

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rūta Motiejūnaitė

**PERICITŲ IR AUTOTAKSINO / LIZOFOSFATIDO
RŪGŠTIES SIGNALINIO KELIO REIKŠMĖS
KRAUJAGYSLIŲ REGRESIJAI TYRIMAS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2007 – 2012 metais Schepens akių tyrimų institute (The Schepens Eye Research Institute) Bostone, JAV ir Vilniaus universiteto Biochemijos ir biofizikos katedroje.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Andrius Kazlauskas (The Schepens Eye Research Institute, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School; fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	8
MOKSLINIS NAUJUMAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 KRAUJAGYSLIŲ FORMAVIMASIS, REGRESIJA IR STABILUMAS	12
1.1.1 Kraujagyslių tipų ir struktūros apžvalga. Endotelio ląstelės	12
1.1.2 Kraujagyslių formavimosi, stabilizavimo ir regresijos apžvalga	13
1.1.3 Kraujagyslių formavimosi molekuliniai mechanizmai	14
1.1.3.1 Vaskulogenezės molekuliniai mechanizmai	14
1.1.3.2 Angiogenozės molekuliniai mechanizmai	16
1.1.4 Kraujagyslių regresijos molekuliniai mechanizmai	19
1.1.4.1 Stiklakūnio ir tinklainės kraujagyslių regresijos apžvalga. Deguoninė retinopatija	20
1.1.4.2 Regresija, sukelta augimo ir / arba stabilizavimo signalų trūkumo ...	23
1.1.4.3 Aktyvių regresijos signalų sukelta regresija	26
1.1.5 Kraujagyslių stabilumo molekuliniai mechanizmai. Pericitai	28
1.1.5.1 Pericitų savybės ir funkcijos	29
1.1.5.2 Kraujagyslių padengimo pericitais molekuliniai mechanizmai	32
1.1.5.3 Pericitų poveikis kraujagyslių stabilumui	34
1.1.5.4 Kitos pericitų funkcijos. Klinikinė reikšmė	41
1.2 AUTOTAKSINO IR LIZOFOSFATIDO RŪGŠTIES SIGNALINIO KELIO REIKŠMĖ KRAUJAGYSLIŲ VYSTYMUISI IR FUNKCIJOMS	46
1.2.1 Lizofosfatido rūgštis	46
1.2.2 Autotaksinas	48
1.2.3 Fosfolipidų fosfatazės	51
1.2.4 ATX – LFR signalinio kelio funkcijos	53
1.2.5 ATX – LFR signalinio kelio reikšmė kraujagyslių augimui, regresijai ir funkcijoms	55
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	60
2.1 MEDŽIAGOS, LAŠTELĖS IR EKSPERIMENTINIAI GYVŪNAI	60
2.1.1 Reagentai ir tirpalai	60
2.1.2 Ląstelės	61
2.1.3 Eksperimentiniai gyvūnai	63
2.2 METODAI	64
2.2.1 Vamzdelių formavimosi ir regresijos kolageno gelyje tyrimas	64
2.2.2 Fluorescencinė mikroskopija	65
2.2.3 Kolageno gelių suardymas baltymų raiškos ir lipidų koncentracijos matavimams	66
2.2.4 Mikrosomų frakcijos su rekombinantine LFR aciltransferaze	

paruošimas	67
2.2.5 LFR koncentracijos matavimas.....	67
2.2.6 ¹⁴ C-LFR metabolizmo greičio matavimas.....	68
2.2.7 Baltymų NDS-PAAG elektroforezė.....	69
2.2.8 Imunofermentinė analizė (<i>Western blot</i>)	70
2.2.9 Genų tildymas RNR interferencija.....	71
2.2.10 ATX ECKO pelių išvedimas.....	73
2.2.11 Pelių genotipavimas.....	75
2.2.12 Baltymų raiškos limfmazgių kraujagyslėse nustatymas imunohistocheminiu metodu	77
2.2.13 Stiklakūnio kraujagyslių regresijos tyrimas.....	78
2.2.14 Tinklainės kraujagyslių tinklo tankio ir struktūros įvertinimas	78
2.2.15 Statistinė analizė	79
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	80
3.1 PERICITŲ POVEIKIO KRAUJAGYSLIŲ STABILUMUI <i>IN VITRO</i> MODELIO IŠVYSTYMAS	80
3.2 PERICITŲ POVEIKIO KRAUJAGYSLIŲ STABILUMUI MOLEKULINIO MECHANIZMO TYRIMAI.....	88
3.2.1 Pericitai neslopino endotelio ląstelių atsako į ATX ir LFR.....	89
3.2.2 Pericitai sumažino LFR koncentraciją kolageno geliuose	90
3.2.3 LPP aktyvumo slopinimas sukėlė mišrių vamzdelių regresiją.....	94
3.2.4 Mišrūs vamzdeliai greičiau metabolizavo žymėtą LFR	97
3.2.5 Mišrių vamzdelių LPP2 raiška buvo didesnė.....	100
3.2.6 LPP2 raiškos BREC arba pericituose sumažinimas nesukėlė mišrių vamzdelių regresijos	101
3.2.7 ATX aktyvumo slopinimas nesulygino LFR koncentracijų EL ir mišriuose vamzdeliuose	103
3.2.8 Vamzdelių regresiją slopino MMP slopiklis	105
3.2.9 Vamzdelių iš endotelio ląstelių ir pericitų stabilumo molekulinio mechanizmo modelis. Tolimesnių tyrimų gairės.....	107
3.3 ENDOTELIO LAŠTELIŲ AUTOTAKSINO REIKŠMĖS AKIES KRAUJAGYSLIŲ AUGIMUI IR REGRESIJAI TYRIMAS.....	109
3.3.1 ATX ECKO pelių išvedimas ir pradinis apibūdinimas	110
3.3.2 ATX ECKO ir kontrolinių pelių stiklakūnio kraujagyslių regresijos greitis nesiskyrė.....	113
3.3.3 ATX ECKO pelių tinklainės kraujagyslių tinklas buvo nepakitęs	114
IŠVADOS.....	119
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	120
Publikacijų sąrašas	142
Padėka.....	143

SANTRUMPOS

AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija
ANG-1, ANG-2 (angl. *angiopoietin*) – angiopoetinais 1 ir 2
ANOVA – dispersijos analizė (angl. *analysis of variance*)
APS – amonio peroksosulfatas
ATX (angl. *autotaxin*) – autotaksinas
ATX ECKO (angl. *ATX endothelial cell knock-out*) – pelės, kurių endotelio ląstelėse išveiklintas ATX koduojantis genas
BREC (angl. *bovine retinal endothelial cells*) – jaučio tinklainės endotelio ląstelės
BRP (angl. *bovine retinal pericytes*) – jaučio tinklainės pericitai
DAB – 3,3'-diaminobenzidinas
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolas
DLL4 (angl. *delta-like ligand 4*) – tam tikras membraninis signalinis baltymas
DMSO – dimetilsulfoksidas
DR – diabetinė retinopatija
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
EL – endotelio ląstelės
ENPP2 (angl. *ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2*) – autotaksiną koduojantis genas
EPO (angl. *erythropoietin*) – eritropoetinas
FBS (angl. *fetal bovine serum*) – negimusio veršelio kraujo serumas
FGF1, FGF2, FGF9 (angl. *fibroblast growth factor*) – fibroblastų augimo veiksniai 1, 2 ir 9
FR – fosfatido rūgštis
HB-EGF (angl. *heparin-binding epidermal growth factor*) – prie heparino besijungiantis epidermio augimo veiksnys
HBSS (angl. *Hank's balanced salt solution*) – druskų tirpalas su gliukoze
HBVP (angl. *human brain microvascular pericytes*) – žmogaus smegenų smulkiųjų kraujagyslių pericitai
HEK293 (angl. *human embryonic kidney 293*) – žmogaus embriono inkstų ląstelių linija
HEPES – 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis
HEV (angl. *high endothelial venules*) – specializuotos limfmazgių venulės
HIF (angl. *hypoxia-inducible factors*) – hipoksijos indukuojami veiksniai
HUVEC (angl. *human umbilical vein endothelial cells*) – žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelės
IGF-1 (angl. *insulin-like growth factor*) – į insuliną panašus augimo veiksnys 1
IHH (angl. *Indian hedgehog*) – tam tikras morfogenas
IPTG - izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas
KLF2 (angl. *Kruppel-like factor 2*) – tam tikras transkripcijos veiksnys
LFC – lizofosfatidilcholinas (angl. LPC – *lysophosphatidylcholine*)

LFR – lizofosfatido rūgštis / rūgštys (angl. LPA – *lysophosphatidic acid*)
 LPA₁₋₆ – LFR receptoriai
 LPP1, 2, 3 (angl. *lipid phosphate phosphatase*) – fosfolipidų fosfatazės 1, 2 ir 3
 MAG – monoacilglicerolis
 MMP (angl. *matrix metalloproteinases*) – užpildo metaloproteinazės
 MSC (angl. *mesenchymal stem cells*) – mezenchiminės kamieninės ląstelės
 NDS – natrio dodecilsulfatas
 NF-κB (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) – tam tikras transkripcijos veiksnys
 NG2 (*neuron-gial antigen 2*) – tam tikras membranos proteoglikanas
 NNR – neišnešiotų naujagimių retinopatija (angl. ROP – *retinopathy of prematurity*)
 NO – azoto monoksidas
 NOTCH – tam tikras membraninis signalinis baltymas
 NRARP (angl. *NOTCH-regulated ankyrin repeat protein*) – tam tikras signalinis baltymas
 NRP1, NRP2 (angl. *neuropilin*) – neuropilinai 1 ir 2
 NUC (angl. *nuclease*) – nukleazės domenas
 PBS (angl. *phosphate buffered saline*) – fosfatinis buferis su NaCl
 PDE (angl. *phosphodiesterase*) – fosfodiesterazės domenas
 PDGF-B, PDGF-BB (angl. *platelet-derived growth factor*) – trombocitų kilmės augimo veiksnio B monomeras ir dimeras
 PDGFRβ - trombocitų kilmės augimo veiksnio receptorių β
 PGC-1α – (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) – tam tikras transkripciją valdantis baltymas
 PGR – polimerazės grandininė reakcija
 PHD (angl. *prolyl hydroxylases*) – prolino hidroksilazės
 PI3K (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) – fosfatidilinozitolio 3-kinazė
 PVDF – polivinilidenfluoridas
 RasGAP (angl. *Ras GTPase activating protein*) – Ras GTPazę aktyvinantis baltymas
 S1F – sfingozino-1-fosfatas (angl. S1P – *sphingosine-1-phosphate*)
 S1P₁ – S1F receptorių
 SDF-1α (angl. *stromal-derived factor*) – stromos kilmės augimo veiksnys 1α
 SHH (angl. *sonic hedgehog*) – tam tikras morfogenas
 shRNR – trumposios segtuko formos RNR (angl. shRNA - *short hairpin RNA*)
 siRNR – mažosios interferencinės RNR (angl. siRNA – *small interfering RNA*)
 SMB (angl. *somatomedin B*) – į somatomediną B panašus domenas
 SN – standartinis nuokrypis
 SP – standartinė paklaida
 TEMED – tetrametiletildiaminas
 TGFβ (angl. *transforming growth factor*) – transformuojančio augimo veiksnio β šeima

