων, νευρικών και λείων μυϊκών κυττάρων) [5, 6, 52].

Το αρχικό στάδιο της παρούσας μελέτης περιελάμβανε τη διερεύνηση της επίδραση AGEs με τη χορήγηση AGE-BSA σε φυσιολογικό και παθολογικό ανθρώπινο ενδοθήλιο (Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II και ΣΠΩ) μέσω μελέτη της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού των AGEs που περιλαμβάνουν τις MAP-κινάσες (ERK1/2, c-JUN). Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση των AGEs δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της κινάσης ERK1/2 μεταξύ φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων και από ΣΠΩ και διαβήτη κύησης. Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της c-JUN στα ενδοθηλιακά κύτταρα από ΣΠΩ κατόπιν χορήγησης AGEs σε σχέση με τα φυσιολογικά ή στα προερχόμενα από διαβήτη κύησης. Η αυξημένη ενεργοποίηση του c-JUN στο ΣΠΩ οφείλεται στη χορήγηση των AGEs γεγονός το οποίο καταδεικνύει τη σημαντικότητα που μπορεί να έχει η εξωγενής πρόσληψη AGEs στο αγγειακό ενδοθήλιο υπερ-ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, χαρακτηριστική του ΣΠΩ.

Παράλληλα η επίδραση των AGEs στο αναπαραγωγικό σύστημα έχει αποδειχθεί καθώς μπορούν να εναποτίθενται στον ωθητικό ιστό [60, 61]. Μάλιστα ο εντοπισμός τους ήταν αυξημένος την περιοχή της θήκης και της κοκκιώδους στιβάδας των ωοθυλακίων [60]. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε καλλιέργειες κυττάρων θήκης από ωοθήκες φυσιολογικών επίμυων στις οποίες χορηγήσαμε AGE-BSA και ακολούθησε η μελέτη της ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού των AGEs. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι όταν τα κύτταρα θήκης επίμυων συνεπωαστούν με AGE-BSA αυξάνεται στατιστικά σημαντικά η ενεργοποίησης/φωσφορυλίωση των MAP-

κινασών ERK1/2 και c-JUN και η αύξηση αυτή είναι ειδική, οφείλεται στην ενεργοποίηση του άξονα AGE-RAGE και περιλαμβάνει την ειδική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κάτι που συμφωνεί με τον αυξημένο εντοπισμό του σε ανθρώπινες πολυκιστικές ωοθήκες [60] ή σε ωοθήκες επίμυων στους οποίους έχει χορηγηθεί δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs [61].

Η αλληλεπίδραση των AGEs με τον υποδοχέα τους RAGE (Receptor for AGEs) ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία καταλήγουν στη γονιδιακή έκφραση μορίων που εμπλέκονται στην αγγειακή βλάβη, όπως των μορίων προσκόλλησης και της ET-1. Η ET-1 αποτελεί έναν βασικό παράγοντα αγγειοσυστολής και σημαντικό βιοχημικό δείκτη αγγειακής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας [89].

Η χορήγηση AGE-BSA σε καλλιέργειες ανθρώπινων αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων (HAECs) επάγει σημαντικά τη μεταγραφή του γονιδίου της ET-1 κατά ένα χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς και την πρωτεϊνική της έκφραση. Η επαγωγή αυτή μεσολαβείται από την ενεργοποίηση και πρόσδεση στον υποκινητή του γονιδίου της ET-1 των επαγόμενων από τα AGEs μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1. Ενώ η επαγωγή της γονιδιακής μεταγραφής της *ET-1* έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται θετικά από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB σε καλλιέργειες διεγερμένων από AGEs βόειων αορτικών ενδοθηλιακών (BAECs, bovine aortic endothelial cells) από τους Quehenberger και συνεργάτες [186], η παρούσα διατριβή δείχνει για πρώτη φορά την επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης της ET-1 μέσω ενεργοποίησης του άξονα AGE-RAGE καθώς και τη γονιδιακή της ρύθμιση τόσο από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB όσο και από τον AP-1 σε ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο AP-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που συγκροτείται από πρωτεΐνες που ανήκουν στις οικογένειες των c-Fos, c-JUN, ATF και JDP και ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση ως απόκριση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων που περιλαμβάνουν κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες, στρες, βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις [187]. Μπορεί στη συνέχεια να ελέγχει ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [188].

Επίσης τα αποτελέσματά μας όσον αφορά στη έκφραση του RAGE στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από την επίδραση των AGEs έδειξαν πως η έκφραση του παρέμεινε αμετάβλητη γεγονός που υποδεικνύει πως η υφιστάμενη ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών έχει να κάνει με την υπερ-ενεργοποίηση του άξονα AGE-RAGE και όχι με μια αύξηση της σηματοδότησης που θα προκαλούταν από περισσότερα μόρια του μεμβρανικού υποδοχέα.

Η LOX αποτελεί το κύριο ένζυμο σύνθεσης του κολλαγόνου και της ελαστίνης στο ενδοθήλιο, καταλύοντας τη δημιουργία διασυνδέσεων και συμμετέχοντας ενεργά στην αναδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην αγγειακή ομοίωση. Υψηλά επίπεδα γλυκόζης στη κυκλοφορία καθώς και συνθήκες υποξίας, έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στην έκφραση της LOX με πιθανές επιπτώσεις στο ενδοθήλιο. Παράλληλα, οι ίδιες καταστάσεις οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα AGEs στην κυκλοφορία και εναπόθεση τους στους ιστούς, συσχετίζοντάς τα με αγγειακή βλάβη και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση των AGEs στη ρύθμιση της γονιδιακής/πρωτεϊνικής έκφρασης της LOX σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η χορήγηση AGE-BSA σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως και στην περίπτωση της ET-1 επάγει σημαντικά τη μεταγραφή του γονιδίου της LOX κατά ένα χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς και την πρωτεϊνική της έκφραση. Η επαγωγή αυτή διαμεσολαβείται και πάλι από την ενεργοποίηση και πρόσδεση στον υποκινητή του *LOX* των επαγόμενων από τα AGEs μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1. Η αυξημένη έκφραση της LOX στο ενδοθήλιο αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό απορρύθμισης της λειτουργίας και της ακεραιότητας της θεμέλιας ουσίας, η οποία χαρακτηρίζει την πρόωρη γήρανση, τις διαβητικές μικροαγγειακές επιπλοκές και το ΣΠΩ. Άλλωστε η γονιδιακή ρύθμιση της *LOX* από τους ίδιους μεταγραφικούς παράγοντες σε ωθητικό ιστό από ΣΠΩ το οποίο χαρακτηρίζεται από αυξημένη εναπόθεση των AGEs, RAGE, p-ERK1/2, p-c-JUN και NF-κB έχει δειχθεί από την ομάδα μας [62]. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε την υπερ-έκφραση και την αυξημένη ενεργότητα της LOX σε ενδοθηλιακά κύτταρα από αμφιβληστροειδή ποντικών όταν αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης [189]. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν τη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου *LOX* από τους AGE-επαγόμενους μεταγραφικούς

παράγοντες NF-κB και AP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αυξημένη έκφραση της LOX στο ενδοθήλιο αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό απορρύθμισης της λειτουργίας και της ακεραιότητας της θεμέλιας ουσίας.

Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση αορτικού ενδοθηλίου φυσιολογικών επίμυων κατέδειξε υψηλή έκφραση και συνεντοπισμό των AGEs, RAGE, ET-1 και LOX στην ομάδα ζώων που είχε λάβει δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs, σε σχέση με τους μάρτυρες. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης των LOX και ET-1 μέσω ενεργοποίησης του άξονα AGE-RAGE καθώς και η γονιδιακή τους ρύθμιση από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1, αποτελεί ένα πιθανό ενδοκυττάριο μοριακό μηχανισμό που συμβάλλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηριστική της παχυσαρκίας, των μικροαγγειακών διαβητικών επιπλοκών, της αθηρογένεσης και του ΣΠΩ.

Η στενή σύνδεση των AGEs με το οξειδωτικό στρες, τις συνθήκες χαμηλής ή υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, της μεσολαβούμενης από τον RAGE φλεγμονής, της υποξίας και της γήρανσης τα κατατάσσει ως πιθανούς συντελεστές της ολοκληρωμένης απόκρισης του ΕΔ στη μεταβολική ρύθμιση [166].

Είναι γνωστό ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) μέσω οξειδωτικού στρες ενισχύει τον σχηματισμό των AGEs και για το λόγο αυτό τροποποιεί την πρωτεϊνική λειτουργία. Οι ROS, ωστόσο, παρεμβαίνουν επίσης στη διαδικασία πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών οδηγώντας σε μη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ΕΔ. Επιπλέον, η παρουσία των ROS ενισχύει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και τη συσσώρευση λιπιδίων, προκαλώντας στρες του ΕΔ ακολουθούμενο από αντίσταση στην ινσουλίνη [190].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρόσληψη διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά μπορεί να προκαλέσει τόσο σχηματισμό των AGEs όσο και οξειδωτικό στρες, το οποίο περαιτέρω έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία στρες του ΕΔ, διαταράσσοντας τη δράση της ινσουλίνης μέσω φωσφορυλίωσης του υποστρώματος I του υποδοχέα της ινσουλίνης σε ηπατικό ή λιπώδη ιστό ποντικών, διατροφικών και γενετικών μοντέλων της παχυσαρκίας [167].

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, αυξημένα επίπεδα AGEs και ROS παρατηρήθηκαν στον υπόκαμπο των ποντικών που τρέφονταν με μια πλούσια σε χοληστερόλη διατροφή, τα οποία προκάλεσαν την επαγωγή του στρες του ΕΔ μέσω της αυξημένης φωσφορυλίωσης των PERK και eIF2α. Το στρες του ΕΔ περαιτέρω διατάραξε τη σηματοδότηση της ινσουλίνης αυξάνοντας φωσφορυλίωση του IRS1, μειώνοντας τη δραστηριότητα της PI3/Akt και επάγοντας την ενεργοποίηση του NF-κΒ [191].

Έμμεση απόδειξη της παθογόνου αλληλεξάρτησης της παραγωγής ROS, της προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και του στρες του ΕΔ προέρχεται επίσης από μελέτες με αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD). Διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν στον υπόκαμπο SOD χαλκού-ψευδαργύρου παρουσίασαν ελαττωμένο ισχαιμικό νευρωνικό κυτταρικό θάνατο με τη συμμετοχή των μεταγραφικών παράγοντων ATF4 και CHOP σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά [192]. Ομοίως, ποντικοί με ανεπάρκεια σε κυτταροπλασματική SOD χαλκού-ψευδαργύρου παρουσίασαν αυξημένη πλάκα και νευρωνική φλεγμονή, που συνοδεύτηκε από την παραγωγή AGEs (CML) και οξειδωτική βλάβη που οδήγησε σε δυσλειτουργία της μνήμης [193]. Επιπλέον, σε καλλιέργειες κυττάρων του εγγύς νεφρικού σωληναρίου, το κάδμιο ήταν ικανό να επάγει την αυξημένη παραγωγή ROS και το επακόλουθο στρες του ΕΔ οδηγώντας σε απόπτωση, κάτι που αποτράπηκε όταν τα κύτταρα διαμολύθηκαν με SOD μαγγανίου [194]. Εκτός αυτού, η SOD μαγγανίου βρέθηκε να μετριάζει την προχωρημένη γλυκοζυλίωση και την παραγωγή μεθυλογλυοξάλης μειώνοντας την παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια των ανθρώπινων αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης [195].

Χαμηλά επίπεδα γλυκόζης λόγω στέρησης τροφής ή άλλης μεταβολικής δυσλειτουργίας που οδηγεί σε απώλεια ενέργειας έχουν δυσμενή επίδραση στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο αυλό του ΕΔ. Η υπεργλυκαιμία από την άλλη πλευρά είναι η κύρια αιτία του σχηματισμού ROS που εμπλέκονται στο σχηματισμό AGEs και της επαγωγής του στρες του ΕΔ, μεσολαβώντας περαιτέρω στις μεταβολικές επιπλοκές του διαβήτη, της παχυσαρκίας και νευροεκφυλισμού. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την αυξημένη παραγωγή ROS λόγω της υψηλής γλυκόζης, η οποία ενισχύει το

σχηματισμό των προδρόμων μορφών των AGEs και την προχωρημένη γλυκοζυλίωση συμβάλλοντας στις εκδηλώσεις του στρες του ΕΔ, όπως η φλεγμονή. Επιπλέον, πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο ΕΔ (μοριακοί συνοδοί ή πρωτεΐνες αισθητήρες της αναδίπλωσης) οι οποίες ελέγχουν την πρωτεϊνική αναδίπλωση μπορούν επίσης να τροποποιηθούν μέσω οξειδωσης ή γλυκοζυλίωσης μεταβάλλοντας την προσαρμοστική ικανότητα του UPR [166].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι AGE-RAGE στο ενδοθήλιο μπορεί να προκαλεί την ενεργοποίηση του NF-κΒ είτε απευθείας είτε μέσω του καταρράκτη των MAP κινασών (ERK1/2 και p38) καταλήγοντας στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών [5, 196-198]. Οι κυτταροκίνες είναι επίσης σε θέση να επάγουν το στρες του ΕΔ που οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή, υποδεικνύοντας ότι οι επιδράσεις της προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και του στρες του ΕΔ μπορεί να διαμεσολαβούνται μέσω του RAGE. Επιπρόσθετα, μια μελέτη σε βρεφική νευρωνική κηροειδή λιποφουσκίνωση (infantile neuronal ceroid lipofuscinoses, INCL) έδειξε ότι το αυξημένο στρες του ΕΔ διέγειρε την έκφραση των S100B και RAGE στα αστρογλοιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ως εκ τούτου, το στρες του ΕΔ μπορεί να επάγει περαιτέρω τη σηματοδότηση AGE-RAGE, επιδεινώνοντας το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή.

Η πρωτεϊνική αναδίπλωση μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από συνθήκες υποξίας, όπου η ανώμαλη παροχή οξυγόνου ή η απώλεια ενέργειας λόγω μεταβολικών διαταραχών μπορούν να εμφανιστούν. Το προκύπτον φορτίο μη σωστά αναδιπλωμένων και συσσωρευμένων πρωτεϊνών επάγει το στρες του ΕΔ [199]. Η συσσώρευση των AGEs και η σηματοδότηση του προαποπτωτικού UPR έχουν παρατηρηθεί σε συνθήκες υποξικής επαναιμάτωσης ή ισχαιμίας της καρδιάς, των νεφρών ή του εγκεφάλου, υποδηλώνοντας το ρόλο τους στην παθογένεση της υποξικής βλάβης [200, 201]. Μελέτες που έχουν επικεντρωθεί σε νεφρική βλάβη υπό αυτές τις συνθήκες επισημαίνουν την αυξημένη κυτταροτοξικότητα της μεθυλογλυοζάλης, η οποία οδηγεί σε απόπτωση μέσω του στρες του ΕΔ.

Εξάλλου, η αναστολή της μεθυλογλυοζάλης από την γλυοζαλάση I, ένα ένζυμο αποτοξίνωσης από τα AGEs, ή η αναστολή του UPR μέσω υπερέκφρασης της GRP78 βελτιώνει περαιτέρω τη βλάβη των νεφρών [199-201]. Το υποξικό

περιβάλλον είναι συνήθως ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των νεοπλασματικών κυττάρων που οφείλονται στην κακή αγγείωση των περισσότερων στερεών όγκων, οδηγώντας σε στρες του ΕΔ και στην απώλεια ενέργειας. Ως εκ τούτου το επαγόμενο από την υποξία UPR είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων του όγκου [202, 203]. Η επαγόμενη έκφραση της GRP78 σε κύτταρα όγκου βελτιώνει την πρωτεϊνική αναδίπλωση και συσχετίζεται θετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μετάσταση και την αντίσταση στη θεραπεία [204]. Επιπλέον, η παρουσία των AGEs είναι επίσης αυξημένη σε ένα ευρύ φάσμα όγκων όπου συσχετίζεται με τη μετάσταση και μειωμένη τη επιβίωση, εμπλέκοντας τα AGEs και στρες του ΕΔ στην ογκογένεση [205].

Η διαδικασία της γήρανσης έχει αδιαμφισβήτητα συσχετιστεί με την παρουσία αυξημένων επίπεδων των AGEs που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των χρόνιων διαβητικών επιπλοκών καθώς και άλλων σχετιζόμενων με τη γήρανση ασθενειών. Την ίδια στιγμή, οι μοριακοί συνοδοί και τα ένζυμα που εντοπίζονται στο ΕΔ, υφίστανται αλλοιώσεις λόγω γήρανσης θέτοντας σε μεγαλύτερο κίνδυνο τις προσαρμοστικές ιδιότητες του UPR [206]. Δύο μελέτες που διεξήχθησαν στο νηματώδη σκόληκα *Caenorhabditis elegans* υπογραμμίζουν το ρόλο των AGEs και του στρες του ΕΔ στη γήρανση. Συγκεκριμένα, σε *C. elegans* που υπερεκφράζουν την ομόλογη πρωτεΐνη της γλυοξαλάσης I ή έχουν ανεπάρκεια στον HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), ένα υποξικό μεταγραφικό παράγοντα, παρατηρήθηκε αυξημένη διάρκεια ζωής λόγω ελάττωσης των ROS ή του στρες του ΕΔ, αντίστοιχα [207, 208]. Ο συνδυασμός των δύο παρεμβάσεων μπορεί να είναι το μυστικό της κυτταρικής ομοιόστασης και μακροζωίας.

Η μοριακή διασυννομία της προχωρημένης γλυκοζυλίωσης με τη σηματοδότηση του στρες του ΕΔ κρύβεται πίσω από την παθοφυσιολογία πολλών διαταραχών που σχετίζονται με το μεταβολισμό, καθώς και ισχαιμικών και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι ορισμένοι αναστολείς της προχωρημένης γλυκοζυλίωσης μπορεί να αποδειχθούν ευεργετικοί για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ΕΔ μέσω τροποποίησης της απόκρισης του UPR [166].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν πρωτογενείς δυναμικές δομές οι οποίες ρυθμίζουν ενεργητικά τον βασικό αγγειακό τόνο και την αντιδραστικότητα σε

φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Αυτά αποκρίνονται σε νευροχυμικούς μεσολαβητές και μηχανικές δυνάμεις ώστε να διατηρούν την ισορροπία μεταξύ αγγειοσυστολής και αγγειοδιαστολής, να αποκαθιστούν την ρευστότητα του αίματος και την ακεραιότητα αγγειακού τοιχώματος [209].

Τα AGEs έχει δειχθεί ότι συμβάλλουν στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αυτό είναι ξεκάθαρα αποδεδειγμένο στον διαβήτη, όπου τα επίπεδα των AGEs σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 σχετίζονταν αρνητικά με το βαθμό της εξαρτώμενης και της μη εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής [210]. Αρκετοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν αυτή τη σύνδεση. Μεταξύ αυτών, η ελάττωση από τα AGEs της βιοδιαθεσιμότητας και τη δραστηριότητας του προερχόμενου από το ενδοθήλιο μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO) [211].

Η σχετιζόμενη με τα AGEs επαγωγή του οξειδωτικού στρες μπορεί να αποσβήσει και να απενεργοποιήσει το προερχόμενο από ενδοθήλιο NO και την ενεργότητα της ασύζευκτης ενδοθηλιακής συνθάση του NO (endothelial synthase, eNOS) μέσω της μεσολαβούμενης από υποδοχέα φωσφορυλίωσης και αυξημένης αποικοδόμησης της eNOS [212, 213]. Επιπλέον, τα AGEs μπορούν να βλάψουν την ενδοθηλιακή ισορροπία μειώνοντας την ενδοθηλιακή παραγωγή προστακυκλίνης [214] και την ενισχύοντας την έκφραση της ET-1 [186]. Επίσης, είναι ικανά να αυξάνουν την ενδοθηλιακή διαπερατότητα σε μακρομόρια [5, 215] και να τροποποιούν τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων προάγοντας την απόπτωση και τη μετανάστευσή τους [216]. Η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που οφείλεται στα AGEs έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες χρησιμοποιώντας βόεια και ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα και έχει αποδοθεί κατά κύριο λόγο στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες και στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία [217].

Στη διατριβή αυτή, δείχνουμε την επαγόμενη από AGEs απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του μονοπατιού του στρες ΕΔ, παρέχοντας ένα νέο μοριακό μηχανισμό για την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε μεταβολικές και καρδιαγγειακές διαταραχές.

Το ΕΔ είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στην διαθεσιμότητα της γλυκόζης ενώ εξαρτάται από τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα για την εξοικονόμηση της ενέργειας

που απαιτείται για την διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών [218]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα όντας πάντα εκτεθειμένα σε αυξήσεις και μειώσεις των θρεπτικών συστατικών του αίματος, είναι πολύ δυναμικά και μεταβολικά ενεργά κύτταρα, με υψηλό όγκο της πρωτεϊνικής σύνθεσης που τα προδιαθέτει για στρες του ΕΔ [219]. Ειδικότερα τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν μπορούν να αντέξουν τη συνεχιζόμενη έκθεση σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης και έτσι το στρες του ΕΔ ξεκινά συχνά σε ένα διαβητικό περιβάλλον [220].

Υποτέθηκε συνεπώς ότι το στρες του ΕΔ μπορεί επίσης να επαχθεί σε αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (HAECs) κάτω από συνθήκες αυξημένης εξωγενούς πρόσληψης γλυκοζυλιωμένης πρωτεϊνών (AGEs). Πράγματι, η επώαση των HAECs με υψηλά επίπεδα AGEs για παρατεταμένες διάρκειες (48 ώρες και 72 ώρες) ήταν ικανή να μειώσει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η μείωση αυτή συνοδεύτηκε από αυξημένα επίπεδα mRNA καθώς και πρωτεϊνικά επίπεδα των μοριών «αισθητήρων» (GRP78, GRP94) δεικτών της επαγωγής του στρες του ΕΔ.

Αξιοσημείωτα, στους μικρότερους χρόνους επώασης με το AGE-BSA (24 και 48 ώρες), η ενεργοποίηση του μεταγραφικού ενεργοποιητή, XBP-1, παρατηρήθηκε ότι μεσολαβεί την προσαρμοστική απόκριση UPR. Οι τρεις κλάδοι του UPR (IRE1, PERK, και ATF6) έχει αναφερθεί ότι προωθούν αρχικά την κυτταρική επιβίωση μειώνοντας τα επίπεδα των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών αλλά όταν το στρες του ΕΔ έχει μετριαστεί τότε η σηματοδότηση του UPR προωθεί τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Αυτό είναι επίσης δυνατόν να συμβεί κάτω από την συσσώρευση των AGEs, τα οποία είναι ικανά να ενεργοποιούν τόσο προστατευτικές αποκρίσεις όσο και αποκρίσεις κυτταρικού θανάτου ανάλογα με τη συγκέντρωση τους και της διάρκειας της παρουσίας τους. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, δείξαμε ότι η δραστηριότητα του IRE1 (όπως υποδεικνύεται από την έκφραση του XBP-1) αυξήθηκε στο πρώιμο επαγόμενο στρες του ΕΔ (24 ώρες) και εξασθένησε στο παρατεταμένο στρες του ΕΔ (48 και 72 ώρες). Ο IRE1 είναι μια διαμεμβρανική κινάση (ενδοριβονουκλεάσης, RNAαση), που μετά την ενεργοποίησή του, ξεκινά το μη συμβατικό μάτισμα του mRNA του Xbp-1 [135, 151]. Το mRNA του ματισμένου Xbp-1 (spliced Xbp-1) κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή ο οποίος κατευθύνει τη μεταγραφή

γονιδίων όπως οι μοριακοί συνοδοί του ΕΔ, των οποίων τα προϊόντα άμεσα συμμετέχουν στην πρωτεϊνική αναδίπλωση στο ΕΔ [221]. Αντίθετα, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η σηματοδότηση του PERK συμπεριλαμβανομένης της μεταφραστικής αναστολής (μέσω φωσφορυλίωσης του eIF2α) και την επαγωγή του προαποπτωτικού μεταγραφικού ρυθμιστή CHOP διατηρήθηκε στις 48 και 72 ώρες επώασης με AGEs. Ο PERK είναι μια διαμεμβρανική κινάση που φωσφορυλιώνει τον παράγοντα έναρξης της ευκαρυωτικής μετάφρασης 2α (eIF2-α, eukaryotic translation initiation factor 2α), μειώνοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση εξουδετερώνοντας έτσι το την πρωτεϊνική υπερφόρτωση στο ΕΔ [222]. Επιπρόσθετα το CHOP είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επάγεται από τον κλάδο του PERK του UPR ο οποίος προάγει τον κυτταρικό θάνατο [222]. Τα mRNA επίπεδα του CHOP ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στις 48 ώρες επώασης και σε 200μg/ml AGEs συγκρινόμενα με τους μάρτυρες και παρέμειναν αυξημένα στις 72 ώρες και στις δύο συγκεντρώσεις, ενδεικτικό της προαποπτωτικής σηματοδότησης. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια μέσω αναλύσης με κυτταρομετρία ροής διπλής φθορίζουσας χρώσης των διεγερμένων με AGEs HAEC, χρησιμοποιώντας τον πρώιμο αποπτωτικό δείκτη, αννεξίνη V και πυρηνική χρώση ιωδιούχο προπίδιο. Στατιστικά σημαντικά αυξημένος κυτταρικός αριθμός πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων εντοπίστηκε ακολουθούμενος την επώαση με AGEs για 48 και 72 ώρες. Η ήπια αύξηση στους πρώιμους και όψιμους αποπτωτικούς κυτταρικούς πληθυσμούς μετά από επώαση με AGEs συνδυασμένα με τουνικαμυκίνη συγκριτικά με μεμονωμένη την τουνικαμυκίνη υπέδειξε ότι οι δύο παράγοντες μοιράζονται κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια στην επαγωγή της απόπτωσης στα HAEC. Αρκετές μελέτες σε άλλα κυτταρικά συστήματα προτείνουν ότι η μεσολαβούμενη από τα AGEs απόπτωση θα μπορούσε να επάγεται από ένα μονοπάτι του ΕΔ ανεξάρτητο από τα μιτοχόνδρια [178, 223]. Πιο συγκεκριμένα, η επαγόμενη από τα AGEs έκφραση του GRP78 ως αισθητήρα του ΕΔ σχετίστηκε με αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου και την απόπτωση σε ποδοκύτταρα από ποντίκια [178]. Επιπλέον, η 3-δεοξυγλυκοζόνη, ένα ενδιάμεσο προϊόν των AGEs που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε δερματικά μοσχεύματα από διαβητικές πληγές, βρέθηκε να μεσολαβεί την επαγόμενη από το στρες του ΕΔ απόπτωση μέσω σχηματισμού οξειδωτικού στρες σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες μέσω ενός μηχανισμού που ήταν ανεξάρτητος από τον RAGE [223]. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι προηγούμενες μελέτες

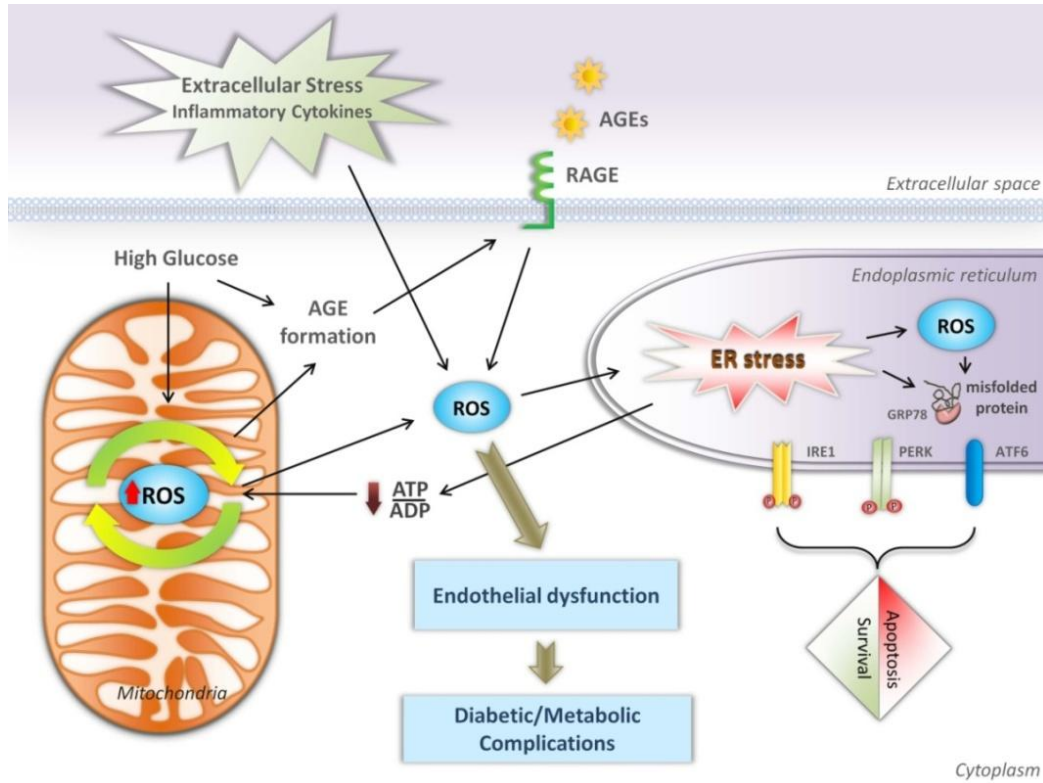
της AGE-επαγόμενης απόπτωσης περιορίζονται στη μεσολάβηση του αυξημένου οξειδωτικού στρες που ακολουθεί την αλληλεπίδραση των AGEs με τον υποδοχέα τους [34, 217].

Αποτελεί για το λόγο αυτό απόδειξη ότι εξαιτίας της ετερογένειας των συστατικών των AGEs και του μεγάλου εύρους των ενδιάμεσων προϊόντων τους, διαφορική σηματοδότηση μπορεί να επιλέγεται εξαρτώμενη όχι μόνο από τον κυτταρικό τύπο αλλά από την κατάσταση των μορίων των AGEs που βρίσκονται είτε ως κυκλοφορούντα είτε σε μορφή δεσμευμένη με πρωτεΐνες. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται ώστε να διαλευκανθεί η αναγκαιότητα του RAGE στην επαγωγή του στρες του ΕΔ στα ενδοθηλιακά κύτταρα κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σε AGEs.

Εκτός αυτού, επειδή το στρες του ΕΔ ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή βιοενεργητική, μια πιθανή μοριακή διασυνομιλία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της επαγόμενης από το στρες του ΕΔ απόπτωσης δεν μπορεί να αποκλειστεί και θα πρέπει να διερευνηθεί σε βάθος (Εικόνα 5.1). Παρόλα αυτά τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η λειτουργία του ΕΔ μπορεί να τροποποιηθεί από τα AGEs επηρεάζοντας σημαντικά τόσο τη λειτουργικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και την κυτταρική τους τύχη. Έτσι, η χημική ενίσχυση της λειτουργίας του ΕΔ ώστε να αντιμετωπίσει την κυτταρική απόπτωση παρέχει μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση στο χειρισμό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Φαρμακευτικοί ή χημικοί μοριακοί συνοδοί αντιπροσωπευτικά μιας ομάδας χαμηλού μοριακού βάρους συστατικών που είναι γνωστό ότι σταθεροποιούν την πρωτεϊνική διαμόρφωση η οποία βελτιώνει τη δυνατότητα αναδίπλωσης και διευκολύνουν τη διακίνηση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών [166, 199]. Η αποτελεσματικότητα αυτών των μορίων στην ανακούφιση της ενδοθηλιακής βλάβης είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό άλλα φάρμακα μένει να διερευνηθεί.

Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής δείχνουν την αμοιβαία επαγωγή των AGEs και του στρες του ΕΔ. Οι βασικοί μεσολαβητές αυτής της μοριακής διασυνομιλίας φαίνονται να είναι το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται στα μιτοχόνδρια ή το ΕΔ, η φλεγμονή και η υπεργλυκαιμία (Εικόνα 5.1). Η διατήρηση ή ενίσχυση της σωστής λειτουργίας του ΕΔ μέσω συντονισμένης ρύθμισης των

πρωτεϊνών αναδίπλωσης-μοριακών συνοδών, μεταβολικών ορμονών με προστατευτικό ρόλο και την άμεση στόχευση των εμπλεκόμενων μεταγραφικών παραγόντων σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς μπορεί να αποδειχθεί ένα ισχυρό εργαλείο στην θεραπεία χρόνιων μεταβολικών νοσημάτων.



Εικόνα 5.1 : Παράλληλη και γραμμική επαγωγή του στρες από τα AGEs και του ΕΔ στην παθολογία των μεταβολικών διαταραχών. Η μεταβολή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ή η υπερπαραγωγή ROS είναι το πρωταρχικό και βασικό γεγονός στην παθογένεση των διαβητικών/μεταβολικών επιπλοκών [166].

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Monnier, V. M. (2003) Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*, 419, 1-15.
- [2] Ahmed, N. (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 67, 3-21.
- [3] Rahbar, S., Blumenfeld, O., & Ranney, H. M. (1969) Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*, 36, 838-843.
- [4] Peyroux, J., & Sternberg, M. (2006) Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)*, 54, 405-419.
- [5] Basta, G., Schmidt, A. M., & De Caterina, R. (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*, 63, 582-592.
- [6] Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H., & Reusch, J. E. (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, 29, 1420-1432.
- [7] Ramasamy R, Yan S. F., & Schmidt A. M. (2005) The RAGE axis and endothelial dysfunction: maladaptive roles in the diabetic vasculature and beyond. *Trends Cardiovasc Med*, 15, 237-243.
- [8] Januszewski A.S., Alderson N.L., Metz T.O., Thorpe S.R., Baynes J.W. (2003) Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes *Biochem Soc Trans*, 31,1413-1416.
- [9] Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. (1999), The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation *J Clin Invest*, 104, 103-113.
- [10] Anderson M.M., Heinecke J.W. (2003) Production of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase: a role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation *Diabetes*, 52,2137-2143.
- [11] Sebekova K., Somoza V. (2007) Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects, *PRO Mol Nutr Food Res*, 51, 1079-1084.
- [12] Meerwaldt, R., Links, T., Zeebregts, C., Tio, R., Hillebrands, J. L., & Smit, A. (2008) The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 7, 29.
- [13] Yan, S. F., Ramasamy, R., & Schmidt, A. M. (2010) Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol*, 79, 1379-1386.
- [14] Kalea, A. Z., Schmidt, A. M., & Hudson, B. I. (2009) RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)*, 116, 621-637.
- [15] Malherbe, P., Richards, J. G., Gaillard, H., Thompson, A., Diener, C., Schuler, A., et al. (1999) cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res*, 71, 159-170.

- [16] Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Petrova, R. G., Abedin, M. J., Li, H., et al. (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*, 370, 1097-1109.
- [17] Schlueter, C., Hauke, S., Flohr, A. M., Rogalla, P., & Bullerdiek, J. (2003) Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta*, 1630, 1-6.
- [18] Park, I. H., Yeon, S. I., Youn, J. H., Choi, J. E., Sasaki, N., Choi, I. H., et al. (2004) Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol*, 40, 1203-1211.
- [19] Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., et al. (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*, 83, 876-886.
- [20] Ishihara, K., Tsutsumi, K., Kawane, S., Nakajima, M., & Kasaoka, T. (2003) The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett*, 550, 107-113.
- [21] Hudson, B. I., Kalea, A. Z., Del Mar Arriero, M., Harja, E., Boulanger, E., D'Agati, V., et al. (2008) Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*, 283, 34457-34468.
- [22] Dattilo, B. M., Fritz, G., Leclerc, E., Kooi, C. W., Heizmann, C. W., & Chazin, W. J. (2007) The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*, 46, 6957-6970.
- [23] Ostendorp, T., Leclerc, E., Galichet, A., Koch, M., Demling, N., Weigle, B., et al. (2007) Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*, 26, 3868-3878.
- [24] Xie, J., Reverdatto, S., Frolov, A., Hoffmann, R., Burz, D. S., & Shekhtman, A. (2008) Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*, 283, 27255-27269.
- [25] Chaney, M. O., Stine, W. B., Kokjohn, T. A., Kuo, Y. M., Esh, C., Rahman, A., et al. (2005) RAGE and amyloid beta interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim Biophys Acta*, 1741, 199-205.
- [26] Rojas A., Delgado-López F., González I., Pérez-Castro R., Romero J., Rojas I. (2013) The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor, *Cell Signal*, 25, 609-614
- [27] Mahajan N, Dhawan V. (2013) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in vascular and inflammatory diseases, *Int J Cardiol*, May 27. doi:pii: S0167-5273(13)00922-4.
- [28] Schmidt A.M., Vianna M., Gerlach M., Brett J., Ryan J., Kao J., et al. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*, 14987-14997.
- [29] Riehl A, Németh J, Angel P, Hess J. (2009) The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal*, 7,12.

- [30] Li J., Schmidt A.M. (1997) Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 272,16498-16506.
- [31] Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*, 143, 1699-1712.
- [32] Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, et al. (2011) TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One*, 6:e23132.
- [33] Hu P, Lai D, Lu P, Gao J, He H. (2012) ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med*, 29,613-618.
- [34] Xiang Y, Li Q, Li M, Wang W, Cui C, Zhang J. (2011) Ghrelin inhibits AGEs-induced apoptosis in human endothelial cells involving ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Cell Biochem Funct*, 29, 149-155.
- [35] Liu Y, Liang C, Liu X, Liao B, Pan X, Ren Y, et al.(2010) AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis*, 208, 34-42.
- [36] Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT. (2007) Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C850-C856.
- [37] Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, et al. (2002) Advanced glycation end products induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* ;290:973-978.
- [38] Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, et al. (2004) AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int.*;66:2137-2147.
- [39] Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. (2012) Oral advanced glycation end products (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*;109:15888-15893.
- [40] Molinari J, Ruzsova E, Velebny V, Robert L. (2008) Effect of advanced glycation endproducts on gene expression profiles of human dermal fibroblasts. *Biogerontology*;9:177-182.
- [41] Bansal S, Siddarth M, Chawla D, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. (2012) Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro. *Mol Cell Biochem*;361:289-296.
- [42] Nedić O, Rattan SI, Grune T, Trougakos IP. (2013) Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res.* Aug;47 Suppl 1:28-38. doi: 10.3109/10715762.2013.806798.