TGF β RII – transformuojančio augimo veiksnio β receptorius II
TIE2 (angl. *tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2*) – tam tikra
receptorinė tirozino kinazė
TIMP3 (angl. *tissue inhibitor of metalloproteinases-3*) – užpildo
metalo proteinazių slopiklis 3
TNF α (angl. *tumor necrosis factor*) – naviko nekrozės veiksnys α
Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diolis
VEGF-A, VEGF – (angl. *vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių
endotelio augimo veiksnys A
VEGF-C – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys C
VEGFR1, VEGFR2 – kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptoriai 1 ir 2
VSMC (angl. *vascular smooth muscle cell*) – kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelė
WNT (angl. *wingless – integration 1*) – signalinių baltymų šeima
 α SMA (angl. *α smooth muscle actin*) – lygiųjų raumenų α aktinas

ĮVADAS

Kraujagyslėmis tekantis kraujas pasiekia visus organizmo audinius ir tiekia jiems maisto medžiagas ir deguonį bei pašalina iš jų anglies dioksidą ir medžiagų apykaitos produktus. Kraujagyslėmis pernešamos imuninės sistemos ląstelės ir hormonai, reguliuojama kūno temperatūra. Kraujagyslių biologijos tyrimai ieško atsakymų į klausimus, kaip kraujagyslės formuojasi, auga, bręsta, prisitaiko prie kintamų audinio poreikių ir tam tikrais atvejais sunyksta (regresuoja). Tirti šiuos procesus svarbu ne tik tam, kad daugiau sužinotume apie sveiko organizmo vystymąsi ir fiziologiją, bet ir todėl, kad kraujagyslių augimo, stabilumo ir regresijos sutrikimai siejami su daugeliu ligų – vėžiu, akių ligomis, išeminėmis ligomis ir kt. (apžvelgta Carmeliet, 2005; Cao, 2010; Carmeliet ir Jain, 2011a; Potente ir kt., 2011). Pavyzdžiui, kad navikas galėtų augti, jam būtinos maisto medžiagos ir deguonis. Naviko ląstelės sintezuoja ir išskiria veiksnius, kurie skatina kraujagysles augti gilyn į naviką ir taip užtikrina maisto medžiagų ir deguonies tiekimą (Folkman, 1971). Pastaruoju metu bandoma sukurti vaistus, kurie nuslopintų šį procesą ir taip sustabdytų naviko vystymąsi. Akių ligoms proliferacinei diabetinei retinopatijai, eksudacinio (neovaskulinio) tipo amžinei geltonosios dėmės degeneracijai (AGDD) ir neišnešiotų naujagimių retinopatijai būdingas patologinių kraujagyslių augimas akies dugne. Dėl didelio šių kraujagyslių laidumo patinsta tinklainė; be to, su jų augimu susijusi fibrozė gali išvis atplėšti tinklainę nuo akies dugno (Rajappa ir kt., 2010; Siemerink ir kt., 2010). Išsivysčiusiose pasaulio šalyse šios ligos yra vienos iš pagrindinių aklumo priežasčių (Resnikoff ir kt., 2004).

Paaikšėjus, kad patologinių kraujagyslių augimui ypač svarbus kraujagyslių endotelio augimo veiksnys VEGF-A (apžvelgta Nagy ir kt., 2007; Ferrara, 2009), prieš šį augimo veiksnį nukreiptais vaistais pradėta gydyti vėžį ir kiek vėliau eksudacinės formos AGDD. VEGF-A neutralizuojantys antikūnai sukėlė tikrą

AGDD gydymo perversmą (Stewart, 2012) ir taip pademonstravo, kad kraujagyslių augimo molekulinį mechanizmų tyrimų rezultatai gali būti panaudoti naujiems gydymo metodams kurti. Tačiau kraujagyslių vystymuisi svarbus ne tik VEGF-A. Navikų kraujagyslės dažnai atsparios prieš šį augimo veiksnį nukreiptiems vaistams, tačiau kodėl, neaišku (apžvelgta Carmeliet ir Jain, 2011a; Potente ir kt., 2011). Net ir AGDD atveju VEGF-A neutralizuojantys antikūnai daugumai pacientų padeda tik iš dalies (Brown ir kt., 2009; Monés, 2011). Taip pat kol kas nemokame sukelti stabilių, funkcionalių kraujagyslių augimo ischeminiuose audiniuose; vien VEGF-A tam nepakanka (Reginato ir kt., 2011). Taigi, apie kraujagyslių vystymąsi žinome dar ne viską.

Be kraujagyslių augimo, brandaus, funkcionalaus, audinio reikmes atitinkančio kraujagyslių tinklo palaikymui svarbus ir priešingas vyksmas – kraujagyslių regresija. Jei audiniui reikia daugiau deguonies ar maisto medžiagų, indukuojama angiogenezė (kraujagyslių augimas), ir priešingai, kai audinio poreikiai sumažėja, nebereikalingos kraujagyslės regresuoja. Nors angiogenezės molekuliniai mechanizmai neblogai ištirti, apie kraujagyslių regresiją žinoma kur kas mažiau. Be to, nors dauguma suaugusio organizmo kraujagyslių yra stabilios – neauga ir neregresuoja – mažai žinoma apie molekulinis mechanizmus, kurie lemia kraujagyslių stabilumą. Bendrasis šio darbo tikslas buvo geriau ištirti kraujagyslių regresijos ir stabilumo molekulinis mechanizmus. Manome, kad patologių kraujagyslių augimą lemia ne tik augimo veiksnių, tokių kaip VEGF-A, perteklius, bet ir regresijos ir / arba stabilumo veiksnių trūkumas. Geriau ištyrę kraujagyslių regresijos ir stabilumo molekulinis mechanizmus, galbūt išmoksime destabilizuoti nuo VEGF-A nepriklausomas patologines kraujagysles ir sukelti jų regresiją. Taip pat tikimės, kad kraujagyslių stabilumo molekulinis mechanizmų tyrimų rezultatai į priekį pastūmės ischeminių audinių kraujagyslių stabilizavimo pastangas.

Vienas iš kraujagysles stabilizuojančių vyksmų yra jų padengimas pericitais. Pericitai – tai mezenchimos kilmės ląstelės, aptinkamos kraujagyslių

sienelėse. Pericitais padengtos kraujagyslės yra stabilesnės – mažiau linkusios augti ir regresuoti, atsparesnės augimo veiksmų koncentracijų pokyčiams, tvarkingesnės struktūros, mažiau laidžios (žiūr. sk. 1.1.5.3). Kaip pericitai stabilizuoja kraujagysles, nevisiškai aišku. Norėdami daugiau sužinoti apie kraujagyslių stabilumo molekulinis mechanizmus, **pirmojoje darbo dalyje** išskėlėme sau tikslą išsiaiškinti, koks kraujagyslių stabilizavimo pericitais molekulinis mechanizmas. Išskėlėme tokius uždavinius:

1. Išvystyti paprastą kraujagyslių stabilizavimo pericitais *in vitro* modelį;
2. Naudojantis šia modeline sistema, ištirti kraujagyslių stabilizavimo pericitais molekulinį mechanizmą.

Antrojoje darbo dalyje sutelkėme dėmesį į kraujagyslių regresiją: tęsėme anksčiau mūsų laboratorijoje identifikuoto kraujagyslių regresijos / destabilizavimo veiksnio autotaksino (ATX) tyrimus. Anksčiau buvome parodę, kad ATX ir jo katalizuojamos reakcijos produktas lizofosfatido rūgštis (LFR) yra būtini ir pakankami kraujagysles primenančių vamzdelių regresijai *in vitro* kraujagyslių formavimosi ir regresijos modelyje (Im ir kt., 2010). Taip pat žinojome, kad transgeninių pelių, kurių ATX raiška didesnė, kraujagyslės regresuoja greičiau (Im ir kt., 2010). Taigi, ATX pakako regresijai sukelti, tačiau vis dar nežinojome, ar ATX kraujagyslių regresijai *in vivo* yra būtinas. Norėdami geriau ištirti ATX reikšmę kraujagyslių regresijai *in vivo*, išskėlėme sau tikslą įvertinti pelės ATX koduojančio geno (*Enpp2*) išveiklinimo įtaką kraujagyslių regresijai. Išskėlėme tokius uždavinius:

1. Išveiklinti *Enpp2* pelės endotelio ląstelėse (endotelio ląstelės - tai pagrindinės kraujagyslių sienelių ląstelės);
2. Įvertinti endotelio ląstelių *Enpp2* išveiklinimo įtaką akies stiklakūnio kraujagyslių regresijai.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Nors yra žinoma, kad pericitai stabilizuoja kraujagysles, šio reiškinio molekuliniai mechanizmai prastai ištirti. Šiame darbe nustatėme naują kraujagyslių stabilizavimo pericitais molekulinį mechanizmą. Parodėme, kad kraujagysles primenančių vamzdelių iš endotelio ląstelių padengimas pericitais *in vitro* paskatina regresijos veiksnio lizofosfatido rūgšties (LFR) metabolizmą. Sumažėjusi LFR koncentracija lemia vamzdelių stabilumą (t.y., jų neregresavimą). Kaip modelinės kraujagyslės iš endotelio ląstelių ir pericitų sumažina LFR koncentraciją savo aplinkoje, iki galo neištyrėme, tačiau parodėme, kad mūsų modelyje LFR koncentraciją bent iš dalies valdo fermentai, savo savybėmis panašūs į fosfolipidų fosfatazes LPP. Mūsų laboratorijoje pirmą kartą parodyta, kad LFR ir jos sintezę katalizuojantis fermentas autotaksinas yra kraujagyslių regresijos / destabilizavimo veiksniai, o šiame darbe praplėtėme mūsų žinias apie kraujagyslių stabilumo molekulinis mechanizmus, parodydami, kad bent jau *in vitro* pericitai geba šiuos regresijos veiksnius neutralizuoti.

Verta paminėti, kad šis darbas suteikė naujos informacijos apie kraujagysles sudarančių ląstelių LFR metabolizmą. Nors buvo iškelta hipotezė, kad endotelio ląstelės skaido už ląstelių ribų (pvz., kraujyje) aptinkamą LFR (Morris ir kt., 2009), endotelio ląstelių gebėjimas metabolizuoti už ląstelių ribų aptinkamą LFR iki šiol nebuvo pademonstruotas.

Šiame darbe taip pat išvedėme ir apibūdinome peles, kurių endotelio ląstelių *Enpp2* genas buvo išveiklintas. Parodėme, kad šios pelės yra sveikos ir vaisingos, ir kad jų akių kraujagyslės formuojasi ir regresuoja normaliai. Nors mūsų hipotezė, kad endotelio ląstelių išskiriamas ATX svarbus fiziologinei kraujagyslių regresijai, nepasitvirtino, šias peles bus galima panaudoti endotelio ATX reikšmei kitoms kraujagyslių funkcijoms ir su kraujagyslėmis susijusiems vyksmams tirti (pvz., laidumui, kraujo krešėjimui, limfocitų migracijai į audinius).

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 KRAUJAGYSLIŲ FORMAVIMASIS, REGRESIJA IR STABILUMAS

1.1.1 Kraujagyslių tipų ir struktūros apžvalga. Endotelio ląstelės

Kraujagyslės skirstomos į arterijas, kapiliarus ir venas. Smulkios arterijos dar vadinamos arteriolėmis, o venos – venulėmis. Arterijomis ir arteriolėmis kraujas teka iš širdies į audinius, o venomis ir venulėmis – atgal į širdį. Kapiliarai – tai pačios smulkiausios kraujagyslės. Jie jungia arterijas ir venas. Per kapiliarų sienelės vyksta molekulių mainai su audinio ląstelėmis.

Visų kraujagyslių sienelės vidinį sluoksnį sudaro glaudžiai susijungusios endotelio ląstelės (Alberts ir kt., 2008). Tai mezodermos kilmės ląstelės, skirstomos į du tipus: limfos endotelio ląsteles, išklojančias limfagysles, ir kraujo endotelio ląsteles, išklojančias kraujagysles (Alberts ir kt., 2008). Sveikos, subrendusios, ramybės būsenos kraujagyslės endotelis (endotelio ląstelių monosluoksnis) pasižymi lygiu paviršiumi ir tvarkinga struktūra – endotelio ląstelės išsidėsto lygiagrečiai kraujo tėkmės kryptims, tankiai, bet nepersiklodamos, tarsi pėstininkų dalinys (Mazzone ir kt., 2009). Sveikas endotelis greitai reaguoja į signalus iš kraujo, aplinkinių audinių ir atitinkamai valdo kraujagyslės skersmenį, laidumą, leukocitų prisitvirtinimą ir migraciją į audinius, kraujo krešėjimą ir kitas kraujagyslės funkcijas (apžvelgta Pearson, 2000). Endotelio struktūrai ir barjerinei funkcijai ypač svarbios jungtys tarp endotelio ląstelių. Glaudžiosios jungtys reguliuoja molekulių pernašą ląstelių tarpuose; jų ypač daug smegenų kraujagyslėse, pasižyminčiose ypač mažu laidumu (tai vadinamasis kraujo – smegenų barjeras). Sąlyčio (angl. *adherens*) jungtys taip pat gali reguliuoti kraujagyslių laidumą, bet jų pagrindinės funkcijos yra ląstelių sąlytis, ląstelės griaučių organizacija ir išorinių signalų perdavimas į ląstelės vidų (apžvelgta Dejana ir kt., 2009). Kai kurių specializuotų audinių (pvz.,

inkstų glomerulių) kraujagyslių endotelis turi daug 60 – 80 nm skersmens porų (angl. *fenestrae*) ir yra ypač laidus (Alberts ir kt., 2008).

Iš išorės endotelį dengia pamatinė lamina (angl. *basal lamina*) sluoksnis. Jo komponentus (glikoproteinus: kolageną IV, lamininus, nidogenus ir kt., bei proteoglikanus: perlekaną ir kt. (apžvelgta Paulsson, 1992)) gamina endotelio ląstelės ir dar vienas kraujagyslių sienelėse aptinkamas ląstelių tipas – pericitai (Mandarino ir kt., 1993; Stratman ir kt., 2009). Kapiliarų sienelės sudaro viso labo endotelis, pamatinė lamina ir pavieniai pericitai arba pericitų sluoksnis (žiūr. 1.4 pav.). Stambesnių kraujagyslių sienelės storesnės ir sudėtingesnės struktūros; pvz., arterijų sienelėse daug jungiamojo audinio, aptinkama fibroblastų, o pericitus pakeičia giminingos kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelės (VSMC, angl. *vascular smooth muscle cell*), išsidėsčiusios koncentriškais sluoksniais (Alberts ir kt., 2008).

1.1.2 Kraujagyslių formavimosi, stabilizavimo ir regresijos apžvalga

Kraujagyslės formuojasi ir sparčiausiai auga embriono vystymosi metu. Suaugusio organizmo kraujagyslės yra ramybės būsenos ir auga / regresuoja tik tam tikrais atvejais: pvz., gyjant žaizdoms, menstruacinio ciklo, nėštumo metu ir sergant tam tikromis ligomis. Pirmosios embriono kraujagyslės formuojasi vaskulogenezės būdu, mezodermos kilmės endotelio ląstelių pirmtakams (angioblastams) susiliejančioms į primitivų vamzdelių tinklą (apžvelgta Patel-Hett ir D'Amore, 2011). Pradinis kraujagyslių tinklas plečiasi naujoms kraujagyslėms išaugant iš jau egzistuojančių kraujagyslių. Šis procesas vadinamas angiogeneze (apžvelgta Carmeliet ir Jain, 2011a). Skiriama keletas angiogenezės tipų: pvz., nauja kraujagyslė gali išaugti iš senosios lyg ūglys (angl. *sprouting angiogenesis*, žiūr. 1.1 pav.) arba sena kraujagyslė gali skilti lygiagrečiai į dvi naujas kraujagysles (angl. *intussusception*, apžvelgta Makanya ir kt., 2009). Vėlesnėse embriono vystymosi stadijose ir po gimimo kraujagyslės daugiausia formuojasi

angiogenezės būdu (Swift ir Weinstein, 2009), nors pastaruoju metu aktyviai diskutuojama, ar neprisideda ir vaskulogenezė (kraujyje cirkuliuojančios kamieninės ląstelės), ypač patologinio kraujagyslių formavimosi atveju (Li Calzi ir kt., 2010; Fang ir Salven, 2011).

Naujai susiformavusios kraujagyslės bręsta ir specializuojasi. Kraujagyslių diferenciacija į arterijas ir venas prasideda labai anksti, dar netekant kraujui (apžvelgta Swift ir Weinstein, 2009). Prasidėjusi kraujo tėkmė keičia endotelio ląstelių formą, stiprina jungtis tarp ląstelių, slopina apoptozę ir kraujo krešėjimą skatinančių molekulių raišką (apžvelgta Ando ir Yamamoto, 2011). Prie kraujagyslių brendimo reikšmingai prisideda pericitai. Jie padengia naujai susiformavusius kapiliarus ir smulkias kraujagysles ir ne tik padeda formuoti pamatinę laminą, bet ir valdo daugelį endotelio ląstelių funkcijų (apžvelgta Díaz-Flores ir kt., 2009). Pericitais padengtos kraujagyslės laikomos subrendusiomis.

Ne(be)reikalingos arba pažeistos kraujagyslės gali sunykti (regresuoti). Pvz., pelės akies tinklainėje susiformavusiam pradiniam kraujagyslių tinklui bręstant ir diferencijuojantis į arterijas, venas ir kapiliarus, perteklinės kraujagyslių atšakos regresuoja (Wacker ir Gerhardt, 2011). Kraujagyslių regresija gali įvykti ir suaugusiame organizme: gyjant žaizdai susiformavusios papildomos kraujagyslės sunyksta, pasibaigus uždegimui (Wietecha ir kt., 2011). Taigi, kraujagyslių tinklas aktyviai taikosi prie organizmo poreikių.

1.1.3 Kraujagyslių formavimosi molekuliniai mechanizmai

1.1.3.1 Vaskulogenezės molekuliniai mechanizmai

Vaskulogenezės metu pluripotencinės mezodermos kilmės ląstelės diferencijuojasi į angioblastus, o šie – į endotelio ląsteles, kurios migruoja ir jungiasi į primityvų kraujagyslių tinklą (apžvelgta Patel-Hett ir D'Amore, 2011). Šiems vyksmams būtinas kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (VEGF-A, angl. *vascular endothelial growth factor*) ir jo receptoriai VEGFR1 ir VEGFR2. VEGFR2 neturinčiose pelėse sutrinka ląstelių pirmtakių diferenciacija į endotelio

ląsteles, pirminės kraujagyslės nesiformuoja, ir tokie embrionai gaišta 8,5-9,5 vystymosi dieną (Shalaby ir kt., 1995). Manoma, kad be šio receptoriaus ląstelės pirmtakės negali migruoti į diferenciacijos vietą („kraujo salas“, angl. *blood islands*) (Shalaby ir kt., 1997). Pelėse su išveiklintu vienu *Vegfa* geno aleliu endotelio ląstelių diferenciacija sulėtėjusi, primityvios kraujagyslės formuojasi netvarkingai, ir tokios pelės irgi gaišta embriono vystymosi metu (Carmeliet ir kt., 1996). VEGFR1 neturinčios pelės taip pat gaišta 8,5 embriono vystymosi dieną (Fong ir kt., 1995), tačiau geno išveiklinimo sukeltas fenotipas kitoks nei *Vegfr2*^{-/-} – pirminių kraujagyslių organizacija netvarkinga, nulemta *per didelio* angioblastų skaičiaus (Fong ir kt., 1999). Dėl to manoma, kad VEGFR1 yra neigiamas VEGF-A signalo perdavimo reguliatorius, bent jau ankstyvosios embriogenezės metu (Ribatti ir kt., 2009).

Neuropiliniai (NRP1 ir NRP2) yra membraniniai receptoriai, kurių ligandai – VEGF šeimos augimo veiksniai (koreceptoriai – VEGFR1 ir VEGFR2) ir semaforinai (koreceptoriai – pleksinai). Pelių, kurių abu neuropilinių genai išveiklinti, embrionai gaišta 8,5 vystymosi dieną ir išvis neturi organizuotų kraujagyslių (Takashima ir kt., 2002). Manoma, kad vaskulogenezei svarbus neuropilinių jungimasis su VEGF-A, o ne su semaforiniais (Carmeliet ir Jain, 2011a).

Vaskulogenezei svarbūs ir kai kurie transformuojančio augimo veiksnio (TGFβ, angl. *transforming growth factor*) šeimos augimo veiksniai ir jų receptoriai. Pelių su išveiklintu *Tgfb1* genu būna sutrikusi trynio maišelio vaskulogenezė (greičiausiai dėl sutrikusios endotelio ląstelių diferenciacijos), ir maždaug pusė embrionų gaišta 10,5 vystymosi dieną (Dickson ir kt., 1995). Beveik toks pat ir vieno iš TGFβ šeimos augimo veiksnių receptorių, TGFβRII, geno išveiklinimo fenotipas (Oshima ir kt., 1996).

Iš kitų su vaskulogeneze siejamų veiksnių minėtinas fibroblastų augimo veiksnys FGF2 (angl. *fibroblast growth factor*, skatina angioblastų diferenciaciją putpelės embrione (Cox ir Poole, 2000)) ir „*hedgehog*“ šeimos morfogenas IHH

(angl. *indian hedgehog*, svarbus ankstyvajai endotelio ir hematopoetinių ląstelių pirmtakų diferenciacijai (Dyer ir kt., 2001; Byrd ir kt., 2002)). Kraujagyslių formavimuisi svarbi endotelio ląstelių migracija, kuriai savo ruožtu svarbios ląstelių sąveikos su tarpląstelinio užpildo baltymais. Todėl nenuostabu, kad tam tikrų tarpląstelinio užpildo baltymų (pvz., fibronektino) arba jų receptorių (pvz., integrinų) mutacijos irgi sutrikdo vaskulogenezę (Ribatti ir kt., 2009).

1.1.3.2 Angiogenezės molekuliniai mechanizmai

„Ūglinės“ angiogenezės molekuliniai mechanizmai šiuo metu geriausiai ištirti, todėl daugiausia dėmesio skirsime šiam procesui.