- [43] Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*;280:E685-E694.
- [44] Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, et al. (2009) RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol*;20:7425-752.
- [45] Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H. (2006) Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*;103:13801-13806.
- [46] Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. (2008) AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66 shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*;294:C145-C152.
- [47] Nagai R, Mera K, Nakajou K, Fujiwara Y, Iwao Y, Imai H, et al. (2007) The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochim Biophys Acta*;1772:1192-1198.
- [48] Pluddemann A, Neyen C, Gordon S. (2007) Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*;43:207-217.
- [49] Saito A, Takeda T, Hama H, Oyama Y, Hosaka H, Tanuma A, et al. (2005) Role of megalin, a proximal tubular endocytic receptor, in the pathogenesis of diabetic and metabolic syndrome-related nephropathies: Protein metabolic overload hypothesis. *Nephrology* 10:S26-S31.
- [50] Rojas A, Delgado-Lopez F, Gonzalez I, Perez-Castro R, Romero J, Rojas (2013) The receptor for advanced glycation end-products: A complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cell Signall*, 25, 609-614.
- [51] Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res. Sep* 1;63(4):582-92.
- [52] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern DM. (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products—a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, 84:489–97.
- [53] Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22(4), 954–65.
- [54] Murphy LO, Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 31(5), 268–75.
- [55] Pimienta G, Pascual J (2007) Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 6(21), 2628–32.
- [56] Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26(22), 3100–12.
- [57] Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26(22), 3240–53.
- [58] Zhang Y, Dong C (2007) Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(21), 2771–89.

- [59] Kate L. Jeffrey, Montserrat Camps, Christian Rommel & Charles R. Mackay (2007) Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 391-403
- [60] Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, Papavassiliou AG, Duleba AJ. (2007) Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol.* 127(6): p. 581-9.
- [61] Diamanti-Kandarakis, E., Piperi C, Korkolopoulou P, Kandarakis E, Levidou G, Papalois A, Patsouris E, Papavassiliou AG., (2007). Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med (Berl)*, 85, p. 1413-20.
- [62] Papachroni KK, Piperi C, Levidou G, Korkolopoulou P, Pawelczyk L, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. (2010) Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *J Cell Mol Med.* 14:2460-9.
- [63] Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Creatsas G, Kalofoutis A (2005) Increased levels of Advanced glycation end products in women with polycystic ovary syndrome *Clin Endocrinol* 62, 37-43
- [64] Diamanti-Kandarakis, E. and A. Dunaif, (1996) New perspectives in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab.*, 7, 267-71.
- [65] Diamanti-Kandarakis, E., et al., (1999) A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab.*, 84, 4006-4011.
- [66] Clement F, Monniaux D, Thalabard JC, Claude D. (2002) Contribution of a mathematical modelling approach to the understanding of the ovarian function. *C R Biol.*; 325: 473-85
- [67] Aronson D. (2003) Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hyperten.*; 21: 3-12
- [68] Facchiano F, Lentini A, Fogliano V, et al. (2002) Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces its angiogenic activity in vivo. *Am J Pathol.*; 161: 531-41
- [69] Verzijl N, Degroot J, Ben ZC, et al. (2002) Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthr Rheumatism.*; 46: 114-23
- [70] Abe H, Matsubara T, Iehara N, et al. Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 14201-6
- [71] Auersperg N, Maines-bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA. Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest.* 1994; 71: 510-8
- [72] Kruk PA, Auersperg N. (1994) A line of rat ovarian surface epithelium provides a continuous source of complex extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 30A: 217-25
- [73] Woessner JF, JR. Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution. *Biochem J.* 1962; 83: 304-14

- [74] Royce PM, Camakaris J, Danks DM. (1980) Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *Biochem J.*; 192: 579-86
- [75] Kuivaniemi H, Peltonen L, Kivirikko KI. (1985) Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am J Hum Gen.*; 37, 798-808
- [76] Murawaki Y, Kusakabe Y, Hirayama C. (1991) Serum lysyl oxidase activity in chronic liver disease in comparison with serum levels of prolyl hydroxylase and laminin. *Hepatology.*; 14: 1167-73
- [77] Riley DJ, Kerr JS, Berg RA, et al. (1982) Beta-Aminopropionitrile prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the hamster. *Am Rev Resp Dis.*; 125: 67-73
- [78] Di donato A, Ghiggeri GM, Di duca M, et al. (1997) Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy. *Nephron.*; 76: 192-200
- [79] Trivedy C, WArnakulasuriya KA, Hazarey VK, et al. (1999) The upregulation of lysyl oxidase in oral submucous fibrosis and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.*; 28: 246-51
- [80] Sommer P, Gleyzal C, Raccurt M, et al. (1993) Transient expression of lysyl oxidase by liver myofibroblasts in murine schistosomiasis. *Lab Invest.*; 69: 460-70
- [81] Jourdan-Le Saux C, Gleyzal C, Garnier JM, et al. (1994) Lysyl oxidase cDNA of myofibroblast from mouse fibrotic liver. *Biochem Biophys Res Commun.*; 199: 587-92
- [82] Decitre M, Gleyzal C, Raccurt M, et al. (1998) Lysyl oxidase-like protein localizes to sites of de novo fibrinogenesis in fibrosis and in the early stromal reaction of ductal breast carcinomas. *Lab Invest.*; 78: 143-51
- [83] Chanoki M, Ishii M, Kobayashi H, et al. (1995) Increased expression of lysyl oxidase in skin with scleroderma. *British J Dermatol.*; 133: 710-5
- [84] Himeno N. (1986) Effect of prostaglandins on collagen synthesis in rabbit ovarian follicles during the ovulatory process. *Nippon Naibunpi Gakkai zasshi.*; 62: 1181-1193
- [85] Slee RB, Hillier SG, Lague P, et al. (2001) Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. *Endocrinology.*; 142: 1082-9
- [86] Kendall NR, Marsters P, Scaramuzzi RJ, Campbell BK (2003). Expression of lysyl oxidase and effect of copper chloride and ammonium tetrathiomolybdate on bovine ovarian follicle granulosa cells cultured in serum-free media. *Reproduction.*; 125: 657-65
- [87] Harlow CR, Rae M, Davidson L, et al. (2003) Lysyl oxidase gene expression and enzyme activity in the rat ovary: regulation by follicle-stimulating hormone, androgen, and transforming growth factor-beta superfamily members in vitro. *Endocrinology.*; 144: 154-62
- [88] Henmi H, Endo T, Nagasawa K, et al. (2001) Lysyl Oxidase and MMP-2 expression in Dehydroepiandrosterone-induced Polycystic Ovary in rats. *Biol Reproduct.*; 64: 157-62
- [89] Christakou, C., Christakou C, Economou F, Livadas S, Piperi C, Adamopoulos C, Marinakis E, Jdiamanti-Kandarakis E., Strong and positive association of endothelin-1 with AGEs in PCOS: a causal relationship or a bystander? *Hormones (Athens)*. 10(4): p. 292-7.

- [90] Kaya, C., Kaya C, Erkan AF, Cengiz SD, Dündar I, Demirel OE, Bilgihan A. (2009) Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 92(4): p. 1372-7.
- [91] Tatone, C. and F. Amicarelli, (2013) The aging ovary-the poor granulosa cells. *Fertil Steril.* 99(1): p. 12-7.
- [92] Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, et al. (1994) Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA.*;91:7742-6.
- [93] Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. (1995) Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest.*;96:1395-403.
- [94] Onat D, Brillon D, Colombo PC, Schmidt AM. (2011) Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Diab Rep.* Jun;11(3):193-202.
- [95] Zhou, Z., Wang, K., Penn, M. S., Marso, S. P., Lauer, M. A., Forudi, F., et al. (2003) Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation*, 107, 2238-2243.
- [96] Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G. (1998) Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion. *J Clin Invest.*; 101: 1905-1915. Medline
- [97] Edelstein D, Brownlee M. (1992) Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes.*; 41: 26-29.
- [98] Bucala, R., Tracey, K. J., & Cerami, A. (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 87, 432-438.
- [99] Aronson, D., & Rayfield, E. J. (2002) How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol*, 1, 1.
- [100] Zhang, J., Ren, S., Sun, D., & Shen, G. X. (1998) Influence of glycation on LDL-induced generation of fibrinolytic regulators in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1140-1148.
- [101] Hedrick, C. C., Thorpe, S. R., Fu, M. X., Harper, C. M., Yoo, J., Kim, S. M., et al. (2000) Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia*, 43, 312-320.
- [102] Kume, S., Takeya, M., Mori, T., Araki, N., Suzuki, H., Horiuchi, S., et al. (1995) Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol*, 147, 654-667.
- [103] Schleicher, E. D., Wagner, E., & Nerlich, A. G. (1997) Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*, 99, 457-468.

- [104] Tan, K. C., Chow, W. S., Ai, V. H., Metz, C., Bucala, R., & Lam, K. S. (2002) Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25, 1055-1059.
- [105] Zieman, S. J., Melenovsky, V., & Kass D. A. (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 932-943.
- [106] Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., et al. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415.
- [107] Stow, L. R., Jacobs, M. E., Wingo, C. S., & Cain, B. D. (2011) Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J*, 25, 16-28.
- [108] Abman, S. H. (2009) Role of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Annu Rev Med*, 60, 13-23.
- [109] Barton, M. (2008) Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat Clin Pract Nephrol*, 4, 490-501.
- [110] Yanagisawa, M., & Masaki, T. (1989) Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, 10, 374-378.
- [111] Davenport, A. P. (2002) International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 54, 219-226.
- [112] Fabbrini, M. S., Valsasina, B., Nitti, G., Benatti, L., & Vitale, A. (1991) The signal peptide of human preproendothelin-1. *FEBS Lett*, 286, 91-94.
- [113] Harrison, V. J., Barnes, K., Turner, A. J., Wood, E., Corder, R., & Vane, J. R. (1995) Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6344-6348.
- [114] Doi, Y., Kudo, H., Nishino, T., Yamamoto, O., Nagata, T., Nara, S., et al. (2002) Enhanced expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in acute hypoxic rat aorta. *Histol Histopathol*, 17, 97-105.
- [115] Lowenstein, C. J., Morrell, C. N., & Yamakuchi, M. (2005) Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med*, 15, 302-308.
- [116] Doi, Y., Kudo, H., Nishino, T., Nagata, T., & Fujimoto, S. (2004) The enhancement of preproendothelin-1 synthesis and the acceleration of endothelin-1 processing in the acute hypoxic rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44 Suppl 1, S207-210.
- [117] Popowski, K., Sperker, B., Kroemer, H. K., John, U., Laule, M., Stangl, K., et al. (2003) Functional significance of a hereditary adenine insertion variant in the 5'-UTR of the endothelin-1 gene. *Pharmacogenetics*, 13, 445-451.
- [118] Winker, R., Garland, E. M., Rudiger, H. W., Diedrich, A., Biaggioni, I., Ponocny, I., et al. (2005) Influence of an insertion variant in the 5'UTR of the endothelin-1 gene on orthostatic intolerance. *Am J Med Sci*, 330, 166-171.
- [119] Delerive, P., Martin-Nizard, F., Chinetti, G., Trottein, F., Fruchart, J. C., Najib, J., et al. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res*, 85, 394-402.

- [120] Geese, W. J., Achanzar, W., Rubin, C., Hariharan, N., Cheng, P., Tomlinson, L., et al. (2008) Genetic and gene expression studies implicate renin and endothelin-1 in edema caused by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Pharmacogenet Genomics*, 18, 903-910.
- [121] Benatti, L., Bonecchi, L., Cozzi, L., & Sarmientos, P. (1993) Two preproendothelin 1 mRNAs transcribed by alternative promoters. *J Clin Invest*, 91, 1149-1156.
- [122] Lee, M. E., Bloch, K. D., Clifford, J. A., & Quertermous, T. (1990) Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J Biol Chem*, 265, 10446-10450.
- [123] Mantovani, R. (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res*, 26, 1135-1143.
- [124] Yamashita, K., Discher, D. J., Hu, J., Bishopric, N. H., & Webster, K. A. (2001) Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem*, 276, 12645-12653.
- [125] Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-191.
- [126] Hammond, C., & Helenius, A. (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 126, 41-52
- [127] Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*, 28, 51-65.
- [128] Parodi, A. J. (2000) Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem*, 69, 69-93.
- [129] Hendershot, L. M. (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, 71, 289-297.
- [130] Meunier, L., Usherwood, Y. K., Chung, K. T., & Hendershot, L. M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell*, 13, 4456-4469.
- [131] Yang, Y., & Li, Z. (2005) Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells*, 20, 173-182.
- [132] Hampton, R. Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 476-482.
- [133] Rasheva, V. I., & Domingos, P. M. (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, 14, 996-1007.
- [134] Cox, J. S., Shamu, C. E., & Walter, P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73, 1197-1206.
- [135] Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881-891.

- [136] Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. (2006) pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol*, 172, 565-575.
- [137] Ron, D., & Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-529.
- [138] Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10, 3787-3799.
- [139] Silverman, R. H., & Williams, B. R. (1999) Translational control perks up. *Nature*, 397, 208-209, 211.
- [140] Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 271-274.
- [141] Wek, R. C., & Cavener, D. R. (2007) Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal*, 9, 2357-2371.
- [142] Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-633.
- [143] Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., et al. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 7, 1165-1176.
- [144] Vattam, K. M., & Wek, R. C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11269-11274.
- [145] Jiang, H. Y., Wek, S. A., McGrath, B. C., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Cavener, D. R., et al. (2003) Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol*, 23, 5651-5663.
- [146] Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., et al. (2004) Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 24, 10161-10168.
- [147] Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2, 326-332.
- [148] Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H. P., et al. (2003) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol*, 163, 767-775.
- [149] Brewer, J. W., Hendershot, L. M., Sherr, C. J., & Diehl, J. A. (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8505-8510.
- [150] Brewer, J. W., & Diehl, J. A. (2000) PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12625-12630.

- [151] Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., et al. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, 92-96.
- [151] Teske, B. F., Wek, S. A., Bunpo, P., Cundiff, J. K., McClintick, J. N., Anthony, T. G., et al. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*.
- [152] Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., & Walter, P. (2005) On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18773-18784.
- [153] Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., et al. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
- [154] Rao, R. V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, G., et al. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem*, 277, 21836-21842.
- [155] Lin, J. H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D., & Walter, P. (2009) Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One*, 4, e4170.
- [156] McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., & Holbrook, N. J. (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-1259.
- [157] Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., et al. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129, 1337-1349.
- [158] Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 23, 7198-7209.
- [159] Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., et al. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, 16, 1345-1355.
- [160] Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., et al. (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, 318, 944-949.
- [161] Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., et al. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, 300, 135-139.
- [162] Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., et al. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-730.
- [163] Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A. H., Bassik, M. C., Antonsson, B., et al. (2006) Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*, 312, 572-576.

- [164] Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., et al. (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*, 4, e374.
- [165] Mihailidou, C., Papazian, I., Papavassiliou, A. G., & Kiaris, H. (2010) CHOP-dependent regulation of p21/waf1 during ER stress. *Cell Physiol Biochem*, 25, 761-766.
- [166] Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. (2012) Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. Jul;97(7):2231-42. doi: 10.1210/jc.2011-3408. Epub 2012 Apr 16. Review.
- [167] Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:411–421
- [168] Osowski CM, Urano F (2010) The binary switch between life and death of endoplasmic reticulum-stressed β cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:107–112
- [169] Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M (2009) The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 460:534–537
- [170] Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099–1108
- [171] Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, Gildersleeve RD, Pennathur S, Kaufman RJ (2009) Translation attenuation through eIF2 α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in β cells. *Cell Metab* 10:13–26
- [172] Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D (2008) Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* 7:520–532
- [173] Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH (2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320:1492–1496
- [174] Gregor MF, Hotamisligil GS (2007) Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48:1905–1914 Abstract/FREE Full Text
- [175] Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391–398
- [176] Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S (2009) Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58:693–700
- [177] Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140:900–917
- [178] Chen Y, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Lu YB, Fang L, Yang JW, Liu C (2008) Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *Am J Nephrol* 28:1014–1022
- [179] Rasheed Z, Haqqi TM (2012) Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2 α , p38-MAPK and NF- κ B in advanced glycation end

products stimulated human chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. Dec;1823(12):2179-89. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.021. Epub 2012 Sep 6.

[180] Loughlin DT, Artlett CM (2010) Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. *PLoS One* 5:e11093

[181] Dong Y, Zhang M, Wang S, Liang B, Zhao Z, Liu C, Wu M, Choi HC, Lyons TJ, Zou MH (2010) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes* 59:1386–1396

[182] Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. (2001) Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology*. Jan;142(1):437-45.

[183] Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. (2007) A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.*;2(3):481-5.

[184] Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL, Behrman HR. (1997) Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*. Apr;56(4):891-7.

[185] Duleba AJ, Spaczynski RZ, Arici A, Carbone R, Behrman HR (1999) Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod*. Mar;60(3):546-50.

[186] Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. (2000) Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. Sep;49, 1561-70.

[187] Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* 117: 5965–5973.

[188] Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85, 747-752.

[189] Chronopoulos A, Tang A, Beglova E, Trackman PC, Roy S. (2010) High glucose increases lysyl oxidase expression and activity in retinal endothelial cells: mechanism for compromised extracellular matrix barrier function. *Diabetes*, 59, 3159-66.

[190] Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K. *Biochem Biophys Res Commun*. (2008) Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells., 375, 602-607.

[191] Lu J, Wu DM, Zheng ZH, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF (2011) Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain* 134:783-797

[192] Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:41–53

[193] Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T (2011) SOD1 (copper/zinc

superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 286, 44557-44568.