Naujos atšakos augimą iš egzistuojančios kraujagyslės inicijuoja vadinamieji angiogeniniai veiksniai, iš kurių bene žinomiausias yra minėtasis VEGF-A. VEGF jungiasi prie savo receptoriaus VEGFR2 ir dalyje senosios kraujagyslės ląstelių paleidžia „smaigalio ląstelės“ (angl. *tip cell*) programą (Ruhrberg ir kt., 2002; Gerhardt ir kt., 2003). Jei naujoji atšaka auga iš subrendusios kraujagyslės, jos augimui trukdo kraujagyslės bazinė lamina ir pericitai, neleidžiantys endotelio ląstelėms migruoti (Potente ir kt., 2011). Smaigalio ląstelėms būdinga didelė užpildo metaloproteinazių (MMP) (Yana ir kt., 2007) ir kitų peptidazių (del Toro ir kt., 2010) raiška. Manoma, kad šios peptidazės suardo bazinę lamina, ir taip smaigalio ląstelė praskina kelią naujai kraujagyslei (Yana ir kt., 2007; del Toro ir kt., 2010; Potente ir kt., 2011). Smaigalio ląstelės taip pat gamina angiopoetiną-2 (ANG-2) (Strasser ir kt., 2010; del Toro ir kt., 2010). Manoma, kad šis sekretuojamas baltymas paskatina pericitų atšoką (Potente ir kt., 2011).

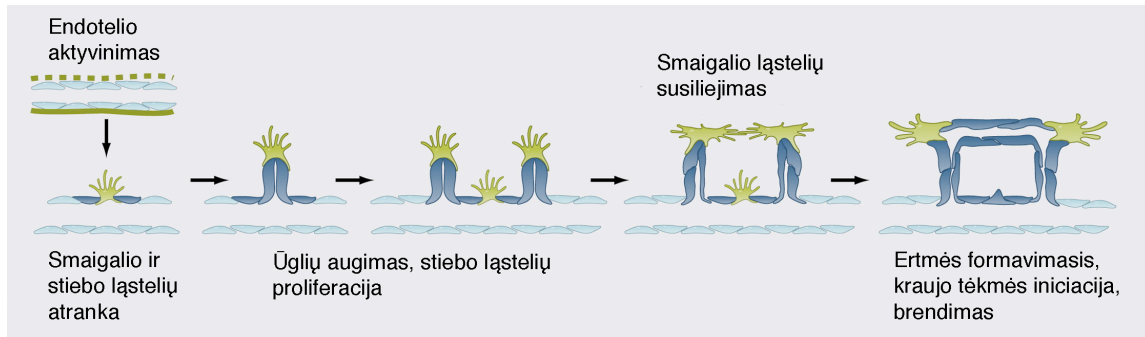
Smaigalio ląstelei iš paskos seka „stiebo ląstelės“ (angl. *stalk cells*) (1.1 pav.). Stiebo ląstelės, kitaip nei smaigalio ląstelės, dalijasi (Ausprunk ir Folkman, 1977; Gerhardt ir kt., 2003) ir taip ilgina naująją kraujagyslės atšaką, o smaigalio ląstelė filopodijomis tiria aplinką ir kreipia kraujagyslę angiogeninio veiksnio gradiento kryptimi (Ruhrberg ir kt., 2002; Gerhardt ir kt., 2003). Stiebo ląstelės suformuoja kraujagyslės ertmę (apžvelgta Geudens ir Gerhardt, 2011). Naujoji

kraujagyslė gali susilieti su kitomis kraujagyslėmis. Sąliejos (anastomozės) molekuliniai mechanizmai kol kas neaiškūs, tačiau atrodo, kad endotelio ląstelėms susilieti gali padėti makrofagai (apžvelgta Geudens ir Gerhardt, 2011).

Neseniai nustatyta, kas lemia, kurios senosios kraujagyslės endotelio ląstelės taps smaigalio, o kurios – stiebo ląstelėmis. Pradinis signalas ląstelei tapti smaigalio ląstele yra VEGF-A jungimasis prie savo receptoriaus VEGFR2. VEGFR2 perduoda signalą į ląstelės vidų, ir galiausiai aktyvinama smaigalio ląstelei būdinga genų raiška (Ruhrberg ir kt., 2002; Gerhardt ir kt., 2003). VEGF gali jungtis prie kito receptoriaus, VEGFR1, kurio, kitaip nei VEGFR2, tirozino kinazės aktyvumas silpnas, todėl šis receptorius nesukelia būdingo atsako į VEGF. Dėl šios priežasties ir dėl to, kad VEGF stipriau jungiasi prie VEGFR1, šis receptorius dažnai laikomas VEGF „spąstais“ (apžvelgta Olsson ir kt., 2006). Kitaip tariant, esant ribotai VEGF koncentracijai, didelė VEGFR1 raiška trukdo VEGF jungtis prie VEGFR2 ir slopina angiogeninį atsaką. Parodyta, kad smaigalio ląstelėmis tampa endotelio ląstelės, kurių, palyginus su kaimynėmis, VEGFR2 raiška didesnė ir / arba VEGFR1 raiška mažesnė, ir todėl VEGF sukeltas angiogeninis atsakas stipresnis (Jakobsson ir kt., 2010). Tokie raiškos skirtumai tarp ląstelių greičiausiai yra stochastiniai (tikimybiniai) (Geudens ir Gerhardt, 2011).

Vienas iš atsako į VEGF komponentų yra padidėjusi membraninės signalinės molekulės DLL4 (angl. *delta-like ligand 4*) raiška (Lobov ir kt., 2007). DLL4 jungiasi su NOTCH1 ligandu kaimyninės ląstelės membranoje ir pradeda signalo perdavimo kaskadą, kuri slopina VEGFR2 raišką ir skatina VEGFR1 raišką, taip neleisdama gretimai ląstelei irgi tapti smaigalio ląstele ir vietoj to indukuodama stiebo ląstelės fenotipą (Hellström ir kt., 2007; Siekmann ir Lawson, 2007; Suchting ir kt., 2007). DLL4 – NOTCH1 signalinio kelio slopinimas padidina smaigalio ląstelių skaičių, sumažina stiebo ląstelių skaičių ir lemia ypač tankaus kraujagyslių tinklo formavimą (Hellström ir kt., 2007; Siekmann ir Lawson, 2007; Suchting ir kt., 2007). Tiesa, šiems eksperimentiniams duomenims

paiškinti neseniai pasiūlytas ir kitoks, nuo VEGF / VEGFR2 nepriklausomas modelis (Benedito ir kt., 2012).



1.1 pav. „Ūglinės“ angienezės eiga. (Potente ir kt., 2011).

Be VEGF-A, aprašyta ir kitų angiogeninių veiksnių. Tai VEGF šeimos nariai VEGF-C ir PlGF (angl. *placental growth factor*), FGF šeimos nariai (jau minėtas FGF-2, o taip pat FGF-1), TGF β šeimos nariai, chemokinai (pvz., SDF-1 α , angl. *stromal-derived factor*) ir kt. (Carmeliet ir Jain, 2011a). Kraujagyslių stabilumą reguliuojantys veiksniai tokie kaip ANG-2 (žiūr. 1.1.5.3 sk.) kartais irgi priskiriami angiogeniniams veiksniams, nors patys savaime angienezės nesukelia.

Pirminis signalas angiogenezei prasidėti paprastai būna hipoksija (maža deguonies koncentracija), maisto medžiagų trūkumas arba uždegimas. Pavyzdžiui, VEGF-A raiška priklauso nuo deguonies koncentracijos audinyje, ir šią priklausomybę lemia HIF transkripcijos veiksniai (angl. *hypoxia-inducible factor*) (apžvelgta Fong, 2009). HIF-1, 2 ir 3 – tai homologiški dimeriniai baltymai, sudaryti iš dviejų subvienetų – α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) ir β (bendras visiems HIF) (Fraisl ir kt., 2009). α subvieneto stabilumą valdo prolinio hidroksilazės (PHD). Šių hidroksilazių substratas – deguonis. Kai deguonies koncentracija didelė, hidroksilazės hidroksilina dvi prolinio aminorūgšties liekanas α polipeptido grandinėje. Hidroksilintas α subvienetas degraduojamas. Kai deguonies koncentracija maža, PHD būna neveiklios, todėl gali susidaryti aktyvus HIF

dimeras iš α ir β subvienetų. Dimeras jungiasi prie *Vegfa* geno promotoriaus ir indukuoja geno raišką (Fong, 2009; Fraisl ir kt., 2009).

Raumenyse hipoksija ir maisto medžiagų trūkumas gali sukelti nepriklausomą nuo HIF angiogenezę per transkripcijos aktyvatorių PGC-1 α (Arany ir kt., 2008). PGC-1 α ekspresuojamas audiniuose, kuriems būdinga intensyvi oksidacija (širdies, lėto susitraukimo skeleto raumenyse ir ruduosiuose riebaluose), ir skatina energijos gamybą, intensyvindamas riebalų rūgščių oksidaciją, oksidacinį fosforilinimą ir mitochondrijų komponentų sintezę (apžvelgta Finck ir Kelly, 2006). Kitos metabolizmą reguliuojančios molekulės (AMPK, PPAR β , leptinas) taip pat gali sukelti naujų kraujagyslių augimą (Fraisl ir kt., 2009). Taigi, angiogeninių veiksnių raiška susieta su audinio metaboliniais poreikiais.

Angiogenezę susijusi ir su uždegimu. Abu šiuos vyksmus stimuliuoja hipoksija (Costa ir kt., 2007). Tam tikri uždegimo veiksniai (TNF α , NF- κ B, bradikininas ir kt.) gali sukelti ir kraujagyslių augimą (Arroyo ir Iruela-Arispe, 2010). Be to, įvairios imuninės sistemos ląstelės (M2 tipo makrofagai, neutrofilai, putliosios ląstelės ir kt.) skatina angiogenezę (Costa ir kt., 2007; Potente ir kt., 2011). Ryšys tarp angiogenezės ir uždegimo nestebina – naujos kraujagyslės padeda palaikyti uždegimo vyksmus, pristatydamos į audinį daugiau uždegimui svarbių kraujo ląstelių ir tiekdamos šioms ląstelėms deguonį ir maisto medžiagas.

1.1.4 Kraujagyslių regresijos molekuliniai mechanizmai

Kraujagyslių tinklas geba prisitaikyti prie kintamų audinio poreikių. Jei audiniui reikia daugiau deguonies ar maisto medžiagų, indukuojama angiogenežė, ir priešingai, nebereikalingos kraujagyslės sunyksta. Kraujagyslių regresija iširta prasčiau nei formavimasis iš dalies todėl, kad ilgą laiką manyta, kad regresija – tai tiesiog endotelio ląstelių žūtis, netekus augimo veiksnių. Tačiau atrandama vis daugiau įrodymų, kad tai programinis, valdomas procesas (Im ir Kazlauskas, 2006a).

Kraujagyslių regresija daugelyje audinių vyksta maždaug tokia tvarka: kraujagyslė susiaurėja ir ja nustoja tekėti kraujas; endotelio ląstelės susitraukia ir žūva apoptozės būdu (lieka tuščios pamatinės laminos „rankovės“ be endotelio ląstelių); fagocitai fagocituoja ląstelių liekanas ir galiausiai pamatinės laminos „rankovės“ (Ausprunk ir kt., 1978; Baluk ir kt., 2004).

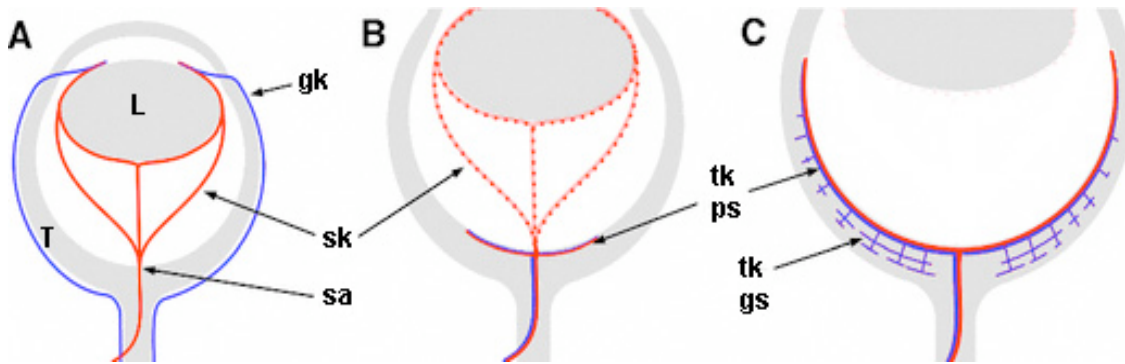
Kraujagyslių regresijos molekulinis mechanizmas verta aptarti pradedant akies stiklakūnio kraujagyslių ir akies tinklainės kraujagyslių regresijos apžvalga, nes prie šių dviejų kraujagyslių tinklų dar ne kartą sugrįšime.

1.1.4.1 Stiklakūnio ir tinklainės kraujagyslių regresijos apžvalga. Deguoninė retinopatija

Žmogaus vaisiaus tinklainės kraujagyslių augimas prasideda maždaug 16-ą embriono vystymosi savaitę (Stahl ir kt., 2010). Iki tol, o taip pat ir ankstyvosiose tinklainės kraujagyslių vystymosi stadijose, besivystančio embriono akies audinius iš dalies maitina stiklakūnio kraujagyslės (angl. *hyaloid vessels*). Formuojantis tinklainės kraujagyslėms stiklakūnio kraujagyslės ilgainiui tampa nebereikalingos ir regresuoja (apžvelgta Saint-Geniez ir D'Amore, 2004). Regresija baigiasi maždaug 34-ą vystymosi savaitę, o tinklainės kraujagyslių augimas – maždaug 40-ą (Stahl ir kt., 2010). Taigi, išnešioti kūdikiai gimsta su visiškai išsivysčiusiomis tinklainės kraujagyslėmis ir nebeturi stiklakūnio kraujagyslių. Kartais stiklakūnio kraujagyslės taip ir neregresuoja. Ši neretai aklumą sukianti patologija vadinama pirminio stiklakūnio hiperplazija (angl. *hyperplastic primary vitreous*) (apžvelgta Shastri, 2009).

Kitaip nei žmogaus, pelės tinklainės kraujagyslių augimas ir stiklakūnio kraujagyslių regresija prasideda pirmą dieną po gimimo ir trunka 2 – 3 savaites (Ito ir Yoshioka, 1999; Stahl ir kt., 2010). Tinklainės kraujagyslės pradeda augti lygiagrečiai tinklainės paviršiui iš tinklainės centro (regos nervo galvutės) link jos kraštų (1.2 pav). Per maždaug 8 dienas kraujagyslių tinklas pasiekia tinklainės kraštus, ir naujos kraujagyslių atšakos pradeda augti gilyn į tinklainę. Iš šių atšakų per maždaug dvi savaites suformuojami dar du tinklainės paviršiui lygiagretūs

kraujagyslių sluoksniai (1.2 pav) (apžvelgta Fruttiger, 2007; Stahl ir kt., 2010). Kol formuojasi gilieji tinklainės kraujagyslių sluoksniai, paviršinis sluoksnis bręsta ir persitvarko – dalis kraujagyslių regresuoja, o likusios diferencijuoja į arterijas, venas ir kapiliarus.



1.2 pav. Pelės akies stiklakūnio kraujagyslių regresija ir tinklainės kraujagyslių augimas.

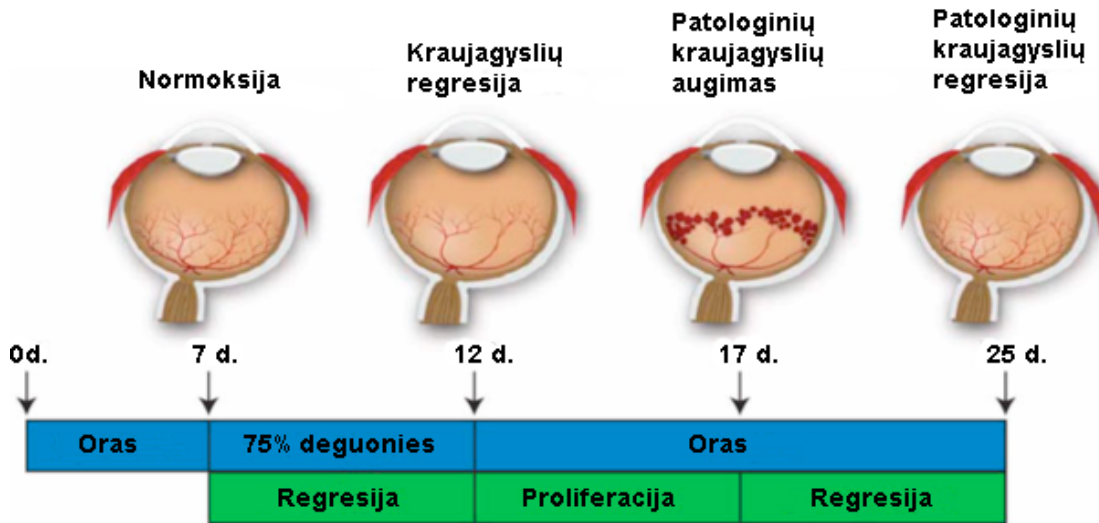
A. Pirmąją gyvenimo dieną tinklainėje kraujagyslių dar nėra. Akies audinius maitina stiklakūnio kraujagyslės. B. Tarp antrosios ir aštuntosios dienos auga paviršinis tinklainės kraujagyslių sluoksnis. Prasideda stiklakūnio kraujagyslių regresija. C. Suaugusios pelės tinklainės kraujagyslės išsidėsto trimis sluoksniais. Stiklakūnio kraujagyslių nebėra. L – lęšiukas. T – tinklainė. gk – gylainės kraujagyslės (B ir C jos nepavaizduotos). sk – stiklakūnio kraujagyslės. sa – stiklakūnio arterija. tk – tinklainės kraujagyslės; ps – paviršinis jų sluoksnis, gs – gilieji jų sluoksniai. (Fruttiger, 2007).

Tiriant regresijos molekulinis mechanizmus *in vivo*, gana dažnai pasirenkama fiziologinė pelės stiklakūnio kraujagyslių regresija arba paviršinio tinklainės kraujagyslių sluoksnio brendimas (dalinė regresija). Taip pat populiarus patologinės angiogenezės ir regresijos modelis – naujagimių peliukų veikimas 75% deguonimi. Tai neišnešiotų žmogaus naujagimių akių patologijos (retinopatijos) modelis (Smith ir kt., 1994), dar vadinamas deguoninės retinopatijos modeliu (angl. *oxygen-induced retinopathy*). Neišnešiotų žmogaus naujagimių tinklainės kraujagyslės ne iki galo išsivysčiusios ir todėl labai jautrios deguonies koncentracijos pokyčiams. Po gimimo pradėjus kvėpuoti, deguonies koncentracija naujagimio kraujyje padidėja. Ji dar labiau padidėja, jei vaikas auginamas inkubatoriuje su didesne nei oro deguonies koncentracija. Deguonies

koncentracijos šuolis sukelia tinklainės kapiliarų regresiją. Didėjant tinklainės metaboliniam aktyvumui ir poreikiams, netrukus prasideda kompensacinis naujų kraujagyslių augimas, tačiau jis nėra normalus. Naujosios kraujagyslės išsikiša iš tinklainės plokštumos į stiklakūnį ir yra netvarkingos struktūros. Apie jas formuojasi randas, kuris gali atplėšti tinklainę nuo akies dugno. Nors daugelis kūdikių pasveiksta, neišnešiotų naujagimių retinopatija (NNR) yra pagrindinė vaikų aklumo priežastis (Chen ir Smith, 2007; Aclimandos, 2011; Casteels ir kt., 2012).

Kaip jau minėta, pelės tinklainės kraujagyslės vystosi vėliau nei žmogaus, iškart po gimimo, ir todėl žmogaus NNR galima imituoti 7 dienų amžiaus peliukus patalpinus į inkubatorių, kuriame palaikoma 75% deguonies koncentracija (Smith ir kt., 1994). Tokiomis sąlygomis prasideda sparti naujų tinklainės kraujagyslių regresija (Smith ir kt., 1994) (1.3 pav.). Per maždaug 36 val. kapiliarai sunyksta maždaug 40% tinklainės ploto, ir po to procesas stabilizuojasi (Lange ir kt., 2009). Pagrindinės arterijos ir venos neregresuoja. Po 5 dienų, praleistų 75% deguonies aplinkoje, grąžinus peliukus atgal į įprastą orą, prasideda spartus naujų tinklainės kraujagyslių augimas. Dalis šių kraujagyslių yra patologinės ir primena netvarkingas naujagimių retinopatijos kraujagyslines struktūras. Ilgainiui jos regresuoja ir yra pakeičiamos normaliomis kraujagyslėmis (Smith ir kt., 1994) (1.3 pav.). Taigi, deguoninės retinopatijos modelis leidžia tirti tiek sveikų kraujagyslių regresiją (paveikus jas didele deguonies koncentracija), tiek ir pataloginių kraujagyslių regresiją.

Kas sukelia kraujagyslių regresiją? Galima išskirti dvi priežasčių grupes: 1) augimo ir / arba stabilizavimo signalų trūkumas (augimo veiksnių trūkumas, kraujo tėkmės susilpnėjimas ir pan.); 2) aktyvūs regresijos signalai (makrofagu indukuota regresija, regresijos / antiangiogeniniai veiksniai).



1.3 pav. Pelių deguoninės retinopatijos modelis. (Connor ir kt., 2009).

1.1.4.2 Regresija, sukelta augimo ir / arba stabilizavimo signalų trūkumo

Jaunos ir aktyviai augančios kraujagyslės yra priklausomos nuo augimo veiksnių ir regresuoja jų netekusios. Pavyzdžiui, į pelės rageną implantavus polimero tabletę su angiogeniniu veiksmu (pvz., VEGF-A arba FGF-2), link tabletės pagal augimo veiksnio gradientą pradeda augti kraujagyslės (apžvelgta Ziche ir Morbidelli, 2009). Pašalinus tabletę, jos regresuoja (Ausprunk ir kt., 1978). Panašiai nesubrendusios naviko kraujagyslės regresuoja, sumažinus VEGF raišką (Benjamin ir kt., 1999).

Kitas tokios regresijos pavyzdys – minėtoji naujagimės pelės tinklainės kraujagyslių regresija 75% deguonies aplinkoje. Tinklainės kraujagyslių augimą indukuoja astrocitų gaminamas VEGF-A, o signalas VEGF-A gamybai yra padidėję besivystančios tinklainės metaboliniai poreikiai (Stone ir kt., 1995). Parodyta, kad kapiliarų regresija 75% deguonies aplinkoje šiame modelyje koreliuoja su VEGF-A raiškos sumažėjimu – poveikis deguonimi sumažina VEGF mRNR raišką tinklainėje, ir mažiausi šios mRNR kiekiai aptinkami būtent tuose regionuose, kuriuose regresuoja kapiliarai (Claxton ir Fruttiger, 2003). Kaip jau minėta, VEGF raiškos priklausomybę nuo deguonies koncentracijos lemia

deguoniui jautrios prolino hidroksilazės (PHD). Parodyta, kad PHD slopinimas (Sears ir kt., 2008) arba *Phd1* išveiklinimas (Huang ir kt., 2011) nuslopina deguonies indukuotą peliukų tinklainės kapiliarų regresiją. VEGF injekcija į akį prieš pat poveikį deguonimi taip pat pristabdė regresiją (Pierce ir kt., 1996; Lobov ir kt., 2011). Taigi, tinklainės kapiliarų regresiją deguoninės retinopatijos modelyje bent iš dalies lemia VEGF trūkumas.