[194] Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Du S, Kasai A, Takano Y, Shitamura A, Shimada T, Yao J, Kitamura M (2008) Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem* 283:4252-4260

[195] Yao D, Brownlee M (2010) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 59:249-255

[196] Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ (2002) Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15596-15601

[197] Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T (2007) RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 7:777-789

[198] Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, et al (2008) Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7:260-269

[199] Inagi R (2011) Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 491:361-380

[200] Hu C, Cong XD, Dai DZ, Zhang Y, Zhang GL, Dai Y (2011) Argirein alleviates diabetic nephropathy through attenuating NADPH oxidase, Cx43, and PERK in renal tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 383:309-319

[201] Battah S, Ahmed N, Thornalley JP (2002) Kinetics and mechanism of the reaction of metformin with methylglyoxal. *Int Congr Ser* 1245, 355-356

[202] Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Piperi C, Aessopos A, Paterakis T, Katsikis I, Panidis D (2007) Effect of metformin administration on plasma advanced glycation end product levels in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 56:129-134

[203] Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ (2010) Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32:251-7

[204] Jung TW, Lee MW, Lee YJ, Kim SM, Jung TW (2011) Metformin prevents thapsigargin-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH(2) terminal kinase in NIT-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* Nov 23[Epub ahead of print]

[205] Miyata T, Dan T (2008) Inhibition of advanced glycation end products (AGEs): an implicit goal in clinical medicine for the treatment of diabetic nephropathy? *Diabetes Res Clin Pract* 82 Suppl 1:S25-29

[206] Lee AS (2007) GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 67:3496-3499

[207] Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka TA, Kasami R, Kohno K, Iwawaki T, Nakatani Y, Yamasaki Y, Shimomura I, Matsuhisa M (2009) Pioglitazone reduces ER stress in the liver: direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr J* 56:1103-1111

- [208] Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara Y, Tanabe K, Tsuru M, Miyazaki M, Saeki S, Saito T, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y (2009) Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia* 52:653-663
- [209] Basha B, Samuel SM, Triggler CR, Ding H. (2012) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress? *Exp Diabetes Res*; 2012:481840.
- [210] Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. (2002) Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25:1055-9.
- [211] Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*;87:432-8.
- [212] Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. (2003) Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*;17:1289-91.
- [213] Rojas A, Romay S, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K. (2000) Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res*;86:E50-4.
- [214] Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. (1998) Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia*;41:1435-41.
- [215] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al. (1997) Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation*;96:2262-71.
- [216] Sun C, Liang C, Ren Y, Zhen Y, He Z, Wang H, et al. (2009) Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Basic Res Cardiol*;104:42-9.
- [217] Oba T, Tatsunami R, Sato K, Takahashi K, Hao Z, Tampo Y. (2012) Methylglyoxal has deleterious effects on thioredoxin in human aortic endothelial cells. *Environ Toxicol Pharmacol*;34:117-26.
- [218] Zhang K. (2010) Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med*;3:33-40.
- [219] Witte I, Horke S. (2011) Assessment of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in endothelial cells. *Methods Enzymol*;489:127-46.
- [220] Sheikh-Ali M, Sultan S, Alamir AR, Haas MJ, Mooradian AD (2010) Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutrition*;26:1146-50.
- [221] Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*;23:7448-59.
- [222] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*;12:982-95.

[223] Loughlin DT, Artlett CM. (2010) Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. PLoS One;5:e11093.

Christos Adamopoulos, Elena Farmaki, Eliana Spilioti, Hippokratis Kiaris, Christina Piperi* and Athanasios G. Papavassiliou

Advanced glycation end-products induce endoplasmic reticulum stress in human aortic endothelial cells

Abstract

Background: Advanced glycation end products (AGEs), the final products of the Maillard reaction, have been shown to impair endothelial proliferation and function, thus contributing to endothelial cell injury present in diabetes, inflammatory and cardiovascular diseases. Endoplasmic reticulum (ER) stress triggered under hyperglycemic, hypoxic and oxidative conditions has been implicated in endothelial dysfunction through activation of the unfolded protein response (UPR). The present study investigates the role of AGEs in ER stress induction in human aortic endothelial cells exposed to variable AGE treatments.

Methods: Human aortic endothelial cells (HAEC) were treated with increasing concentrations (100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of AGE-bovine serum albumin (AGE-BSA) at different time-points (24, 48, 72 h). The induction of ER stress and the involved UPR components were investigated on mRNA and protein levels. Apoptosis was quantitatively determined by flow cytometry detecting propidium iodide expression and annexin V binding simultaneously.

Results: AGEs administration significantly reduced HAEC proliferation in a time- and dose-dependent manner. An immediate induction of the ER chaperones GRP78, GRP94 and the transcriptional activator, XBP-1 was observed at 24 h and 48 h. A later induction of the phospho-eIF2 α and proapoptotic transcription factor CHOP was observed at 48 h and 72 h, being correlated with elevated early apoptotic cell numbers at the same time-points.

Conclusions: The present study demonstrates that AGEs directly induce ER stress in human aortic endothelial cells, playing an important role in endothelial cell apoptosis. Targeting AGEs signaling pathways in order to alleviate ER stress may prove of therapeutic potential to endothelial dysfunction-related disorders.

Keywords: advanced glycation end-products (AGEs); apoptosis; endoplasmic reticulum (ER) stress; human aortic endothelial cells; unfolded protein response (UPR).

*Corresponding author: Assistant Professor Christina Piperi, PhD, Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Athens, 75, M. Asias Street, 11527 Athens, Greece, Phone: +30 210 7462610, Fax: +30 210 8037372, E-mail: cpiperi@med.uoa.gr

Christos Adamopoulos, Elena Farmaki, Eliana Spilioti, Hippokratis Kiaris and Athanasios G. Papavassiliou: Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Introduction

Advanced glycation end products (AGEs) are highly reactive molecules resulting from the irreversible post-translational modification reactions of glucose with the amino groups on proteins, lipids or nucleic acids [1, 2]. Increased circulating AGE levels are a common finding and a pathogenic mediator of hyperglycemic, oxidative and inflammatory conditions including diabetes, polycystic ovarian syndrome, neurodegenerative and cardiovascular diseases [3–6]. However, exogenous intake of AGEs from high fat and/or protein diets, beverages or cigarette smoke may also contribute to increased AGEs tissue deposition under normal physiology predisposing individuals to metabolic, cardiovascular disorders and progressive aging [7, 8]. AGEs have been shown to accumulate in almost all major organs including vascular tissues mediating both extracellular and intracellular functions [9].

Endothelial cells (ECs) have been proposed as primary targets of AGEs, affecting their proliferation, migration and adhesion [10]. Extracellular effects of AGEs in endothelium involve irreversible crosslinking formation with stable, long-lived extracellular matrix proteins such as collagen, elastin or laminin [11]. At the same time they can induce cell activation, proinflammatory cytokine release and oxidative stress through interaction with their receptor, RAGE, leading to endothelial injury and dysfunction [12, 13]. The role of AGEs in the induction of aortic endothelial apoptosis has not been adequately addressed. It has been suggested that AGEs trigger oxidative stress and thus

accelerate apoptosis of bovine aortic ECs contributing to vascular complications associated with diabetes mellitus [14]. This effect has been attributed to AGE-RAGE interaction leading to increased intracellular accumulation of reactive oxygen species and elevation of intracellular Ca^{2+} concentration. Additionally, AGE-RAGE dependent activation promotes apoptosis of rat endothelial progenitor cells and inhibits their migration [15]. Recently methylglyoxal, the main AGE precursor has also been shown to induce apoptosis of human aortic endothelial cells (HAEC), through oxidative stress and by triggering the mitochondrial route of apoptotic machinery [16].

Relevant studies challenge the central role of mitochondria in apoptosis and suggest that some apoptotic signals may bypass mitochondria to directly activate caspases [17]. Endoplasmic reticulum (ER) stress presents such an alternative mechanism triggering apoptosis without the involvement of mitochondria [18]. ER is the major organelle involved in the synthesis and folding of secreted and membrane bound proteins, calcium homeostasis and lipid biosynthesis [19]. The lumen of ER is characterized by high Ca^{2+} concentration and a very oxidizing environment [19]. Stressors that interfere with the ER functions, such as oxidant or reducing agents, result in the disruption of Ca^{2+} homeostasis or glucose deprivation leading to the accumulation of unfolded and/or misfolded proteins in the ER lumen, known as ER stress [20].

The mammalian ER stress response known as unfolded protein response (UPR) can be separated into two phases, adaptation and apoptosis. The cells initially adapt to the accumulation of unfolded proteins by increasing the concentration of chaperones in the ER lumen, namely the glucose-regulated protein 78 (GRP78) and glucose-regulated protein 94 (GRP94). The UPR response is triggered by the activation of three main sensors of ER stress: protein kinase-like ER kinase (PERK), inositol requiring kinase 1 (IRE1) and the activating transcription factor 6 (ATF6) [20]. All these proteins are maintained in the inactive form by binding the N-terminus of GRP78 that serves both as chaperone and sensor of ER stress. When misfolded proteins accumulate, GRP78 is required for its chaperone function and releases these sensors to initiate the UPR [21]. PERK, upon activation, phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), decreases mRNA translation and induces UPR-related genes [20]. Similarly, activation of IRE1 α and ATF6 also leads to regulation of various UPR-related genes, such as protein chaperones and calnexin [22]. However, if this adaptation does not prove sufficient, the apoptotic response is initiated.

Previous studies have shown that ER stress is implicated in endothelial dysfunction associated with diabetes

mellitus and cardiovascular diseases indicating that ER stress-induced apoptosis can be an important pathophysiological factor [23, 24]. Furthermore, AGEs have been shown to induce ER stress-mediated apoptosis in mouse podocytes [25], human neuroblastoma cells and cortical neurons [26]. However, the role of AGEs in ER stress-induced apoptosis in human aortic ECs remains to be elucidated. The present study aims to delineate ER stress induction in human ECs exposed to different AGE concentrations at variable time-points, monitoring the series of events leading to apoptosis.

Materials and methods

Reagents

All reagents were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) unless otherwise stated. AGE-bovine serum albumin (AGE-BSA) was obtained from Abcam plc (ab51995; Cambridge, UK). Tunica-mycin was purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany). BSA, TNF- α and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

AGE-BSA characteristics

According to manufacturer's instructions, glycated BSA has been produced by reacting BSA with glycoaldehyde under sterile conditions followed by extensive dialysis and purification steps. Fluorescence of AGEs was confirmed by fluorescence spectrophotometry with Ex./Em.=370/440 nm. Glycated BSA showed 7000% increase in fluorescence when compared to control BSA. The purity of the final stock is >95% as analyzed by SDS-PAGE and filter sterilized using 0.22 μm filter.

Culture of endothelial cells

HAEC were obtained as cryopreserved cells from European Collection of Cell Cultures (ECACC) and were cultured in endothelial cell growth medium M200 supplemented with Low Serum Growth Supplement containing Fetal Bovine Serum (2% v/v), hydrocortisone, (1 g/mL), human epidermal growth factor (10 ng/mL), basic fibroblast growth factor, (3 ng/mL), heparin (10 g/mL), gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and amphotericin B (50 ng/mL). Cells were cultured at 37°C in a humidified 95% air –5% CO_2 atmosphere and were split according to standard procedures. HAEC were used in all assays between passage four and eight.

Cell proliferation assay

For the proliferation assay, HAEC were plated on 96-well microplates at a density of approximately 1×10^4 cells per well, and then treated

with either unmodified BSA or AGE-BSA at concentrations of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24, 48 and 72 h or with tunicamycin at concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. Co-treatment with both tunicamycin at the same concentration and AGE-BSA at concentrations of 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was also performed. Cell viability was subsequently determined by the MTT assay as described previously [27]. Each experiment was conducted in triplicate.

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from cultured cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in a two-step reaction using iScript cDNA synthesis kit (Biorad, Hercules, CA, USA).

For semi-quantitative PCR, cDNA was amplified using gene specific primer pairs in 25 cycles. Detailed PCR conditions have been described previously [28]. PCR fragments were resolved on EtBr agarose gel. Densitometric analysis of PCR fragments was performed using image analysis software Image J (La Jolla, CA, USA) after normalization to actin levels. All experiments have been performed at least three times. Data and densitometric analysis from one representative experiment are presented.

Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed using an iCycler real time instrument (Biorad). RT-PCR product was amplified using the iQ SYBR Green Supermix (Biorad) in a total reaction volume of 20 μL . Primer efficiencies were calculated from a standard curve of serially diluted cDNA. Product identity was confirmed by a single pick in the melt curve. Relative expression values were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ formula. The data are presented as fold change in gene expression normalized to GAPDH and relative to the untreated control. The primers used for the amplification of *CHOP* were forward 5'-agtccacggagaagctaa-3', and reverse primer, 5'-ccatacagcagcctgagtga-3', and for GAPDH were forward primer 5'-gggtgtgaacctgagaagt-3', and reverse primer 5'-catgccagtgcctccctc-3'.

Western blot analysis

For immunoblot analysis cells were solubilized with ice-cold RIPA buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific). The protein concentration in the lysates was determined by using Bradford assay (Biorad). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GRP78 (#3177S; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-CHOP (sc-71817; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-p-eIF2 α (#33985; Cell Signaling), anti-XBP-1 (sc-7160; Santa Cruz) and anti-Actin (MAB-150; Millipore, Bedford, MA, USA). Relative protein amounts were evaluated by a densitometric analysis using Image J software and normalized to the corresponding actin levels. All experiments have been performed at least three times and representative results and the corresponding quantification data of one experiment are shown.

Assessment of apoptosis by flow cytometry

For the apoptosis assay, HAEC were seeded in six-well plates at a density of approximately 2×10^5 cells per well and then treated with BSA or AGE-BSA at a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h and 72 h, with tunicamycin at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h and with both AGE-BSA and tunicamycin at the same concentrations for 24 h. Cells were then harvested, rinsed twice with PBS, collected by centrifugation at 2000 rpm for 5 min and annexin V-FITC apoptosis detection kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. Samples were scanned with a fluorescence-activated cell sorter (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA), and the data were analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson). A total of 10,000 events were measured per sample.

Plots in the annexin V-positive/propidium iodide-negative quadrant were counted as apoptotic cells. Each experiment was performed in triplicate.

Statistics

The data are presented as mean \pm SE for the number of experiments indicated. Statistical analysis of the results was performed using Student's *t*-test. A *p*-value of <0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

AGE-BSA administration inhibited HAEC proliferation in a time- and dose-dependent manner

In order to elucidate the impact of AGEs in endothelial cell proliferation, HAEC were treated with increasing concentrations (100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of unmodified bovine serum albumin (BSA) or AGE-BSA for different periods of time (24, 48, 72 h). MTT proliferation assay indicated that AGEs administration significantly reduced HAEC viability in a time- and dose-dependent manner (48 h–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-BSA: $p < 0.01$; 48 h–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-BSA: $p < 0.05$; 72 h–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-BSA: $p < 0.05$; 72h–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-BSA: $p < 0.001$) (Figure 1A). In addition the administration of the ER stress-inducer tunicamycin had the same effect with the higher concentration dose of AGE-BSA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and longer incubation time (72 h) ($p < 0.001$). The combined administration of tunicamycin and increasing concentrations of AGE-BSA indicated minor reduction of HAEC proliferation suggesting a non-synergistic effect between these two agents (Figure 1B).

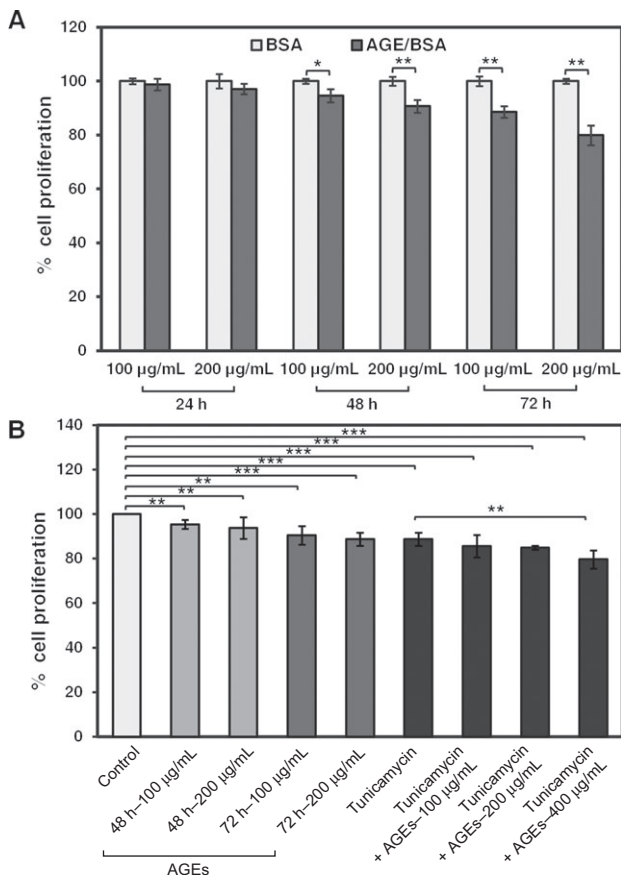


Figure 1 Inhibition of HAEC proliferation by AGE-BSA and tunicamycin treatment.

(A) Cells treated with BSA or AGE-BSA at concentrations of 100 and 200 µg/mL for 24 h, 48 h and 72 h were subjected to the MTT cell proliferation assay. (B) Independent experiments with combined administration of tunicamycin (5 µg/mL) for 24 h and increasing concentration of AGE-BSA (100–400 µg/mL) were performed. The viability of untreated cells (control) was considered 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

AGE-BSA treatment-induced ER stress in HAEC

Based on recent studies that describe the involvement of AGEs in ER stress signaling, we investigated the possible induction of ER stress and the expression of UPR components upon AGE-BSA administration. Semi quantitative PCR analysis demonstrated the up-regulation of chaperones GRP78 and GRP94, the major indicators of ER stress induction in all conditions under study (Figure 2). We also observed an increase in *XBP-1* mRNA levels at early time points (24 h, 48 h) and lower concentrations (100 µg/mL) and of the spliced form of *XBP-1* at 72 h, suggesting the early activation of IRE-1 pathway upon AGEs presence (Figure 2B–D).

Furthermore, we assessed the protein levels of the early GRP78, XBP-1 and late UPR effectors, p-eIF2 α and

CHOP following AGE-BSA incubation. GRP78 expression was found to be up-regulated in all dose- and time-points (Figure 3) being in accordance with the elevated mRNA levels (Figure 2). Similar trend was also observed in XBP-1 protein expression levels that remained elevated at early time points (24 h, 48 h) and decreased at 72 h at both AGE-BSA concentrations (Figure 3). In order to investigate the involvement of late UPR effectors in AGEs-induced ER stress, key molecules of the PERK pathway were studied. As shown in Figure 3, AGE-BSA administration in HAEC increased the phosphorylated form of eIF2 α and of the pro-apoptotic transcription factor CHOP expression in a time- and dose- dependent manner. Higher levels were observed in 48 h (200 µg/mL AGE-BSA) and in 72 h (at both concentrations).

AGE-BSA administration-induced ER stress-mediated apoptosis in HAEC

In order to confirm the proapoptotic transcription factor CHOP induction upon AGEs treatment, we monitored *CHOP* mRNA expression levels using quantitative real time PCR analysis. Our results demonstrated an even higher statistically significant *CHOP* mRNA fold induction compared with protein expression levels in 72 h treatment at both concentrations (Figure 4).

This finding indicated the development of CHOP-mediated apoptosis in HAEC upon AGEs treatment that was further investigated by annexin V/propidium iodide flow cytometric analysis (Figure 5). High concentration of AGEs (200 µg/mL) for 48 h and 72 h incubation resulted in a significant increase of the early apoptotic fraction of HAEC (four- and eight-fold, respectively). In addition tunicamycin and AGE-BSA co-treatment did not further increase the early apoptotic cells compared to tunicamycin alone (39.64% vs. 37.51% of gated cells). This result is consistent with the proliferation data (Figure 1B), providing further evidence for a common mechanism between AGEs and tunicamycin in inducing HAEC apoptosis via activation of UPR signaling.