Rasta ir kitų šiam procesui svarbių augimo veiksnių. Pvz., eritropoetino (EPO) raišką taip pat valdo deguonis / PHD / HIF, ir ji sumažėja, paveikus peliukus deguonimi (Chen ir kt., 2008). Dvi EPO injekcijos prieš pat poveikį deguonimi prislopino kapiliarų regresiją (Chen ir kt., 2008). EPO vaidmuo šiame modelyje, ko gero, nepriklauso nuo VEGF (Matafsi ir kt., 2011). Prie regresijos greičiausiai prisideda ir IGF-1 (angl. *insulin-like growth factor*) trūkumas (Chen ir Smith, 2007). Šio augimo veiksnio daugeliui neišnešiotų naujagimių trūksta, ir parodyta, kad IGF-1 koncentracija naujagimių kraujo serume atvirkščiai koreliuoja su NNR rizika (Hellström ir kt., 2003). IGF-1 greičiausiai veikia per VEGF (yra svarbus VEGF signalo perdavimui) (Chen ir Smith, 2007).

Endotelio disfunkciją ir kapiliarų regresiją gali sukelti susilpnėjusi kraujo tėkmė (Meeson ir kt., 1996; Lobov ir kt., 2011; Potente ir kt., 2011), tačiau kodėl, kol kas neaišku. Galima manyti, kad taip atsitinka todėl, kad endotelio ląstelės nebeauga serumo augimo veiksnių (Meeson ir kt., 1996), tačiau manoma, kad kraujagyslių stabilumui svarbios ir dėl skysčio tėkmės atsirandančios fizikinės jėgos, pvz., šlyties įtempis (angl. *shear stress*) (Wacker ir Gerhardt, 2011; Ando ir Yamamoto, 2011; Chiu ir Chien, 2011). Parodyta, kad šlyties įtempis padidina VEGF ir VEGFR2 raišką arterijų endotelio ląstelėse ir taip apsaugo jas nuo apoptozės (Dela Paz ir kt., 2012). Be to, šlyties įtempis slopina kraujo krešėjimui svarbių baltymų raišką endotelio ląstelėse (Ando ir Yamamoto, 2011; Chiu ir Chien, 2011), o krešant kraujui aktyvinti trombocitai gali išskirti antiangiogeninių veiksnių, pvz., angiostatiną (Jurasz ir kt., 2003). Taip pat minėtina, kad kraujo

tėkmė per transkripcijos veiksnį KLF2 slopina kraujagysles destabilizuojančio veiksnio ANG-2 raišką (Parmar ir kt., 2006).

Neseniai parodyta, kad susilpnėjusi kraujo tėkmė prisideda ir prie tinklainės kapiliarų regresijos 75% deguonies aplinkoje (Lobov ir kt., 2011). Žinoma, kad didelės deguonies koncentracijos paveiktoje tinklainėje vienas pirmųjų pokyčių yra kapiliarų susiaurėjimas (Smith ir kt., 1994; McLeod ir kt., 1996); apoptozė ir kapiliarų regresija įvyksta vėliau. Lobov ir bendradarbiai parodė, kad kraujagysles plečiančių veiksnių (adrenomedulino, kaptoprilio) injekcijos prieš poveikį deguonimi pristabdė regresiją, o kraujagysles siaurinantį veiksnį angiotenziną II sukėlė regresiją tinklainėse, nepaveiktose deguonies (Lobov ir kt., 2011). Kraujagyslių skersmenį reguliuojančių genų raiškai tinklainėje buvo svarbus minėtasis DLL4 – NOTCH signalinis kelias. Jo genetinis arba farmakologinis slopinimas neleido kapiliarams susiaurėti ir užsikimšti po poveikio didele deguonies koncentracija ir sustabdė regresiją (Lobov ir kt., 2011). Svarbu paminėti, kad VEGF-A irgi plečia kraujagysles, ir bent jau ankstyvojoje angiogenezėje DLL4 – NOTCH1 signalinis kelias slopina VEGF-A signalo perdavimą (Suchting ir kt., 2007). Tačiau šiame regresijos modelyje VEGF-A ir DLL4 – NOTCH valdė skirtingų kraujagyslių skersmenį reguliuojančių genų raišką, ir todėl tikėtina, kad šie du signaliniai keliai kapiliarų regresiją valdo bent iš dalies nepriklausomai (Lobov ir kt., 2011). Ar didelė deguonies koncentracija aktyvina DLL4 – NOTCH signalinį kelią (ir jei taip, kaip), neaišku.

Kaip jau minėta, tinklainės kraujagyslių tinklui bręstant dalis kapiliarų regresuoja net jei deguonies koncentracija ore nesikeičia (t.y., normalaus vystymosi metu). Taip vyksta daugelio audinių kraujagyslių tinklo formavimasis – iš pradžių užauga primityvus, tankus kraujagyslių tinklas, o tada dalis kraujagyslių regresuoja, kol pasiekiamas optimalus tinklo tankis (Wacker ir Gerhardt, 2011). Atrodo, kad bent jau tinklainės perteklinių kraujagyslių normaliai, fiziologinei regresijai irgi svarbus DLL4 – NOTCH signalinis kelias. Genetinis arba farmakologinis šio kelio slopinimas pristabdė fiziologinę tinklainės kapiliarų

regresiją (Lobov ir kt., 2011). Be to, fiziologinė regresija pagreitėjo pelėse ir zebražuvėse su išveiklintu *Nrarp* genu, kurio koduojamas baltymas yra svarbus NOTCH signalinio kelio komponentas (Phng ir kt., 2009; Lobov ir kt., 2011). Taip pat parodyta, kad NRARP yra svarbus WNT signalo perdavimui, ir pelių su išveiklintais WNT signalinio kelio komponentais *Lef1* ir *Ctnnb1* tinklainės kapiliarai irgi regresuoja greičiau (Phng ir kt., 2009). Kaip tiksliai DLL4 – NOTCH, NRARP ir WNT signaliniai keliai sąveikauja ir valdo regresiją, kol kas neišku. Vienas iš neatsakytų klausimų yra kodėl DLL4 – NOTCH slopinimas stabdo regresiją, o NRARP slopinimas ją pagreitina, nors NOTCH skatina NRARP raišką. NRARP savo ruožtu slopina NOTCH signalo perdavimą (neigiamas grįžtamasis ryšys), bet atrodo, kad regresijai ši NRARP funkcija įtakos neturi (Phng ir kt., 2009). Taip pat neišku, ar NRARP ir WNT stabdo regresiją valdydami kraujagyslių skersmenį (taigi, ir kraujo tėkmę) ar kitu būdu.

Kalbant apie fiziologinę tinklainės kapiliarų regresiją dar verta paminėti, kad ji intensyviausia prie stambiųjų tinklainės arterijų, kur, tikėtina, daugiausia deguonies (Fruttiger, 2007). Taigi, kaip ir patologinės kapiliarų regresijos 75% deguonies aplinkoje atveju, tikėtina, kad viena iš regresijos priežasčių yra augimo veiksmų koncentracijos sumažėjimas.

1.1.4.3 Aktyvių regresijos signalų sukelta regresija

Bene geriausiai ištirta fiziologinės kraujagyslių regresijos apraiška yra akies stiklakūnio kraujagyslių regresija. Kaip jau minėta, stiklakūnio kraujagyslės maitina besivystančio embriono akies audinius, bet pradėjus formuotis tinklainės kraujagyslėms tampa nebereikalingos ir regresuoja. Kurį laiką manyta, kad stiklakūnio kraujagyslių regresijos priežastis – susilpnėjusi VEGF gamyba lęšio ląstelėse. Paaiškėjo, kad tuo metu, kai stiklakūnio kraujagyslės regresuoja, lęšyje gaminama netgi daugiau VEGF nei prieš tai (Shui ir kt., 2003). Dabartinė teorija kilo prisiminus seną pastebėjimą, kad regresuojančios stiklakūnio kraujagyslės būna padengtos makrofagus primenančiomis ląstelėmis (Jack, 1972). Vėliau Lang su bendradarbiais parodė, kad makrofagai būtini stiklakūnio kraujagyslių

regresijai (Lang ir Bishop, 1993), ir išaiškino nemažai šio proceso molekulinio mechanizmo aspektų. Stiklakūnio kraujagyslės neregresuoja pelėse, neturinčiose makrofagų (Lang ir Bishop, 1993); tai rodo, kad makrofagai indukuoja regresiją, o ne tiesiog fagocituoja žuvusias ląsteles. Makrofagai sukelia kraujagyslės sudarančių ląstelių apoptozę (Lang ir kt., 1994). Apoptuoja tiek endotelio ląstelės, tiek ir pericitai (Diez-Roux ir kt., 1999). Kadangi stiklakūnio kraujagyslių regresija nevyksta pelėse, gaminančiose mažiau WNT7B (sekretuojamo signalinio baltymo) ir pelėse, neturinčiose LRP5 (vieno iš WNT šeimos ligandų koreceptorių), ir kadangi stiklakūnio makrofagai gamina WNT7B, pasiūlyta, kad makrofagų gaminamas WNT7B jungiasi prie savo receptorių kapiliarų ląstelių membranose ir perduoda signalą, sukeltą apoptozę (Kato ir kt., 2002; Lobov ir kt., 2005). Taip pat žinoma, kad stiklakūnio kraujagyslių regresija nevyksta angiopoetino-2 (ANG-2) neturinčiose pelėse (Gale ir kt., 2002). ANG-2 – tai sekretuojamas signalinis baltymas, priklausomai nuo aplinkos galintis skatinti arba slopinti angiogenezę (daugiau žiūr. 1.1.5.3 sk.). Parodyta, kad stiklakūnio kraujagyslių regresijos atveju šį baltymą gamina kapiliarų ląstelės (greičiausiai pericitai), ir kad jo trūkumas slopina kapiliarų ląstelių apoptozę ir skatina proliferaciją (Rao ir kt., 2007). Taip pat parodyta, kad ANG-2 skatina makrofagų WNT7B gamybą. Tačiau keista tai, kad WNT7B trūkumas, kitaip nei ANG-2 trūkumas, slopina ląstelių proliferaciją, nors abu slopina apoptozę ir kraujagyslių regresiją (Rao ir kt., 2007). Šiems iš pažiūros prieštaringsiems duomenims suderinti pasiūlytas toks modelis: pericitų gaminamas ANG-2 inicijuoja endotelio ląstelių apoptozę ir tuo pačiu metu WNT7B raišką makrofaguose (tiesiogiai arba per endotelio ląsteles); makrofagų WNT7B paskatina endotelio ląstelių proliferaciją; proliferuojančios endotelio ląstelės yra jautresnės apoptoziniam ANG-2 signalui ir žūva (Rao ir kt., 2007). Šiam modeliui įrodyti arba paneigti reikės papildomų eksperimentinių duomenų. Taip pat kol kas neatsakyta į keletą kitų svarbių klausimų: kaip inicijuojama makrofagų infiltracija ir ANG-2 raiška pericituose (t.y., koks pirminis regresijos pradžios signalas)? Ar pericitų ir

endotelio ląstelių apoptozė inicijuojama taip pat ir vyksta tuo pačiu metu, o gal vieno tipo ląstelių žūtis sukelia kito tipo ląstelių žūtį?