Discussion

Endothelial cells present primary dynamic structures that actively regulate basal vascular tone and reactivity in physiological and pathological conditions. They respond to neurohumoral mediators and mechanical forces as to maintain the balance between vasodilatation and

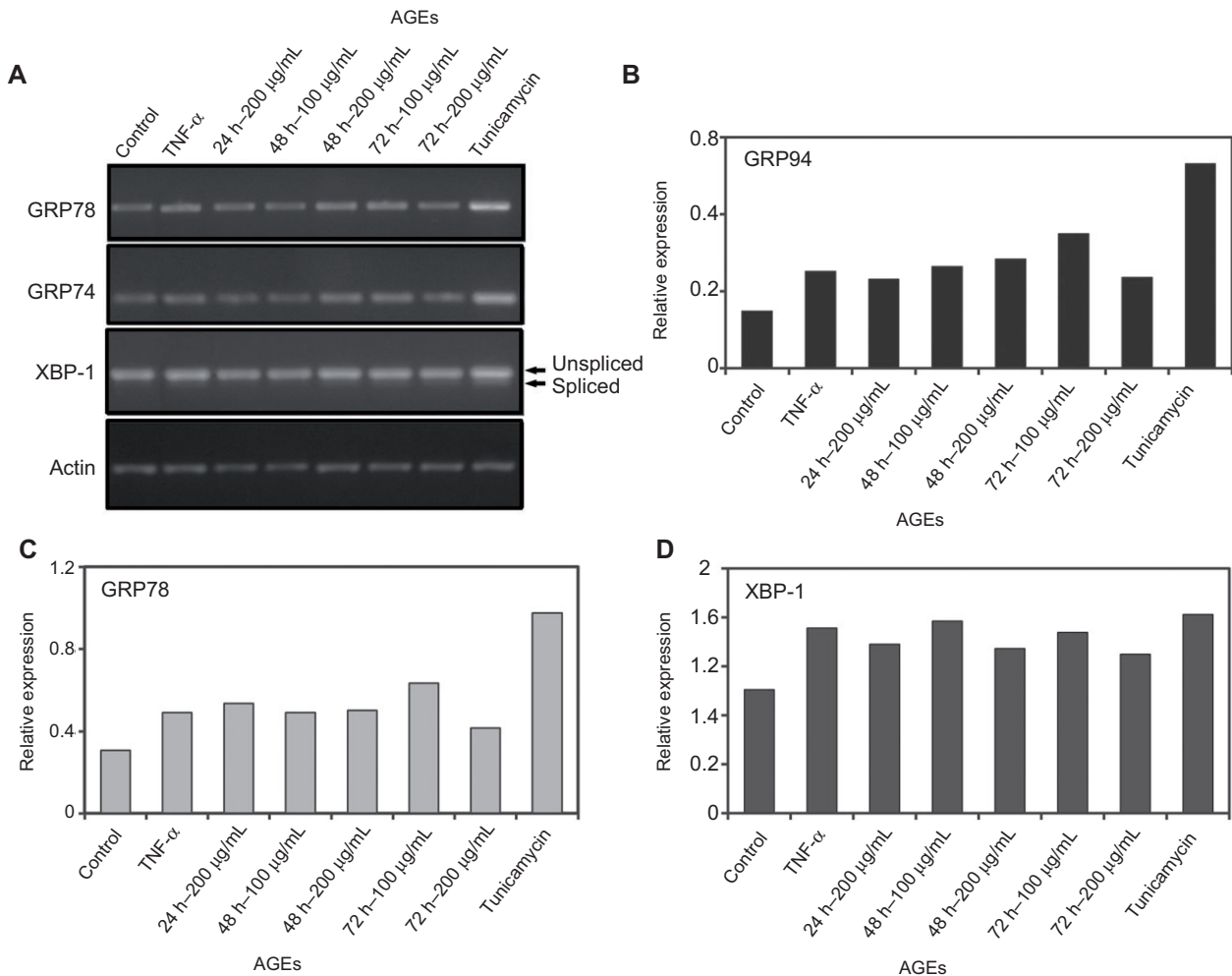


Figure 2 AGE-BSA administration induces mRNA levels of UPR components in HAEC.

(A) ER stress induction in HAEC following AGE-BSA treatment. RT-PCR analysis of *GRP78*, *GRP94* and *XBP-1* mRNA expression after AGE-BSA administration at increasing concentrations (100, 200 μ g/mL) for different periods of time (24 h, 48 h, 72 h). The lower band represents the spliced form of activated *XBP-1* (arrow). (B) The panel represents results of densitometric analysis of *GRP78*, *GRP94* and *XBP-1* PCR fragments after normalization to actin levels. TNF- α (50 ng/mL for 4 h) and tunicamycin (5 μ g/mL for 24 h) treatments were used as positive ER stress induction controls. All experiments have been performed at least three times and representative results as well as corresponding quantification data of one experiment are shown (B–D).

vasoconstriction, restore blood fluidity and vessel wall integrity [29]. Loss of endothelial function may be a critical and initiating factor for several conditions including inflammation, diabetic micro- and macrovascular complications as well as cardiovascular diseases [29].

AGEs have been shown to contribute to endothelial dysfunction and this has been clearly demonstrated in diabetes, where levels of serum AGEs in patients with type 2 diabetes were negatively associated with the degree of endothelium-dependent and endothelium independent vasodilation [30]. Several mechanisms have been suggested to explain the association. Among them, bioavailability and activity of the endothelium-derived NO has been demonstrated to be reduced by AGEs [31]. AGE associated

induction of oxidative stress may quench and inactivate endothelium-derived NO and uncouple endothelial NO synthase (eNOS) activity through receptor-mediated phosphorylation and increased eNOS degradation [32, 33]. In addition, AGEs may impair endothelial balance by reducing the endothelial production of prostacyclin [34] and enhancing the expression of endothelin-1 [35]. They are also capable of increasing endothelial permeability to macromolecules [36, 37] and modify the functions of endothelial progenitor cells by promoting their apoptosis and migration [38]. Endothelial cell apoptosis due to AGEs has been demonstrated in several studies using bovine and human aortic ECs and has been mainly attributed to the induction of oxidative stress and mitochondrial dysfunction [14, 16].

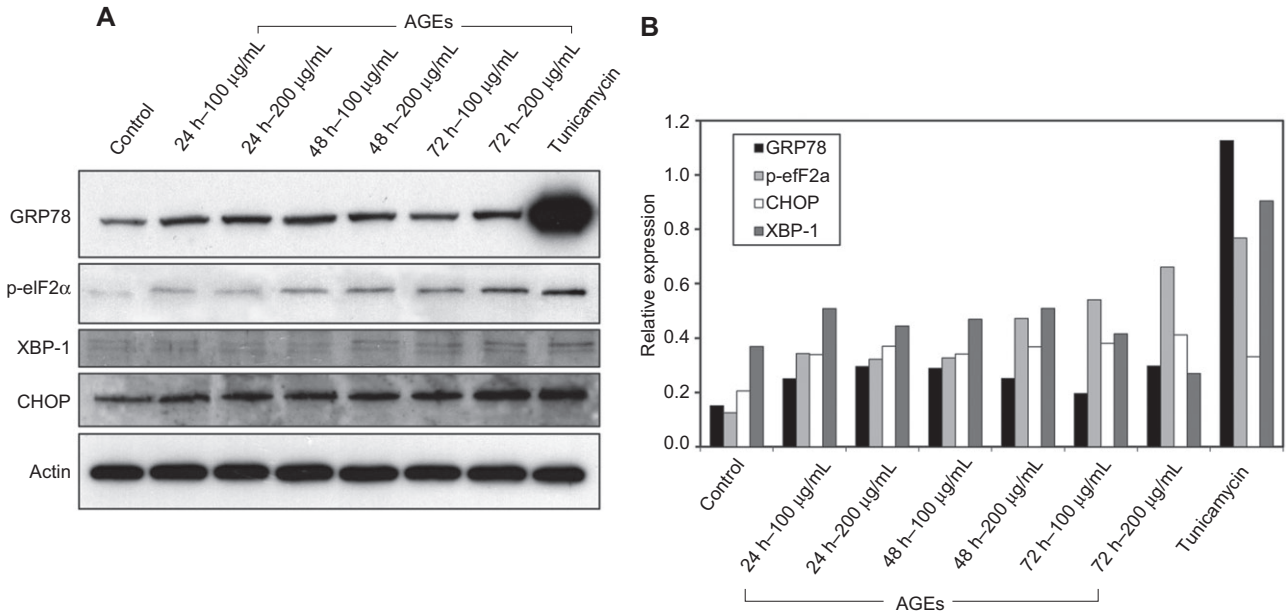


Figure 3 AGE-BSA administration increases GRP78 and other UPR component protein levels.

GRP78, p-eIF2α, XBP-1 and CHOP protein levels were assessed by Western blot analysis after AGE-BSA treatment of HAEC at increasing concentrations (100, 200 μg/mL) for various time points (24 h, 48 h, 72 h) (A). The densitometric quantification of these results (normalized to the actin levels) is shown in the graph (B). Tunicamycin (5 μg/mL for 24 h) treatment was used as positive ER stress induction control. All experiments have been performed at least three times and representative results as well as corresponding quantification data of one experiment are shown.

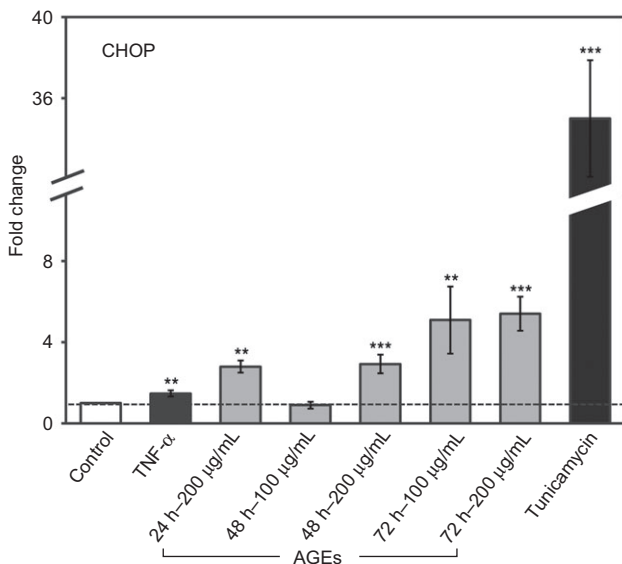


Figure 4 Induction of proapoptotic transcription factor CHOP upon AGE-BSA treatment.

CHOP mRNA levels were monitored by quantitative real time PCR analysis in HAEC following treatment with AGE-BSA at increasing concentrations (100, 200 μg/mL) for different time points. TNF-α (50 ng/mL for 4 h) and tunicamycin (5 μg/mL for 24 h) treatments were used as positive ER stress induction controls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Here, we show AGEs-induced apoptosis in ECs through ER stress pathway, providing a novel molecular mechanism for endothelial dysfunction in metabolic and cardiovascular disorders. ER is exquisitely sensitive to glucose availability and depends on blood glucose levels for the energy supply required for the protein folding process [39]. ECs always exposed to elevations and reductions of blood nutrients, are very dynamic, metabolically active cells, with a high volume of protein synthesis which predispose them to ER stress [40]. In particular ECs cannot tolerate the continued high glucose exposure, and thus ER stress is commonly initiated in a diabetic milieu [41]. It was thus hypothesized that ER stress may also be induced in HAECs under conditions of increased exogenous glycated proteins (AGEs) uptake. Indeed, incubation of HAEC with high AGE levels for prolonged durations (48 h and 72 h) was capable to significantly reduce cell proliferation. This reduction was accompanied by increased mRNA and protein levels of ER stress sensors (GRP78, GRP94) indicative of ER stress induction. Recent studies have also shown the direct induction of ER stress by AGEs in murine podocytes, human neuroblastoma cell lines and human chondrocytes where they are implicated in inflammatory and oxidative processes as well as cell death pathways [25, 26, 42].

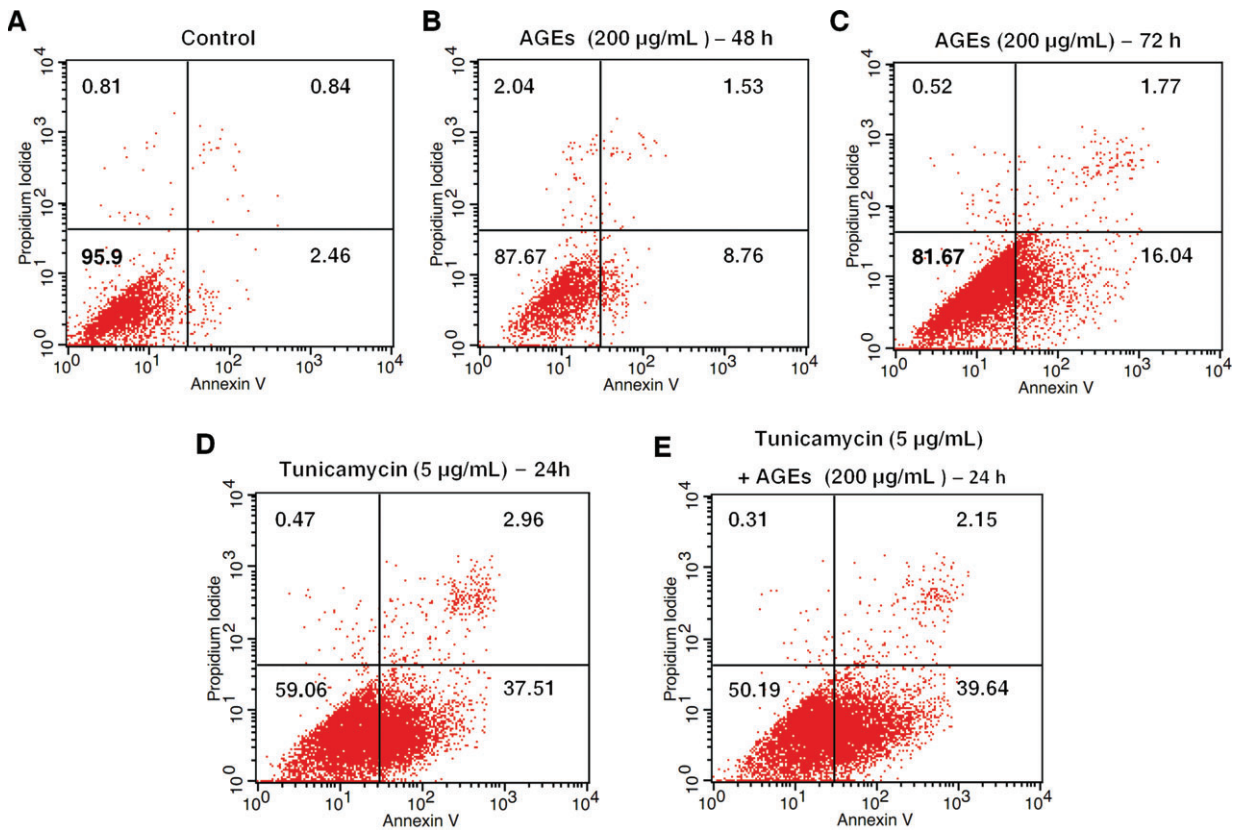


Figure 5 AGE-BSA induced apoptosis in HAEC in a time-dependent manner.

Apoptosis of HAEC was determined by annexin V/PI binding. HAEC were untreated (A), treated with AGE-BSA (200 µg/mL) for 48 h (B) and 72 h (C), with tunicamycin (5 µg/mL) for 24 h (D) and with both tunicamycin (5 µg/mL) and AGE-BSA (200 µg/mL) for 24 h (E). Percentage of gated cells is shown in each quadrant (UL: % of necrotic cells, UR: % of apoptotic cells, LL: % of viable cells, LR: % of early apoptotic cells).

Notably, at early time points (24 h, 48 h) of AGE-BSA administration, activation of the transcriptional activator, XBP-1 was observed that is a mediator of the adaptive UPR response. The three UPR branches (IRE1, PERK, and ATF6) have been reported to initially promote cell survival by reducing misfolded protein levels but when ER stress is not alleviated UPR signaling promotes apoptotic cell death. This is also possible to occur under AGEs accumulation, being capable of triggering both protective and cell death responses depending on their concentration and the duration of their presence. In accordance with this hypothesis, we found that IRE1 activity (as demonstrated by XBP-1 expression) was increased at early AGE-induced ER stress (24 h) and attenuated by persistent ER stress (48 h, 72 h). IRE1 is a transmembrane kinase (endoribonuclease, RNase) that upon activation, initiates the non-conventional splicing of *Xbp-1* mRNA [43, 44]. Spliced *Xbp-1* mRNA encodes a transcription activator that drives transcription of genes such as ER chaperones, whose products directly participate in ER protein folding [45]. By contrast, our data show that PERK signaling including

translational inhibition (by phosphorylation of eIF2 α) and proapoptotic transcription regulator CHOP induction was maintained at 48 h and 72 h incubation with AGEs. PERK is a transmembrane kinase that phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), thus reducing protein synthesis and counteracting ER protein overload [46]. Additionally, CHOP is a B-ZIP transcription factor induced by the PERK branch of the UPR that promotes cell death [47]. *Chop* mRNA levels were significantly increased at 48 h incubation with 200 µg/mL AGEs compared to untreated control and remained elevated at 72 h at both concentrations, indicative of proapoptotic signaling. These data were further confirmed by double staining flow cytometric analysis of AGE-stimulated HAEC using the early apoptotic marker, annexin V and nucleic acid stain, propidium iodide. Significantly increased cell numbers of early apoptotic cells were detected following AGEs treatment for 48 h and 72 h. The modest increase in early and late apoptotic cell population after treatment with AGEs combined with tunicamycin compared to tunicamycin alone indicated that both agents share common

UPR signaling pathways in the induction of apoptosis in HAEC.

Several studies in other cell systems suggest that apoptosis mediated by AGEs could be induced by an ER pathway independent from mitochondria [25, 48]. More specifically, AGE-induced GRP78 expression as an ER stress sensor was associated with elevated intracellular Ca^{2+} and apoptosis in murine podocytes [25]. Additionally, 3-deoxyglucosone, a precursor for AGEs, that is highly upregulated in skin explants of diabetic cutaneous wounds, was found to mediate ER stress-induced apoptosis through ROS formation in human dermal fibroblasts via a RAGE-independent mechanism [48]. This is particularly interesting since previous studies limited AGE-induced apoptosis in being mediated through increased oxidative stress following interaction of AGEs with their receptor RAGE [14–16].

It is therefore evident that due to the heterogeneity of AGE compounds and the wide range of their precursor molecules; different signaling may be selected depending not only upon the cell type but the state of AGE molecules being either in circulating or protein-bound form. Further research is required in elucidating the necessity of RAGE in endothelial ER stress induction under high AGE environments. Additionally, since ER stress regulates mitochondrial bioenergetics, a potential crosstalk between oxidative stress in ER stress-induced apoptosis cannot be excluded and should be explored in detail.

However, our data show that ER function can be modulated by AGEs affecting critically both ECs functionality and cell fate. Thus, chemical enhancement

of ER function to cope with cell apoptosis provides an interesting approach to managing endothelial dysfunction. Pharmaceutical or chemical chaperones such as trimethylamine N-oxide dehydrate, 4-phenyl butyric acid and taurine-conjugated ursodeoxycholic acid are representatives of a group of low-molecular weight compounds known to stabilize protein conformation that improve ER folding capacity and facilitate trafficking of mutant proteins [49, 50]. The effectiveness of these molecules in alleviating endothelial injury either alone or in conjunction with standard medications remains to be investigated.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program ‘Education and Lifelong Learning’ of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Received November 29, 2012; accepted February 7, 2013

References

1. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995;46:223–34.
2. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998;44:1139–45.
3. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998;37:586–600.
4. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A, Creatsas G. Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:37–43.
5. Li J, Liu D, Sun L, Lu Y, Zhang Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *J Neurol Sci* 2012;317:1–5.
6. Barlovic DP, Thomas MC, Jandeleit-Dahm K. Cardiovascular disease: what's all the AGE/RAGE about? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010;10:7–15.
7. Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007;62:427–33.
8. Gursinsky T, Ruhs S, Friess U, Diabate S, Krug HF, Silber RE, et al. Air pollution-associated fly ash particles induce fibrotic mechanisms in primary fibroblasts. *Biol Chem* 2006;387:1411–20.
9. Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids* 2012;42:1193–204.
10. Li H, Zhang X, Guan X, Cui X, Wang Y, Chu H, et al. Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:46.
11. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597–605.

12. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes – part II: cellular mechanisms and therapeutic targets. *Vascul Pharmacol* 2011;54:75–9.
13. Zhou YJ, Yang HW, Wang XG, Zhang H. Hepatocyte growth factor prevents advanced glycation end products-induced injury and oxidative stress through a PI3K/Akt-dependent pathway in human endothelial cells. *Life Sci* 2009;85: 670–7.
14. Xiang M, Yang M, Zhou C, Liu J, Li W, Qian Z. Crocetin prevents AGEs-induced vascular endothelial cell apoptosis. *Pharmacol Res* 2006;54:268–74.
15. Chen J, Song M, Yu S, Gao P, Yu Y, Wang H, et al. Advanced glycation endproducts alter functions and promote apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation endproducts mediate overexpression of cell oxidant stress. *Mol Cell Biochem* 2010;335:137–46.
16. Oba T, Tatsunami R, Sato K, Takahashi K, Hao Z, Tampo Y. Methylglyoxal has deleterious effects on thioredoxin in human aortic endothelial cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012;34: 117–26.
17. Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001;292:624–6.
18. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98–103.
19. Grolach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1391–418.
20. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8: 519–29.
21. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000;2:326–32.
22. Hetz C, Glimcher LH. Fine-tuning of the unfolded protein response: assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell* 2009;35:551–61.
23. Chaube R, Kallakunta VM, Espey MG, McLarty R, Faccenda A, Ananvoranich S, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated inhibition of NSMase2 elevates plasma membrane cholesterol and attenuates NO production in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:313–23.
24. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res* 2010;107:839–50.
25. Chen Y, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Lu YB, Fang L, et al. Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *Am J Nephrol* 2008;28:1014–22.
26. Yin QQ, Dong CF, Dong SQ, Dong XL, Hong Y, Hou XY, et al. AGEs induce cell death via oxidative and endoplasmic reticulum stresses in both human SH-SY5Y neuroblastoma cells and rat cortical neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2012;32:1299–309.
27. Kassi E, Papoutsis Z, Pratsinis H, Aliannis N, Manoussakis M, Moutsatsou P. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:493–500.
28. Dioufa N, Kassi E, Papavassiliou AG, Kiaris H. Atypical induction of the unfolded protein response by mifepristone. *Endocrine* 2010;38:167–73.
29. Basha B, Samuel SM, Triggler CR, Ding H. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress? *Exp Diabetes Res* 2012;2012:481840.
30. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1055–9.
31. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432–8.
32. Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J* 2003;17: 1289–91.
33. Rojas A, Romay S, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res* 2000;86:E50–4.
34. Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 1998;41:1435–41.
35. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, et al. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 2000;49:1561–70.
36. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 1997;96:2262–71.
37. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63:582–92.
38. Sun C, Liang C, Ren Y, Zhen Y, He Z, Wang H, et al. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Basic Res Cardiol* 2009;104:42–9.
39. Zhang K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med* 2010;3:33–40.
40. Witte I, Horke S. Assessment of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in endothelial cells. *Methods Enzymol* 2011;489:127–46.
41. Sheikh-Ali M, Sultan S, Alamir AR, Haas MJ, Mooradian AD. Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutrition* 2010;26:1146–50.
42. Rasheed Z, Haqqi TM. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2alpha, p38-MAPK and NF-kappaB in advanced glycation end products stimulated human chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823: 2179–89.
43. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;415:92–6.
44. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881–91.

45. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003;23:7448–59.
46. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397:271–4.
47. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998;12:982–95.
48. Loughlin DT, Artlett CM. Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. *PLoS One* 2010;5:e11093.
49. Inagi R. Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 2011;491:361–80.
50. Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2231–42.

Crosstalk between Advanced Glycation and Endoplasmic Reticulum Stress: Emerging Therapeutic Targeting for Metabolic Diseases

Christina Piperi, Christos Adamopoulos, Georgia Dalagiorgou, Evanthia Diamanti-Kandarakis, and Athanasios G. Papavassiliou

Department of Biological Chemistry (C.P., C.A., G.D., A.G.P.), University of Athens Medical School, 11527 Athens, Greece; and Third Department of Medicine (E.D.-K.), University of Athens Medical School, 'Sotiria' Hospital, 11527 Athens, Greece

Context: Advanced glycation, the major posttranslational modification of proteins, DNA, and lipids, is accelerated under conditions of increased oxidative stress, hyperglycemia, and hypoxia contributing to a variety of metabolic diseases such as diabetes mellitus, obesity, inflammation, polycystic ovarian syndrome, ischemic cardiovascular disease, and neurodegenerative disorders. The potential role of advanced glycation in endoplasmic reticulum (ER) homeostasis is largely unknown.

Evidence Acquisition: Basic and clinical peer-reviewed articles on advanced glycation and ER stress related to metabolic regulation were searched in PubMed from 2000–2011. The resulting articles as well as relevant cited references were reviewed.

Evidence Synthesis: Recent evidence indicates that hyperglycemia, hypoxia, and oxidative stress, apart of triggering advanced glycation, can also adversely affect ER function, leading to pathogenic ER stress, followed by the unfolded protein response. The concomitant presence of advanced glycation in the same conditions with ER stress suggests their crosstalk in the progression of diseases associated with hypoxic and oxidative stress.

Conclusion: Current data support the direct or indirect induction of ER stress response by advanced glycation end products or advanced glycation end product precursors in the pathogenesis of metabolic diseases. Inhibitors of advanced glycation acting as potent ER stress modulators with beneficial effects in restoring ER homeostasis and adjusting physiological unfolded protein response level present an emerging therapeutic approach with significant applications, especially in the context of metabolic dysfunction. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: 2231–2242, 2012)

In the last century, an increased prevalence of chronic metabolic disorders including obesity, type 2 diabetes (T2D), and insulin resistance has been observed in developed countries, affecting adults as well as children (1, 2). Abnormal insulin action and increased adiposity are the hallmarks of numerous health problems associated with elevated incidence of T2D, hepatobiliary and gall bladder disorders, cardiovascular complications, neurodegenerative diseases, and tumors (3, 4). The underlying causative

mechanisms usually involve dysregulation or lack of cooperation between homeostatic mechanisms implicated in nutrient and energy management.

Metabolic dysregulation as characterized by high energy and excess nutrient intake is often associated to unbalanced glucose homeostasis and subsequent insulin secretion affecting a variety of organs, including pancreatic β -cells, liver, fat, and muscle tissue as well as brain.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-3408 Received December 20, 2011. Accepted March 21, 2012.

First Published Online April 25, 2012

Abbreviations: AGE, Advanced glycation end product; ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; CML, N-carboxymethyl-lysine; CRCT2, CREB-regulated transcription activator 2; eIF2 α , E74-like factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; GRP, glucose regulated protein; IRE1, inositol requiring 1; LDL, low-density lipoprotein; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PCOS, polycystic ovarian syndrome; PERK, protein kinase-like ER kinase; RAGE, receptor for AGE; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; T2D, type 2 diabetes; UPR, unfolded protein response.

Among the most important posttranslational modifications is the nonenzymatic modification of proteins, lipids, and nucleic acids by glucose, converting them to advanced glycation end products (AGE). Advanced glycation results in irreversible cross-linking of proteins, loss of protein structure and function, followed by apoptosis (5). Hyperglycemic conditions, oxidative stress, and hypoxia accelerate the generation of AGE precursors contributing to variable pathologies such as T2D, metabolic syndrome and obesity, polycystic ovarian syndrome (PCOS), cardiovascular disease, inflammation, and neurodegenerative disorders.

Endoplasmic reticulum (ER), being the primary regulatory organelle of protein synthesis, folding, maturation, and transport, presents the most important nutrient cell sensor and a critical coordinator of metabolic responses. Conditions that challenge ER function such as increased synthesis of misfolded proteins and their accumulation in ER lumen activate an elaborate adaptive response, the unfolded protein response (UPR) (6). Canonical UPR is mediated by three main branches that intersect with different inflammatory and signaling pathways, commonly implicated in metabolic dysfunction (4).

Recent experimental evidence indicates the concomitant presence of AGE and ER stress in the same pathological entities commonly associated with oxidative stress or hypoxia, suggesting a pathophysiological interplay.

Advanced Glycation and Metabolic Implications

Advanced glycation takes place in all cell types and refers to reaction between reducing sugars and amino residues present in DNA, proteins, and lipids, known as the Maillard reaction. This is followed by rearrangements and final cross-linking to generate AGE (7). AGE constitute a heterogeneous group of compounds of more than 20 members including the 1,2-dicarbonyl precursor compounds glyoxal, methylglyoxal, and the end products, N-carboxymethyl-lysine (CML), pentosidine, and hydroimidazolone being the best characterized, and serving as markers of AGE accumulation in various tissues (8, 9).

Although AGE are formed slowly under physiological conditions, their generation and subsequent accumulation are enhanced in hyperglycemic and insulin resistance states as well as during oxidative stress (5). In normoglycemia, however, advanced glycation can be induced by hypoxia and oxidative stress as characterized by increased production of reactive oxygen species (ROS). Under hypoxic conditions, it is triggered by mitochondrial dysfunction followed by ROS generation and altered adaptive

hypoxic response. A vicious circle is therefore developed between conditions of hypoxia, oxidative stress, and enhanced advanced glycation (5).

Diet presents an alternative source of AGE in the human body along with consumption of beverages and cigarette smoke (10). Food processing such as prolonged heating, frying, or grilling accelerates the glycol oxidation and lipoxidation reactions, resulting in increased formation of AGE (10–13). Intake of high-AGE diets has been correlated with increased circulating AGE levels and insulin resistance as well as tissue deposition interfering with metabolic homeostasis (13, 14). Administration of the pancreatic lipase inhibitor orlistat in women with PCOS after a high-AGE diet intake was able to acutely reduce serum AGE levels and improve their metabolic profile (15–17).

AGE effects can be classified as receptor dependent or independent, and their mode of action is both intracellular and extracellular. Intracellular effects are mediated through binding of AGE to specific receptors (RAGE) present on cell surface, triggering the activation of signaling pathways such as protein kinase C, MAPK, ROS, and nitric oxide (5), with most of them converging in the activation of transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) that regulates transcription of a number of proteins implicated in endothelial function (vascular cell adhesion protein-1, intercellular adhesion molecule-1, endothelin-1) and inflammation (proinflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6) (18–20). Extracellular effects of AGE include modification of structural proteins, usually connective tissue components such as collagen type IV and laminin, leading to alteration of structure and function, increased stiffness, and resistance to proteolytic digestion (21–23).

Every tissue in the human body can be affected by AGE, including kidney, liver, arteries, reproductive, muscle, skeletal tissue, and brain, whereas there is increasing evidence that sustained exposure to AGE is related to the risk of metabolic disorders and adverse aging-related outcomes (24–26). Apart from diabetes and its complications, AGE are associated with certain liver diseases such as nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis due to their clearance through liver as well as to end-stage renal disease due to their metabolism by the kidney (27). Deposition of AGE in arterial walls, especially in the elastic membrane and intimal extracellular matrix, allows formation of cross-links with matrix proteins in the wall of blood vessels, reducing elasticity and promoting vessel rigidity, therefore implicating AGE in atherosclerosis (28). Recently, increased localization of AGE has been observed in the female reproductive system of experimental animals, after intake of a high-AGE diet (29), and in the ovarian

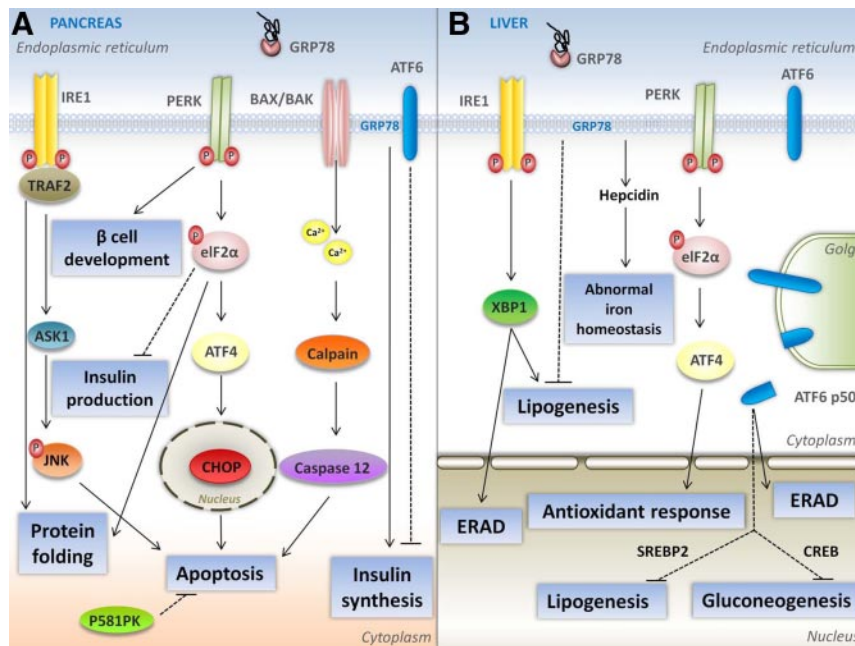


FIG. 1. UPR pathways in metabolic regulation. Under ER stress, the canonical UPR pathways are implicated in the homeostasis of glucose, insulin synthesis, and lipid metabolism. A, The pancreatic β -cell controls the synthesis, folding, and production of insulin through the ER. PERK expression is a requirement for β -cell formation and survival during early stages of development, along with another chaperone, p581PK, that is induced in ER stress (51, 52, 110, 111). Insulin production requires IRE1, and eIF2 α phosphorylation is necessary to halt insulin synthesis until folding needs are met (47). The loss of gene *WFS1* that encodes the protein wolfram in ER membrane leads to ER stress and cellular death (112). Prolonged ER stress in β -cells results in apoptosis through c-Jun terminal kinase phosphorylation mediated via IRE-1 activation as well as through CHOP, a downstream mediator of UPR (113). Down-regulation of CHOP in conditions of high insulin requirements leads in β -cell survival and amelioration of glucose homeostasis (114). B, In the liver, UPR is implicated in lipogenesis and gluconeogenesis. The activity of XBP1 in liver cells, which is downstream of the UPR sensor IRE1a, regulates transcription of many genes implicated in fatty acid synthesis (115). In addition, overexpression of Grp78 inhibits the activation of SREBP1 and SREBP2, the major transcriptional regulators of lipogenic gene expression, and reduces hepatic steatosis in obese mice (116). In hepatocytes, ER stress also induces the production of hepcidin, an iron-regulating peptide hormone, leading to abnormal iron metabolism (117). [Adapted and reprinted in modified form from G. S. Hotamisligil: Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140:900–917, 2010 (4), with permission. © Elsevier.]

tissue of women with PCOS, correlating positively with an altered metabolic (insulin resistance) and hormonal (hyperandrogenemia) profile (30–32). Furthermore, muscle tissue can also be affected from AGE deposition due to collagen cross-linking in muscle tendons and cartilage that leads to muscle stiffness and reduced muscle function (33, 34). Emerging evidence suggests AGE involvement in bone remodeling and in reduced bone quality due to altered mechanical properties and increased stiffness of collagen matrix (35, 36). At last, neurofibrillary tangles and senile plaques can also be sites of AGE accumulation in aging human brain as well as in Alzheimer's disease, where they are implicated in cognitive deficits (37, 38).

Adverse AGE-mediated signaling from all major metabolic tissues is then directed to ER lumen where cell fate decisions are made through a specialized protein network.

ER Response and Metabolic Homeostasis

ER is envisioned as a complex network spread throughout the cytoplasm that can detect and transmit signals originating in any compartment of the cell. It is implicated in essential cellular activities including Ca^{2+} storage and signal transduction (39, 40). Specialized chaperones and folding enzymes control ER homeostasis in the cells by keeping the balance between the cellular need for protein synthesis and proper protein folding. However, various conditions and external inputs are capable to disrupt ER homeostatic environment. Situations of excess nutrients, insulin resistance, and inflammation commonly associated with obesity induce ER stress, compromising cellular function (41, 42). Other disturbances that provoke ER stress include disrupted calcium homeostasis, lack of energy or glucose, changes in ROS level, ischemia, mutations, and viral infections (43).

The sensory machinery of ER stress is composed of three proteins bound to ER membrane, namely double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER kinase (PERK), inositol requiring 1 (IRE1), and activating transcription factor 6 (ATF6). Upon activation, these sensor molecules transduce a signaling cascade from ER to nucleus, the UPR. Several downstream effectors are regulated by UPR that lead to adaptive response, feedback control, and regulation

of cell fate (44). Adaptation initially involves activation of molecular chaperones and folding enzymes to achieve enhanced protein-folding activity. This leads to reduced ER workload through mRNA degradation and attenuation of translation as well as elevated ER-associated protein degradation and clearance of unwanted proteins through autophagy. In the case of harmful UPR hyperactivation, however, UPR master regulators are switched off along with downstream signaling molecules to resolve the unwanted effects (44). The UPR is therefore responsible, apart from cell survival, to also promote cell death (Fig. 1). Indeed, in situations of prolonged ER stress due to either chronic exposure to high glucose or genetic mutations, UPR activates death receptors through the same three transducers, acting as a

“binary switch” and leading to apoptosis (44). The deleterious effects of unresolved and sustained ER stress such as perturbed calcium homeostasis, accumulation of unfolded proteins, loss of ER function, and apoptosis have been associated with the development of pathological conditions such as inflammation, diabetes, atherosclerosis, and neurodegenerative disorders.