Regresiją galinčios sukelti molekulės vadinamos regresijos veiksniais. ANG-2 laikomas regresijos veiksmiu (nors tam tikromis sąlygomis gali sukelti angiogenezę, žr. žemiau). Priklausomai nuo aplinkos užpildo metaloproteazės (MMP) irgi gali veikti kaip regresijos veiksniai (žr. žemiau). Mūsų laboratorija neseniai identifikavo naują regresijos veiksnį – lizofosfatido rūgštį (LFR) (Im ir kt., 2010; Aranda ir kt., 2012), apie kurį daugiau papasakosime 1.2 skyriuje.

Būtina pabrėžti, kad neretai regresijai svarbios kelios priežastys ir kad nelengva atskirti pirmines priežastis nuo antrinių. Pavyzdžiui, susilpnėjusi kraujo tėkmė greičiausiai prisideda prie regresijos net tuomet, kai pirminis regresijos signalas yra kitoks. Pvz., dalies endotelio ląstelių apoptozė dėl augimo veiksnių trūkumo gali nulemti kapiliaro susiaurėjimą ir krešulio susidarymą, dėl ko sutriktų kraujotaka; susilpnėjusi kraujo tėkmė tada savo ruožtu paskatintų tolimesnę regresiją. Netgi stiklakūnio kraujagyslių regresija, manoma, vyksta dviem etapais: pirmiausia makrofagai sukelia pavienių endotelio ląstelių apoptozę, o po to dėl endotelio disfunkcijos kapiliaras susiaurėja, susidaro krešulys, nebeteka kraujas, ir apoptuoja likusios to kapiliaro segmento endotelio ląstelės (Meeson ir kt., 1996).

1.1.5 Kraujagyslių stabilumo molekuliniai mechanizmai. Pericitai

Iki šiol aptarėme kraujagyslių formavimąsi ir regresiją. Didžiąją dalį savo „gyvenimo“ kraujagyslė neauga ir neregresuoja. Kraujagyslių stabilumas – tai ne pasyvi būseną, o aktyvus procesas. Įvairūs veiksniai, kuriuos toliau vadinsime stabilizavimo veiksniais, neleidžia kraujagyslėms be atitinkamo signalo augti arba regresuoti, palaiko kraujagyslės tipui ir audinio reikmėms tinkamiausią kraujagyslės struktūrą ir užtikrina jos funkcionalumą. Kraujagyslių stabilumui svarbu, kad endotelio ląstelės išgyventų (t.y., svarbūs išgyvenimo signalai), liktų diferencijuotos, tačiau dalintųsi ir migruotų tik tiek, kiek būtina pažeistam endoteliumi atstatyti; svarbu, kad jungtys tarp endotelio ląstelių tarpusavyje ir su

pagalbinėmis ląstelėmis būtų tvirtos; svarbus kraujagyslės sienelės „cementas“ – pamatinė lamina ir kitos struktūros iš tarpląstelinio užpildo baltymų (London ir kt., 2009; Murakami, 2012). Šiems procesams ir struktūroms palaikyti svarbi kraujo tėkmė, apie kurios įtaką kraujagyslių stabilumui jau trumpai papasakojome, ir ypač svarbūs pericitai.

1.1.5.1 Pericitų savybės ir funkcijos

Pericitai pirmą kartą aprašyti 1871 m. (Eberth, 1871). Po dviejų metų juos kaip susitraukti gebančias ląsteles smulkių kraujagyslių endotelio ląstelių pašonėje aprašė Rouget (Rouget, 1873). Pericitais (gr. περί (apie, aplink), κύτος (ląstelė)) juos pavadino Zimmermann (Zimmermann, 1923). Pastaruoju metu pericitais vis labiau domimasi, tačiau vis dar nesutariama, ką tiksliai galima vadinti pericitu (Díaz-Flores ir kt., 2009; Armulik ir kt., 2011). Pagal griežčiausią apibrėžimą, kilusį iš elektroninės mikroskopijos darbų, tai kraujagyslės sienelės ląstelės, iš išorės dengiančios endotelio ląstelių vamzdelį ir apgaubtos pamatine lamina, kuria dalijasi su endotelio ląstelėmis (Díaz-Flores ir kt., 2009; Armulik ir kt., 2011). Šis apibrėžimas atskiria pericitus nuo giminingų kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių, kurios aptinkamos stambesnių kraujagyslių sienelėse (paprastai išsidėsčiusios koncentriškais sluoksniais), fibroblastų ir kitokių kraujagyslės sienelės ląstelių, kurių negaibia pamatinė lamina. Deja, šis apibrėžimas nepatogus, nes ląstelių prieskyrą pericitams būtina pagrįsti elektroninės mikroskopijos duomenimis, jis netinka *in vitro* auginamoms ląstelių kultūroms ir netgi *in vivo* aktyvios angiogenezės atveju, kai pamatinė lamina suardoma (Armulik ir kt., 2011). Todėl praktiškai pericitai apibūdinami kaip iš išorės kraujagyslių endotelį dengiančios ląstelės, kurioms būdinga tam tikra morfologija ir tam tikrų žymenų raiška (žr. žemiau).

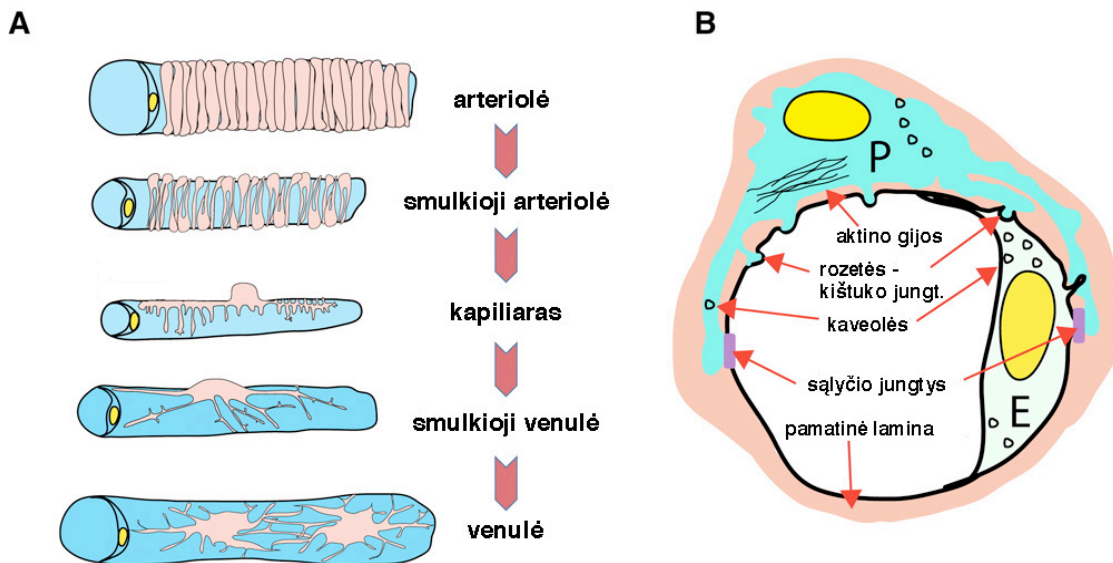
Pericitų ir į juos panašių ląstelių randama beveik visuose tirtuose žinduolių audiniuose (Sims, 1986). Jie dengia kraujagysles, bet ne limfagysles (Armulik ir kt., 2011). Pericitų būna kapiliarų, smulkiųjų arteriolių ir smulkiųjų venulių sienelėse ir galbūt netgi stambesnių kraujagyslių sienelėse (Sims, 1986; Díaz-

Flores ir kt., 2009). Pericitų dangos tankis labai įvairus ir priklauso nuo organizmo rūšies, organo, audinio ir kraujagyslės tipo. Kraujagyslės sienelėje pericitų paprastai mažiau nei endotelio ląstelių (įvairiuose darbuose aprašyti endotelio ląstelių ir pericitų santykiai nuo 1:1 iki 100:1), ir pericitai paprastai nepadengia viso išorinio endotelio paviršiaus. Manoma, kad daugiausia pericitų būna centrinės nervų sistemos kraujagyslėse (Armulik ir kt., 2011), kur jie prisideda prie kraujo – smegenų barjero formavimo ir veiklos (Armulik ir kt., 2010; Daneman ir kt., 2010).

Pericitų morfologija vėlgi įvairi ir ypač priklauso nuo to, kokią kraujagyslę jie dengia. Kapiliarų pericitams būdingas apvalus, išsikišęs ląstelės kūnas, keletas ilgų pirminių ataugų, nutįsusių išilgai kraujagyslės, ir daug trumpesnių antrinių ataugų, išsidėsčiusių statmenai pirminėms (1.4 pav.). Arteriolių pericitų ląstelės forma yra tarpinė tarp kapiliarų pericitų ir arterijų lygiųjų raumenų ląstelių: ląstelės kūnas plokštesnis, ataugų mažiau ir jos skersai apvyniojusios kraujagyslę. Venulių pericitai būna panašios į žvaigždę ar vorą formos ir tuo primena venų lygiųjų raumenų ląsteles (1.4 pav.) (Armulik ir kt., 2011). Taigi, tarp „klasikinio“ kapiliaro pericito ir „klasikinės“ lygiųjų raumenų ląstelės egzistuoja daug tarpinių ląstelių tipų. Manoma, kad pericitai, lygiųjų raumenų ląstelės ir tarpiniai ląstelių tipai – tai tų pačių ląstelių skirtingi fenotipiniai variantai, pritaikę prie savitų dengiamos kraujagyslės poreikių ir savybių ir galintys virsti vieni kitais (Gerhardt ir Betsholtz, 2003). Todėl paprastumo dėlei dažnai vartojamas visus šiuos tipus apimantis terminas „sienelės ląstelės“ (angl. *mural cells*).

Kaip jau minėta, ramybės būsenos kraujagyslės pericitus iš visų pusių gaubia pamatinė lamina (1.4 pav., B). Iš endotelio pusės pamatinėje laminoje daug skylių, per kurias endotelio ląstelės ir pericitai sąveikauja. Dauguma jungčių tarp šių tipų ląstelių yra kištuko ir rozetės (angl. *peg-socket*) tipo, bet aprašyta ir sąlyčio jungtis (angl. *adherens junction*) primenančių jungčių ir netgi plyšinių (angl. *gap junctions*) jungčių (Sims, 1986; Díaz-Flores ir kt., 2009). Vieno pericito

ataugos paprastai sąveikauja su keletu endotelio ląstelių (Gerhardt ir Betsholtz, 2003).



1.4 pav. Pericitų anatomija.