ER homeostasis is particularly important for human metabolism because it coordinates the response of all metabolic organs by controlling the synthesis and catabolism of various nutrients. ER controls insulin synthesis, folding, and production in the pancreatic β -cell (Fig. 1A). Glucose metabolism involves all the three branches of UPR, and ER is implicated in the transcription of most glucose-regulating genes (45). Experimental animal models harboring UPR deficiency (PERK-targeted) or mutation disrupting eIF2 α phosphorylation show defective gluconeogenesis in their livers (42, 46) and subsequent pancreatic islet cell dysfunction or death linked to ER failure (47). Additionally, mice expressing the C-terminal fragment of Gadd34 in liver demonstrate defective gluconeogenesis and reduced hepatic glycogen that lead to problems in blood glucose handling during fasting (48). Furthermore, ER stress triggers transcriptional networks that target genes implicated in glucose output and glycogen synthesis such as glycogen synthase 1, an XBP1 target (45, 49). Another component of ER machinery that is implicated in glucose production in the liver is ATF6, which is regulated through the interaction with the cAMP response element binding-regulated transcription activator 2 (CRTC2/TORC2) (45). ER stress leads to dephosphorylation of CRTC2 and entry in the nucleus of cultured cells where it promotes expression of ER control genes through binding to ATF6. ATF6 activation reduces glucose output in the liver through dissociation of the cAMP response element binding-CRTC2 complex, thus inhibiting CRTC2 interaction with gene promoters implicated in gluconeogenesis (45).

UPR response is also involved in the control of cellular lipogenesis because ER plays a regulatory role in the synthesis of fatty acids and cholesterol. This is mediated through activation of the transcription factors, sterol regulatory element-binding protein (SREBP) located in the ER (50). When sterol or insulin levels are low, SREBP are translocated to the Golgi, where they are processed and activated (51). ER stress may also induce SREBP activation and thus regulate the transcription of target genes involved in lipid synthesis (SREBP1c) or cholesterol metabolism (SREBP1a, SREBP2) (52). ER stress also interferes with lipid metabolism in the liver, along with iron and glucose homeostasis (Fig. 1B).

Furthermore, UPR pathways are linked to stress signaling through activator protein-1 and to inflammation through induction of NF- κ B pathway, nitric oxide, and

ROS production (4). These pathways play a central role in metabolic abnormalities characterized by abnormal insulin action and obesity-induced inflammation. The interplay of ER stress and inflammation is two-sided, with inflammatory mediators and several cellular pathways having a negative input on ER homeostasis. This relationship is cell type-dependent, and further research is required to establish the exact mediators of each cell's susceptibility to inflammation and ER homeostasis. Advanced glycation being a major trigger of inflammatory response, hypoxia and oxidative stress could also be involved in modulation of ER homeostasis (Fig. 2).

Crosstalk between AGE and ER Stress Signaling

Evidence of the direct induction of ER stress by AGE comes from the original study of Chen *et al.* (53) where murine podocytes exposed to AGE-BSA showed increased expression of glucose regulated protein (GRP)78 (an ER stress marker) and apoptosis in a dose- and time-dependent manner. This effect was accompanied by increased intracellular Ca²⁺ levels and inhibited by tauroursodeoxycholic acid, an ER stress inhibitor with chaperone function that promotes proper folding and trafficking. The reduction of apoptosis that was observed by using this inhibitor indicates the involvement of UPR apoptotic pathway in mediating AGE effects rather than canonical RAGE signaling, providing an important molecular mechanism implicated in diabetic nephropathy (53).

In a similar way, when human osteoarthritic chondrocytes were exposed to AGE-BSA, an increased expression of GRP78 was observed, followed by elevated expression of IL-6 and IL-8. This effect was mediated through RAGE via p-38 MAPK activation, providing an alternative mechanism that contributes to the pathogenesis of osteoarthritis (54).

Subsequent studies with human dermal fibroblasts showed that deoxyglucosone, an AGE-precursor, is associated with ER stress-induced apoptosis. Collagen type I modified by 3-deoxyglucosone induces ROS and apoptosis mediated through ER stress pathway [via C/EBP homologous protein (CHOP) activation] and not through the RAGE signaling (55), providing a link between AGE and ER stress in the pathogenesis of diabetic wounds. These data are in accordance with preliminary findings of our group where glycated albumin induced direct activation of ER stress through GRP78 in endothelial cells (human aortic endothelial cells) that was followed by CHOP induction and apoptosis in a concentration-dependent manner.

Another study of endothelial cells from bovine aortas incubated with oxidized low-density lipoprotein (LDL)

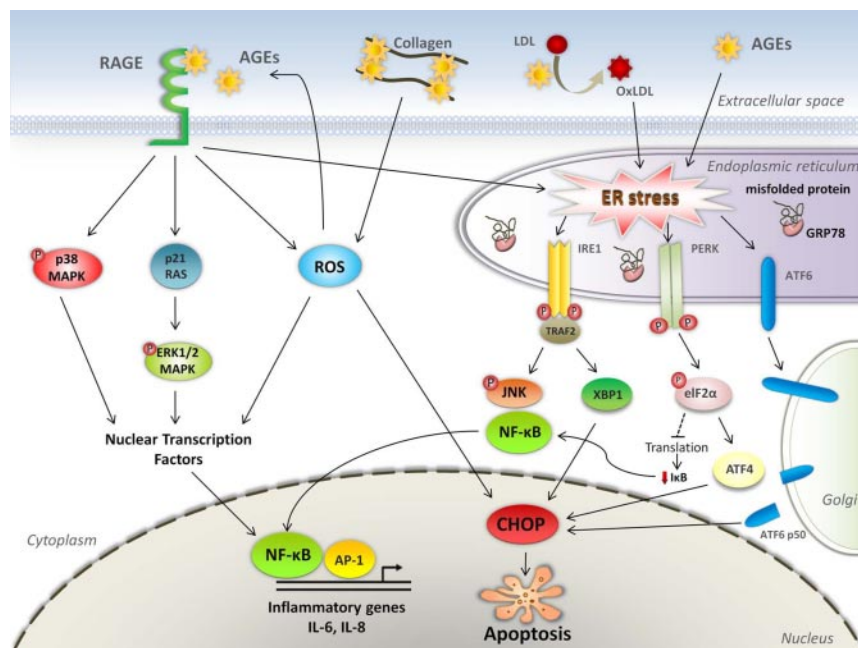


FIG. 2. Crosstalk of AGE signaling and UPR. AGE and oxidized-LDL can directly or indirectly (through receptor for AGE) induce ER stress. AGE-RAGE signaling and AGE-modified long-lived proteins (such as collagen) lead to increased ROS production and UPR, via CHOP activation, resulting in apoptosis. AGE and UPR pathways are linked to stress signaling through activator protein-1 and to inflammation through induction of NF- κ B pathway and ROS production.

showed increased ER stress markers expression, GRP78, p-PERK and activated ATF6 mediated through AMP-activated protein kinase activation (56). These effects were accompanied by impaired vasorelaxation of the endothelium and subsequent endothelial dysfunction in mice fed with a rich-in-fat diet.

Indirect Mechanisms Contributing to ER Stress Induction by AGE

The close link of AGE with oxidative stress, low or high glucose conditions, RAGE-mediated inflammation, hypoxia, and aging allocates them as likely contributors of the integrated ER response in metabolic regulation (Fig. 2).

Oxidative Stress

It is known that production of ROS by oxidative stress enhances AGE formation, therefore altering protein function. ROS, however, also interfere with the protein-folding process and disulfide bonds leading to misfolding of proteins in the ER. Furthermore, ROS presence enhances adipocyte differentiation and lipid accumulation, leading to ER stress followed by insulin resistance (57, 58).

There is evidence that intake of a high-fat diet can induce both AGE formation and oxidative stress, which further re-

sult in ER stress, impairing insulin action through insulin receptor substrate 1 phosphorylation in liver or adipose tissue of dietary and genetic mouse models of obesity (53, 59–62). In a more recent study, increased AGE and ROS were observed in the hippocampus of mice fed with a rich-in-cholesterol diet and promoted ER stress induction through increased phosphorylation of PERK and eIF2 α . ER stress further impaired insulin signaling by increasing IRS1 phosphorylation, reducing phosphoinositide kinase-3/Akt activity and inducing NF- κ B activation (63).

Indirect evidence of the pathogenic interrelation of ROS generation, advanced glycation, and ER stress comes also from studies with antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD). Transgenic animals overexpressing copper-zinc SOD showed reduced ischemic neuronal cell death mediated through ATF4 and CHOP than in wild-type hippocampus (64). Similarly, mice deficient in cytoplasmic copper-zinc SOD exhibited increased plaque and neuronal inflammation, accompanied by AGE production (CML) and oxidative damage leading to memory impairment (65).

Furthermore, in cultures of renal proximal tubular cells, cadmium was able to induce increased ROS production and subsequent ER stress leading to apoptosis that was prevented when cells were transfected with manganese SOD (66). Moreover, manganese SOD was found to attenuate advanced glycation and methylglyoxal production by decreasing ROS production in mitochondria of human aortic endothelial cells cultured in high glucose (67).

Glucose Levels

Low glucose levels due to starvation or other metabolic dysregulation leading to energy loss have a detrimental effect in protein folding, resulting in unfolded protein accumulation in the ER lumen (5). Hyperglycemia on the other hand is the main trigger of ROS formation involved in AGE formation and ER stress induction, further mediating the metabolic complications of diabetes, obesity, and neurodegeneration (19, 20, 64, 67). Various studies have shown the increased ROS generation due to high glucose that enhances AGE precursor formation and advanced glycation contributing to ER stress manifestations such as

inflammation. In addition, resident proteins of the ER (chaperones or folding sensor proteins) that control protein folding can also be modified by oxidation or glycation altering the UPR adaptive ability (68, 69).

Inflammation

AGE-RAGE signaling pathway in endothelium may result in NF- κ B activation either directly or through MAPK cascades (ERK1/2 and p38) resulting in proinflammatory cytokine production (13, 28, 70, 71). Cytokines are also able to induce ER stress leading to chronic inflammation, indicating that the effects of advanced glycation and ER stress can be mediated through RAGE (3, 4). Additionally, a study of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis showed that elevated ER stress stimulated S100B and RAGE expression in astroglial cells resulting in proinflammatory cytokine production (72). Therefore, ER stress can further stimulate AGE-RAGE signaling, exacerbating oxidative stress and inflammation.

Hypoxia

Protein folding can be severely affected by hypoxic conditions where aberrant oxygen tension or loss of energy due to metabolic disturbances can occur (5). The resulted unfolded protein load and protein aggregates in the ER induce ER stress (5). Accumulation of AGE and proapoptotic UPR signaling has been observed in conditions of hypoxic reperfusion or ischemia of the heart, kidney, or brain, indicating their role in the pathogenesis of hypoxic injury (73, 74). Studies focused on kidney damage by these conditions point out the increased cytotoxicity of methylglyoxal, which leads to apoptosis through ER stress. Inhibition of methylglyoxal by an AGE detoxifying enzyme, glyoxalase I, or inhibition of UPR by GRP78 overexpression further improves kidney damage (5, 73, 74).

Hypoxic environment is commonly a hallmark of malignant cells due to poor vascularization of most solid tumors leading to ER stress and energy loss. The hypoxia-induced UPR is thus crucial for tumor cell survival (75, 76). Induced GRP78 expression in tumor cells improves protein folding and correlates positively with tumor proliferation, metastasis, and drug resistance (77). Furthermore, the presence of AGE is also increased in a range of tumors correlating with metastasis and reduced survival interrelating AGE and ER stress in tumorigenesis (78).

Aging

The aging process has been ultimately associated with elevated AGE presence contributing to chronic diabetic

complications, senescence, and age-related diseases. At the same time, molecular chaperones and ER-resident enzymes are altered by aging, further compromising UPR adaptive properties (69). Two studies performed on *Caenorhabditis elegans* underline the role of AGE and ER stress in aging. *C. elegans* either overexpressing glyoxalase I homolog or being deficient in HIF-1, a hypoxic transcription factor, showed increased life span due to ROS or ER stress reduction, respectively (79, 80). The combination of both interventions may be the secret of cellular homeostasis and longevity.

Targeting Advanced Glycation Improves ER Homeostasis

The crosstalk of advanced glycation with ER stress signaling underlies the pathophysiology of several disorders related to metabolism as well as ischemic and neurodegenerative diseases. Current evidence indicates that some inhibitors of advanced glycation may prove beneficial in maintaining ER homeostasis through modulation of UPR response (Table 1).

AGE Formation Inhibitors

Aminoguanidine, a well-established AGE inhibitor that has the ability to sequester the toxic 1,2-dicarbonyl compounds and render them into nontoxic triazines has been currently tested in a rat model with diabetic nephropathy (81). It was proven effective in up-regulating PERK, therefore alleviating associated ER stress and reducing inflammatory cytokine production (81).

Hypoglycemic Agents

The bisguanidine metformin is a glucose-lowering agent with antioxidant properties and a common antidiabetic drug. Previous studies along with our data have shown that metformin acts as a moderate AGE inhibitor through its reaction with methylglyoxal to form dihydroimidazolone, a less potent derivative (82, 83). Recently, metformin was found to reduce ER stress induction in hepatocytes (HepG2) through blockage of GRP78, CHOP, and XBP-1, suggesting its potential use in nonalcoholic fatty liver disease (84). Furthermore, metformin has a protective role against dysfunction and ER stress-induced death in pancreatic β -cells (NIT-1) (85). Another hypoglycemic agent, pioglitazone, known to decrease AGE formation (86), is also able to reduce ER stress in liver and reduce

TABLE 1. AGE inhibitors targeting ER stress

Action	Compound	<i>In vitro</i> studies	<i>In vivo</i> studies	Human/clinical trials (phase)	Ref.
Inhibition of AGE formation	Aminoguanidine	↓ PERK (rat kidney)	↓ Neuropathy	↓ Nephropathy	81
Antihypertensive drugs	Olmesartan	↓ CHOP (murine heart tissue)	↓ Nephropathy ↓ Retinopathy ↓ Heart damage	↓ Retinopathy (III)	92
Hypoglycemic agents	Metformin	↓ GRP78, ↓ CHOP, ↓ p-eIF2 α , ↓ ATF6 (HepG2, NIT1)	↓ Hyperglycemia ↓ Insulin resistance	Major antidiabetic drug	82–85
	Pioglitazone	↓ GRP78, ↓ p-eIF2 α (liver, murine β -cell)	↓ Hyperglycemia ↓ Insulin resistance	Antidiabetic drug	86–88
Inhibition of AGE absorption	AST-120 (Kremazin)	↓ CHOP (rat renal tubules)	↓ Apoptosis ↓ Renal failure ↓ Uremic toxins		89, 90
Antioxidant enzymes	Manganese SOD	↓ XBP1, ↓ ATF6, ↓ CHOP (porcine renal proximal tubules)	↓ Nephropathy		66, 67
	Catalase	↓ GRP78, ↓ p-PERK (human endothelial cells)	↓ Atherogenesis ↓ Cardiac aging		93, 94
Antioxidants	N-acetyl cysteine	↓ CHOP (porcine renal tubular cells) ↓ IRE1, ↓ p-PERK, ↓ ATF6 (human endothelial cells)	↓ Nephropathy ↓ Atherogenesis		90 95
	Troloxerutin	↓ PERK, ↓ eIF2 α (murine brain)	↓ Neuropathy, ↓ cognitive impairment		63
	Curcumin	↓ GRP94, ↓ CASPASE 12 (murine myoblasts) ↓ GRP78, ↓ GRP94 (bovine endothelial cells)	↓ Myogenic cell damage ↓ Atherogenesis		96–99 100
	Carnosine	↓ p-eIF2 α (SH-SY5Y cells)	↓ Neuropathy	↓ Cataracts	101, 102
	Quercetin	↓ ATF4 (HEK293)	↓ Amyloid β production ↓ Neurodegeneration		103, 104 105, 106
	α -Lipoic acid	↓ CHOP ↓ BAX (FRTL5 thyroid cells)			
ROS scavengers	TM2002	↓ ORP150 (rat brain)	↓ Neuropathy ↓ Cerebral ischemia		107, 108
	Tempol	↓ GRP78, ↓ p-PERK, ↓ ATF6 (bovine endothelial cells)	↓ Atherogenesis ↓ Endothelial dysfunction		56

insulin resistance in diabetic mice (87) as well as in pancreatic β -cells of Wfs1-knockout mice (88).

AGE Absorption Inhibitors

A novel approach to reduce the deleterious effects of AGE is to block their absorption with oral absorbents. AST-120 is able to bind CML and decrease AGE levels in diabetic subjects with chronic renal failure (89). The same agent when administered in a nephrectomized rat model with chronic kidney disease was able to decrease tubular expression of CHOP, thus suppressing disease progression (90).

Antihypertensive Drugs

Antihypertensive drugs (angiotensin type 1 receptor blockers and inhibitors of angiotensin-converting en-

zyme) acting on the renin-angiotensin system reduce oxidative stress through ROS scavenging and at the same time inhibit advanced glycation (91). In parallel, ER stress is induced by angiotensin II, suggesting an interaction between these pathways. In the study by Okada *et al.* (92), apoptosis of cardiac myocytes during hypertrophy and heart failure of mice subjected to transverse aortic constriction may be mediated through prolonged ER stress. The angiotensin type 1 receptor blocker olmesartan prevented ER stress induction and proapoptotic cascade in this model, improving heart damage (92).

Antioxidants

Various antioxidant compounds have been studied relative to their action over reduction of advanced glycation. Their potent reducing effect is attributed to reduction of

ROS formation mainly through scavenging of free radicals and inhibition of glycooxidation. The scavenging activity of these agents is also capable of modulating UPR. In addition to SOD, catalase, an antioxidant enzyme involved in H_2O_2 detoxification, has been found to reduce AGE levels in cardiomyocytes during cardiac aging of transgenic mice overexpressing the cardiac isoform of the enzyme (93). In parallel, in human endothelial cells, catalase was effective in blocking UPR activation induced by tunicamycin and HIV-1 Tat (ER stressors) (94).

The precursor of the anti-oxidant glutathione, N-acetyl cysteine inhibits ER stress-mediated apoptosis through inhibition of CHOP activation in tubular cells of patients with end-stage renal failure, therefore stabilizing ER homeostasis (90). In addition, N-acetyl cysteine inhibits lipoxidation- and oxidized LDL-induced ER stress in human endothelial cells implicated in atherogenesis (95).

Troloxerutin, a natural flavonoid, is able to decrease AGE levels and concomitantly reduce oxidative and ER stress in cholesterol-induced cognitive impairment in mice (63). It reduced PERK and eIF2 α as well as NF- κ B activation due to ER stress in the hippocampus and enhanced insulin signaling, thus preventing obesity and restoring blood glucose levels. The antioxidant and antiinflammatory effects of troloxerutin make it a possible candidate for prevention of cognitive deficits in T2D and Alzheimer's disease.

Curcumin, a natural polyphenol with antioxidant capacity, acts through scavenging of superoxide anions and

hydroxyl radicals, being effective in reducing AGE levels and collagen cross-linking as well as decreasing oxidative stress and inflammation in diabetic rats (96, 97) and humans (98). Recently, curcumin has been associated with induction of the ER stress chaperone, GRP94, in myogenic cell damage where it restores calcium levels and protects from apoptosis (99). Lead-induced ER stress in endothelial cells of bovine aortas is inhibited by pretreatment with curcumin that specifically increases GRP78 and GRP94 expression (100).

Other antioxidant agents such as carnosine (101, 102), quercetin (103, 104), and α -lipoic acid (105, 106) have been found effective in reducing advanced glycation *in vivo* as well as inhibiting ER stress response in independent studies. However, their concomitant action in these processes and estimation of physiological relevant doses to achieve antioxidant capacity seek further evaluation.

ROS Scavengers

Newly synthesized ROS scavenging compounds, such as TM2002 and tempol, were the first to be tested in experimental models. TM2002, being a derivative of edaravone, is a nontoxic scavenger of low molecular weight that inhibits AGE production by reducing oxidative stress. TM2002 has been tested in rat models of cerebral ischemia with neuroprotective properties that were attributed to its ability to reduce advanced glycation, oxidative stress, and ER stress (107). Although the clinical use of this agent is prohibited due to severe side effects, several new derivatives have been synthesized and are under testing (108).

Another scavenger of free radicals, namely tempol, mimics the effects of SOD and presents antioxidant properties *in vitro* and *in vivo* (56). Tempol is efficient in inhibiting LDL glycation and blocks associated ER stress response that leads to endothelial deregulation.

Several chemical chaperones that alleviate ER stress with protective role toward ER stress in liver have been found useful in protecting animals from obesity-induced ER stress (109). Administration of the chaperones in obese mice

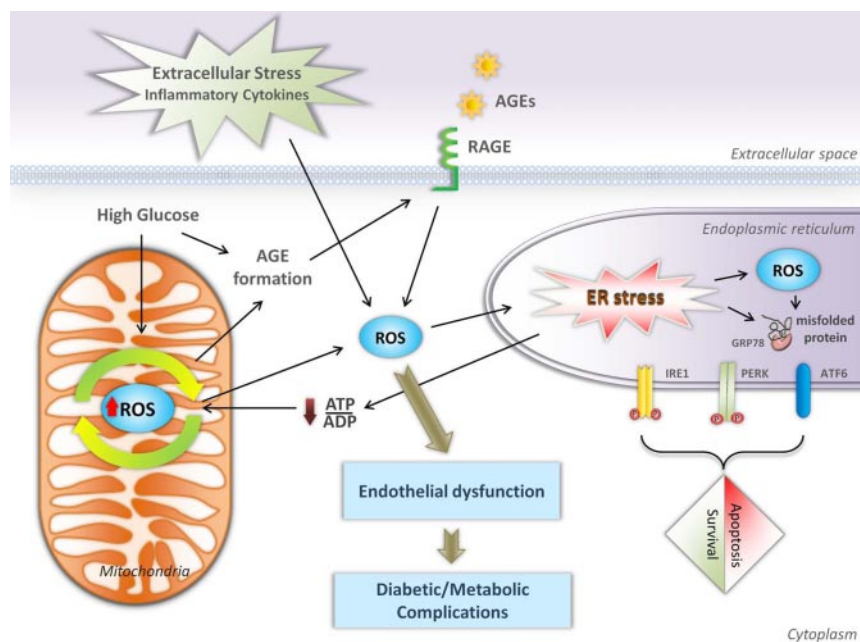


FIG. 3. Parallel and linear induction of AGE and ER stress in the pathology of metabolic diseases. Extracellular stress, AGE-RAGE signaling, intracellular hyperglycemia, or mitochondrial respiration by-products induce ROS generation that directly or indirectly affect ER homeostasis and protein folding. Alteration in redox status or overproduction of ROS is the primary and central event in the pathogenesis of diabetic/metabolic complications.

Chemical Chaperones

Several chemical chaperones that alleviate ER stress with protective role toward ER stress in liver have been found useful in protecting animals from obesity-induced ER stress (109). Administration of the chaperones in obese mice

established normoglycemia and thus reduced advanced glycation, increased insulin sensitivity, and reduced fatty liver disease. The treatment suppressed inflammatory signaling along with ER stress and accelerated signal transduction through insulin receptor in liver and adipose tissue (109).

Conclusions

Current evidence indicates the mutual induction of AGE and ER stress in the pathology of various metabolic diseases. Key mediators of this crosstalk seem to be oxidative stress generated in mitochondria or ER, inflammation, and hyperglycemia (Fig. 3). Maintenance or enhancement of ER proper function through concerted up-regulation of protein-folding chaperones, metabolic hormones with protective effects, and direct targeting of the implicated transcription factors in metabolic active tissues may prove powerful in treating chronic metabolic diseases.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Professor Athanasios G. Papavassiliou, Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Athens, 75, M. Asias Street, 11527 Athens, Greece. E-mail: papavas@med.uoa.gr.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Hossain P, Kowar B, El Nahas M 2007 Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *N Engl J Med* 356:213–215
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, Lamb MM, Flegal KM 2010 Prevalence of high body mass index in US children and adolescents. *JAMA* 303:242–249
- Hotamisligil GS 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860–867
- Hotamisligil GS 2010 Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140:900–917
- Inagi R 2011 Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 491:361–380
- Ron D, Walter P 2007 Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519–529
- Cho SJ, Roman G, Yeboah F, Konishi Y 2007 The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr Med Chem* 14:1653–1671
- Brownlee M 2001 Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820
- Thornalley JP 1996 Advanced glycation and the development of diabetic complications: unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. *Endocrinol Metab* 3:149–166
- Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vannatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A 1997 Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13915–13920
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, Heitmann K, Vlassara H 1997 Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6474–6479
- Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB, Bucala R 1998 Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med* 4:594–601
- Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ 2002 Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15596–15601
- Zheng F, He C, Cai W, Hattori M, Steffes M, Vlassara H 2002 Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. *Diabetes Metab Res Rev* 18:224–237
- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A, Creatas G 2005 Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62:37–43
- Diamanti-Kandarakis E, Katsikis I, Piperi C, Alexandraki K, Panidis D 2007 Effect of long-term orlistat treatment on serum levels of advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:103–109
- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Alexandraki K, Katsilambros N, Kouroupi E, Papailiou J, Lazaridis S, Koulouri E, Kandarakis HA, Douzinas EE, Creatas G, Kalofoutis A 2006 Short-term effect of orlistat on dietary glycotoxins in healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 55:494–500
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA 2006 Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114:597–605
- Schiekofer S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T, Stefan N, Humpert P, Fritsche A, Stumvoll M, Schleicher E, Häring HU, Nawroth PP, Bierhaus A 2003 Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor- κ B in PBMCs. *Diabetes* 52:621–633
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D 1994 Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889–9897
- Vlassara H 1996 Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med* 28:419–426
- Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS 1992 Altered cellular interactions between endothelial cells and non enzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 267:12404–12407
- Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA 2005 Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:932–943
- Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED 1999 Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 42:728–736
- Bucala R, Vlassara H 1995 Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis* 26:875–888
- Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR 1994 Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 343:1519–1522
- Hyogo H, Yamagishi S 2008 Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des* 14:969–972
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R 2004 Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63:582–592
- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Korkolopoulou P, Kandarakis E, Levidou G, Papalois A, Patsouris E, Papavassiliou AG 2007 Ac-

- cumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med Berl* 85:1413–1420
30. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, Papavassiliou AG, Duleba AJ 2007 Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol* 127:581–589
 31. Diamanti-Kandarakis E, Katsikis I, Piperi C, Kandaraki E, Piouka A, Papavassiliou AG, Panidis D 2008 Increased serum advanced glycation end-products is a distinct finding in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:634–641
 32. Diamanti-Kandarakis E, Lambrinouadaki I, Economou F, Christou M, Piperi C, Papavassiliou AG, Creatsas G 2010 Androgens associated with advanced glycation end-products in postmenopausal women. *Menopause* 17:1182–1187
 33. Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA 2007 Collagen, cross-linking and advanced glycation end-products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 103:2068–2076
 34. Snow LM, Fugere NA, Thompson LV 2007 Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:1204–1210
 35. Hein GE 2006 Glycation end products in osteoporosis—is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta* 371:32–36
 36. Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Ciriogliaro M, Federici M, Federici A 2005 Advanced glycation end-products and bone loss during aging. *Ann NY Acad Sci* 1043:710–717
 37. Kimura T, Takamatsu J, Ikeda K, Kondo A, Miyakawa T, Horiuchi S 1996 Accumulation of advanced glycation end products of the Maillard reaction with age in human hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 208:53–56
 38. Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J, Taniguchi N, Vitek MP, Founds H, Atwood CS, Perry G, Smith MA 2001 Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: Nε-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic Biol Med* 31:175–180
 39. Melloul D, Marshak S, Cerasi E 2002 Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309–326
 40. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS 2006 Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136:873–876
 41. Goodge KA, Hutton JC 2000 Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic β -cell. *Semin Cell Dev Biol* 11:235–242
 42. Scheuner D, Vander Mierde D, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K, Ribick M, Schuit FC, Kaufman RJ 2005 Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in β cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 11:757–764
 43. Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM 2002 The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:411–421
 44. Osowski CM, Urano F 2010 The binary switch between life and death of endoplasmic reticulum-stressed β cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:107–112
 45. Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M 2009 The CREB coactivator CRT2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 460:534–537
 46. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D 2000 Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099–1108
 47. Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, Gildersleeve RD, Pennathur S, Kaufman RJ 2009 Translation attenuation through eIF2 α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in β cells. *Cell Metab* 10:13–26
 48. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D 2008 Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* 7:520–532
 49. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH 2008 Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320:1492–1496
 50. Gregor MF, Hotamisligil GS 2007 Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48:1905–1914
 51. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL 2000 Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391–398
 52. Gregor MF, Yang L, Fabbri E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S 2009 Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58:693–700
 53. Chen Y, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Lu YB, Fang L, Yang JW, Liu C 2008 Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *Am J Nephrol* 28:1014–1022
 54. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM, Tariq M 2010 Advanced glycation end products (AGEs)-induced expression of IL-6 and IL-8 in human osteoarthritis chondrocytes correlates with the induction of endoplasmic reticulum stress. *Arthritis and Rheumatism*, 62 Nov 2010, Abstract
 55. Loughlin DT, Artlett CM 2010 Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. *PLoS One* 5:e11093
 56. Dong Y, Zhang M, Wang S, Liang B, Zhao Z, Liu C, Wu M, Choi HC, Lyons TJ, Zou MH 2010 Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes* 59:1386–1396
 57. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW 2009 Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 284:10601–10609
 58. Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K 2008 Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375:602–607
 59. Sparks DL, Schreurs BG 2003 Trace amounts of copper in water induce b-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11065–11069
 60. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457–461
 61. Tokita Y, Hirayama Y, Sekikawa A, Kotake H, Toyota T, Miyazawa T, Sawai T, Oikawa S 2005 Fructose ingestion enhances atherosclerosis and deposition of advanced glycation end-products in cholesterol-fed rabbits. *J Atheroscler Thromb* 12:260–267
 62. Sato M, Kawakami T, Kondoh M, Takiguchi M, Kadota Y, Himeno S, Suzuki S 2010 Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. *FASEB J* 24:2375–2384
 63. Lu J, Wu DM, Zheng ZH, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF 2011 Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain* 134:783–797
 64. Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH 2005 Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:41–53
 65. Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T 2011 SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286:44557–44568
 66. Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Du S, Kasai A, Takano Y, Shitamura A, Shimada T, Yao J, Kitamura M 2008 Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem* 283:4252–4260
 67. Yao D, Brownlee M 2010 Hyperglycemia-induced reactive oxygen

- species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 59:249–255
68. Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Nishi T, Maier CM, Kinouchi H, Chan PH 2003 Oxidative damage to the endoplasmic reticulum is implicated in ischemic neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1117–1128
 69. Naidoo N 2009 The endoplasmic reticulum stress response and aging. *Rev Neurosci* 20:23–37
 70. Wautier JL, Schmidt AM 2004 Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 95:233–238
 71. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM 2002 Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599–622
 72. Saha A, Kim SJ, Zhang Z, Lee YC, Sarkar C, Tsai PC, Mukherjee AB 2008 RAGE signaling contributes to neuroinflammation in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *FEBS Lett* 582:3823–3831
 73. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R 2009 Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F912–F921
 74. Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Ito K, Kudo T, Imai-zumi K, Ikeda M 2009 The protective effect of a newly developed molecular chaperone-inducer against mouse ischemic acute kidney injury. *J Pharmacol Sci* 109:311–314
 75. Koumenis C 2006 ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Curr Mol Med* 6:55–69
 76. Dioufa N, Kassi E, Papavassiliou AG, Kiaris H 2010 Atypical induction of the unfolded protein response by mifepristone. *Endocrine* 38:167–173
 77. Lee AS 2007 GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 67:3496–3499
 78. Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T 2007 RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 7:777–789
 79. Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, Sayed AA, Thornalley P, Ahmed N, Baynes J, Thorpe S, Kukudov G, Schlotterer A, Bozorgmehr F, El Baki RA, Stern D, Moehrlin F, Ibrahim Y, Oikonomou D, Hamann A, Becker C, Zeier M, Schwenger V, Miftari N, Humpert P, Hammes HP, Buechler M, Bierhaus A, Brownlee M, Nawroth PP 2008 Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7:260–269
 80. Chen D, Thomas EL, Kapahi P 2009 HIF-1 modulates dietary restriction mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5:e1000486
 81. Hu C, Cong XD, Dai DZ, Zhang Y, Zhang GL, Dai Y 2011 Argirein alleviates diabetic nephropathy through attenuating NADPH oxidase, Cx43, and PERK in renal tissue. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 383:309–319
 82. Battah S, Ahmed N, Thornalley PJ 2002 Kinetics and mechanism of the reaction of metformin with methylglyoxal. *Int Congr Ser* 1245:355–356
 83. Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Piperi C, Aessopos A, Paterakis T, Katsikis I, Panidis D 2007 Effect of metformin administration on plasma advanced glycation end product levels in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 56:129–134
 84. Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ 2010 Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32:251–257
 85. Jung TW, Lee MW, Lee YJ, Kim SM, Jung TW 2012 Metformin prevents thapsigargin-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH(2) terminal kinase in NIT-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 417:147–152
 86. Miyata T, Dan T 2008 Inhibition of advanced glycation end products (AGEs): an implicit goal in clinical medicine for the treatment of diabetic nephropathy? *Diabetes Res Clin Pract* 82(Suppl 1):S25–S29
 87. Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka TA, Kasami R, Kohno K, Iwawaki T, Nakatani Y, Yamasaki Y, Shimomura I, Matsuhisa M 2009 Pioglitazone reduces ER stress in the liver: direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr J* 56:1103–1111
 88. Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara Y, Tanabe K, Tsuru M, Miyazaki M, Saeki S, Saito T, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y 2009 Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic β cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia* 52:653–663
 89. Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Inoue H, Takeuchi M 2007 Oral administration of AST-120 (Kremezin) is a promising therapeutic strategy for advanced glycation end product (AGE)-related disorders. *Med Hypotheses* 69:666–668
 90. Kawakami T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M 2010 Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F568–F576
 91. Nangaku M, Miyata T, Sada T, Mizuno M, Inagi R, Ueda Y, Ishikawa N, Yuzawa H, Koike H, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K 2003 Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J Am Soc Nephrol* 14:1212–1222
 92. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M 2004 Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110:705–712
 93. Ren J, Li Q, Wu S, Li SY, Babcock SA 2007 Cardiac overexpression of antioxidant catalase attenuates aging-induced cardiomyocyte relaxation dysfunction. *Mech Ageing Dev* 128:276–285
 94. Wu RF, Ma Z, Liu Z, Terada LS 2010 Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol Cell Biol* 30:3553–3568
 95. Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marchet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, Nègre-Salvayre A 2009 Oxidized low density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res* 104:328–336
 96. Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G 1998 Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 56:1607–1614
 97. Suryanarayana P, Krishnaswamy K, Reddy GB 2003 Effect of curcumin on galactose-induced cataractogenesis in rats. *Mol Vis* 9:223–230
 98. Bengmark S, Mesa MD, Gil A 2009 Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp* 24:273–281
 99. Pizzo P, Scapin C, Vitadello M, Florean C, Gorza L 2010 Grp94 acts as a mediator of curcumin-induced antioxidant defence in myogenic cells. *J Cell Mol Med* 14:970–981
 100. Shinkai Y, Yamamoto C, Kaji T 2010 Lead induces the expression of endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and GRP94 in vascular endothelial cells via the JNK-AP-1 pathway. *Toxicol Sci* 114:378–386
 101. Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P 1995 Non-enzymic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-crosslinking agent. *FEBS Lett* 371:81–85
 102. Oh YM, Jang EH, Ko JH, Kang JH, Park CS, Han SB, Kim JS, Kim KH, Pie JE, Shin DW 2009 Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced endoplasmic reticulum stress by l-carnosine in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 459:7–10
 103. Sengupta B, Uematsu T, Jacobsson P, Swenson J 2006 Exploring the antioxidant property of bioflavonoid quercetin in preventing DNA glycation: a calorimetric and spectroscopic study. *Biochem Biophys Res Commun* 339:355–361
 104. Ohta K, Mizuno A, Li S, Itoh M, Ueda M, Ohta E, Hida Y, Wang

- MX, Furoi M, Tsuzuki Y, Sobajima M, Bohmoto Y, Fukushima T, Kobori M, Inuzuka T, Nakagawa T 2011 Endoplasmic reticulum stress enhances γ -secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 416:362–366
105. Muellenbach EA, Diehl CJ, Teachey MK, Lindborg KA, Archuleta TL, Harrell NB, Andersen G, Somoza V, Hasselwander O, Matuschek M, Henriksen EJ 2008 Interactions of the advanced glycation end product inhibitor pyridoxamine and the antioxidant α -lipoic acid on insulin resistance in the obese Zucker rat. *Metabolism* 57:1465–1472
106. Lee SJ, Kim SH, Kang JG, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ 2011 α -Lipoic acid inhibits endoplasmic reticulum stress-induced cell death through PI3K/Akt signaling pathway in FRTL5 thyroid cells. *Horm Metab Res* 43:445–451
107. Takizawa S, Izuhara Y, Kitao Y, Hori O, Ogawa S, Morita Y, Takagi S, van Ypersele de Strihou C, Miyata T 2007 A novel inhibitor of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress reduces infarct volume in rat focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1183:124–137
108. Izuhara Y, Nangaku M, Takizawa S, Takahashi S, Shao J, Oishi H, Kobayashi H, van Ypersele de Strihou C, Miyata T 2008 A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol Dial Transplant* 23:497–509
109. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS 2006 Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137–1140
110. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D 2001 Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7:1153–1163
111. Ladiges WC, Knoblaugh SE, Morton JF, Korth MJ, Sopher BL, Baskin CR, MacAuley A, Goodman AG, LeBoeuf RC, Katze MG 2005 Pancreatic β -cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* 54:1074–1081
112. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F 2005 WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 280:39609–39615
113. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M 2002 Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109:525–532
114. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ 2008 Chop deletion reduces oxidative stress, improves β cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 118:3378–3389
115. Bobrovnikova-Marjon E, Hatzivassiliou G, Grigoriadou C, Romero M, Cavener DR, Thompson CB, Diehl JA 2008 PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16314–16319
116. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P, Foufelle F 2009 GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 119:1201–1215
117. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A 2009 ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 325:877–880