A. Įvairių tipų kraujagyslių sieninių ląstelių morfologija. B. Kapiliaro skerspjūvis. P – pericitas. E – endotelio ląstelė. (Armulik ir kt., 2011)

Pericitus identifikuoti sudėtinga ir dėl to, kad nėra vieno molekulinio žymens, kurį turėtų visi pericitai, ir tik pericitai. Populiariausi pericitų žymenys yra PDGFR β (PDGF-B, trombocitų kilmės augimo veiksnio B, receptorių), NG2 (membranos proteoglikanas), α SMA (lygiųjų raumenų α aktinas) ir desminas (tarpinių gijų baltymas). Jų raiška būdinga ir daugelio kitų tipų ląstelėms, pvz., α SMA gausu lygiųjų raumenų ląstelėse (Skalli ir kt., 1986), NG2 – oligodendrocituose, makrofaguose (Moransard ir kt., 2011), desmino – širdies ir griaučių raumenų miocituose (Li ir kt., 1997). Be to, šių žymenų raiška pericituose priklauso nuo audinio, kraujagyslės tipo, vystymosi stadijos ir kitų veiksnių. Pvz., žiurkės žarnų pasaito venulių pericitai neturi NG2 (Murfee ir kt., 2005), jei kraujagyslės ramybės būsenos, bet šio žymens raiška išauga angiogenezės metu (Murfee ir kt., 2006). Tuo tarpu kapiliarų ir arteriolių pericituose NG2 aptinkamas abiem atvejais.

1.1.5.2 Kraujagyslių padengimo pericitais molekuliniai mechanizmai

Pericitų kilmė nevisai aiški. Atrodo, kad dauguma galvos regiono (įskaitant centrinę nervų sistemą) ir užkrūčio liaukos pericitų yra nervinės keteros (t.y., ektodermos) kilmės, o dauguma vidaus organų pericitų – mezotelio (t.y., mezodermos) kilmės. Pastaruoju atveju epitelinės mezotelio ląstelės virsta mezenchiminėmis, migruoja į organus ir ten tampa fibroblastais, lygiųjų raumenų ląstelėmis ir pericitais (Armulik ir kt., 2011). Ar angiogenezės būdu susiformuojančių naujų kraujagyslių pericitai irgi diferencijuoja iš nesubrendusios mezenchimos, o gal tiesiog atsiranda dalijantis esamiems pericitams, neaišku.

Kraujagyslių padengimo pericitais molekuliniai mechanizmai neblogai ištirti. Bene svarbiausias šio proceso veiksnys yra trombocitų kilmės augimo veiksnys B (**PDGF-B**, angl. *platelet-derived growth factor B*). Augančių kraujagyslių endotelio ląstelės išskiria PDGF-BB (aktyvioji šio augimo veiksnio forma yra dimeras), kuris jungiasi prie savo receptoriaus PDGFR β pericitų (ar pericitų pirmtakų) ląstelės membranoje ir skatina dalijimąsi ir migraciją link kraujagyslių (apžvelgta Andrae ir kt., 2008). Pelių su išveiklintais *pdgfb* arba *pdgfrb* genais fenotipai labai panašūs – jos nugaišta embriono vystymosi metu arba iškart po gimimo dėl pericitų trūkumo sukeltos kraujagyslių disfunkcijos (Leveen ir kt., 1994; Soriano, 1994; Lindahl ir kt., 1997; Hellström ir kt., 2001). Šių pelių kraujagyslėse pastebima endotelio ląstelių hiperplazija, spindžio anomalijos ir kraujosrūvos. Endotelio ląstelių išskirtą PDGF-BB sulaiko tarpląstelinio užpildo proteoglikanai. Tokia siaura šio augimo veiksnio lokalizacija yra būtina tinkamoms pericitų ir endotelio ląstelių sąveikoms susidaryti (Lindblom ir kt., 2003).

Manoma, kad kraujagyslės sienelės ląstelių diferenciacijai svarbus **TGF- β** signalinis kelias. Daugelyje *in vitro* ir *in vivo* darbų šis kelias susietas su mezenchimos ląstelių diferenciacija į pericitus ir VSMC bei su pericitų ir VSMC dalijimusi (von Tell ir kt., 2006; Gaengel ir kt., 2009; Armulik ir kt., 2011). Tačiau kadangi tiek sienelės ląstelės, tiek ir endotelio ląstelės gamina ir TGF- β , ir

jo receptorių, ir kadangi TGF- β svarbus ir endotelio ląstelių diferenciacijai bei funkcijoms, sudėtinga atskirti pirminius šio augimo veiksnio efektus nuo antrinių (Armulik ir kt., 2011). Kaip jau minėta 1.1.3.1 sk., pelės su išveiklintais TGF- β signalinio kelio genais gaisa embriono vystymosi metu, greičiausiai dėl sutrikusio kraujagyslių formavimosi ir / arba brandos. Šios šeimos genų mutacijos sukelia paveldimą ligą – hemoraginę telangiektaziją, kuriai būdingos kraujagyslių anomalijos ir pericitų trūkumas (Murakami, 2012).

Dar vienas kraujagyslių padengimui sienelės ląstelėmis svarbus veiksnys yra sfingozino-1-fosfatas (S1F). Šį sfingolipidą gamina endotelio ląstelės, trombocitai ir kai kurių kitų tipų ląstelės; jo gausu kraujo plazmoje (Hla ir Brinkmann, 2011). Pelėms su išveiklintais S1F gaminančių fermentų (sfingozino kinazių) genais būdingi nervų sistemos vystymosi sutrikimai, bet tuo pačiu trūksta lygiųjų raumenų ląstelių, kraujagyslės išsiplėtusios, pasitaiko kraujosrūvų (Mizugishi ir kt., 2005). Panašus yra ir vieno iš S1F receptorių, S1P₁, geno išveiklinimo (tik endotelio ląstelėse arba visose ląstelėse) fenotipas (Liu ir kt., 2000; Allende ir kt., 2003). Kaip konkrečiai S1F veikia kraujagysles padengiant sienelės ląstelėmis, neaišku. Pasiūlytas toks mechanizmas: S1F jungiasi prie S1P₁, esančio endotelio ląstelės plazminėje membranoje, ir pradeda signalinę kaskadą, kuri baigiasi N-kadherino – ląstelių sąlyčio baltymo, svarbaus endotelio ląstelių ir sienelės ląstelių tarpusavio sąveikoms – pernaša į plazminę membraną ir aktyvinimu. Taip sutvirtinamos nuo N-kadherino priklausomos sąveikos tarp šių dviejų tipų ląstelių (Paik ir kt., 2004). Įdomu tai, kad minėtasis TGF- β kartu su NOTCH reguliuoja N-kadherino raišką endotelio ląstelėse (Li ir kt., 2011).

Apie DLL – NOTCH signalinio kelio svarbą angiogenezei ir regresijai jau rašėme, tačiau čia verta paminėti, kad NOTCH3 siejamas su VSMC brendimu. Žmogaus *NOTCH3* geno mutacijos sukelia CADASIL sindromą (autosominę dominantinę arteriopatiją su subkortikiniiais infarktais ir leukoencefalopatija) – sunkią ligą, kuriai būdinga VSMC degeneracija ir kraujagyslių anomalijos (Gaengel ir kt., 2009). Pelių *Notch3* geno išveiklinimas parodė, kad be šio geno

arterijų lygiųjų raumenų ląstelių forma, dydis ir žymenų raiška yra pakitę, be to, jos netvarkingai išsidėsto arterijų sienelėse (Domenga ir kt., 2004). Iš įvairių NOTCH ligandų šiame kontekste svarbiausias, ko gero, endotelio ląstelių baltymas JAG-1 (angl. *jagged-1*) (Doi ir kt., 2006; H. Liu ir kt., 2009). Pasiūlyta keletas mechanizmų, kaip NOTCH3 signalinis kelias prisideda prie VSMC brandos: viena, jis didina PDGFR β raišką (Jin ir kt., 2008); antra, jis didina $\alpha\beta3$ integrino raišką, o šis integrinas padeda VSMC prisijungti prie VWF molekulės pamatinėje laminoje (Scheppke ir kt., 2012).

Yra duomenų, kad su kraujagyslių padengimu sienelės ląstelėmis dar susiję HB-EGF (angl. *heparin-binding epidermal growth factor*) (Stratman ir kt., 2010), SDF-1 α (angl. *stromal-derived factor*) (Song ir kt., 2009), SHH (angl. *sonic hedgehog*) (Nielsen in Dymecki, 2010) ir kai kurie kiti veiksniai. Senesniuose apžvalginuose straipsniuose dažnai minimas ir angiopoetinas-1 (ANG-1), nes pelėms, kurių *ang1* genas buvo išveiklintas, trūko pericitų, tačiau neseniai ANG-1 svarba kraujagyslių padengimui pericitais paneigta (Jeansson ir kt., 2011).

1.1.5.3 Pericitų poveikis kraujagyslių stabilumui

Pastebėta koreliacija, kad kraujagyslės, kurioms trūksta pericitų, būna mažiau stabilios: jos labiau priklauso nuo augimo veiksnių, labiau linkusios regresuoti, yra netvarkingos struktūros, nevienodo spindžio, pernelyg laidžios. Pvz., dalis navikų kraujagyslių nepadengtos pericitais, ir parodyta, kad jos regresuoja daugiau, nei pericitų turinčios kraujagyslės, kai sumažinama VEGF raiška (Benjamin ir kt., 1999) arba nuslopinamas VEGF signalinis kelias (Helfrich ir kt., 2010). Suleidus PDGF-BB į pelės akį, pastebėta, kad naujesnės tinklainės kraujagyslės neteko pericitų dangos (greičiausiai todėl, kad buvo pažeistas PDGF-BB gradientas) ir regresavo, o senesnės, subrendusios kraujagyslės liko padengtos pericitais ir buvo stabilios (Benjamin ir kt., 1998). Kaip jau minėta, PDGF-B arba PDGFR β neturinčios pelės daugelyje audinių neturi pericitų ir neišgyvena iki embriono vystymosi pabaigos. Betsholtz grupė stebėjo angiogenezę šių pelių smegenyse ir parodė, kad pericitų trūkumas neturėjo įtakos kraujagyslių tinklo

tankiui (t.y., kraujagyslių augimas nebuvo pažeistas), bet paveikė kraujagyslių struktūrą (Hellström ir kt., 2001). Pelių be pericitų kraujagyslės turėjo nevienodo storio sienelę ir daugiau endotelio ląstelių nei kontrolinių pelių kraujagyslės. Jungtys tarp endotelio ląstelių buvo pakitusios. Paprastai vidinis endotelio paviršius būna lygus, tačiau šiose pelėse pastebėtos endotelio ląstelių ataugos, išsikišusios į kraujagyslės vidų. Ilgainiui išsivystė aneurizmos ir kraujosrūvos (Hellström ir kt., 2001).

Betsholtz grupė taip pat išveiklino *pdgfb* geną tik pelės endotelio ląstelėse. Kitaip nei pelės, kurių šis genas išveiklintas visose ląstelėse, šios pelės nenugaiso embriono vystymosi metu, buvo vaisingos ir iš pažiūros sveikos. Jų pericitų dangos tankis buvo sumažėjęs, bet dėl nevienodo išveiklinimo efektyvumo labai skyrėsi tarp skirtingų pelių (20 – 90% normalaus tankio) ir netgi tarp tos pačios pelės skirtingų kraujagyslių (Enge ir kt., 2002). Šių pelių tinklainės kraujagyslės buvo netvarkingai išsidėsčiusios (vienos tinklainės sritys turėjo labai daug kraujagyslių, kitos - labai mažai), jų spindžio įvairovė buvo didesnė nei įprasta, pastebėta daug aneurizmų ir regresuojančių kapiliarų segmentų. Įdomu tai, kad kuo mažiau pericitų turėjo pelė, tuo labiau pažeistos buvo jos kraujagyslės ir netgi toje pačioje tinklainėje kraujagyslės su retesne pericitų danga turėjo daugiau pažaidų (Enge ir kt., 2002). Pelių tinklainėse, kurių kraujagyslėse buvo mažiausiai pericitų, netgi prasidėjo kompensacinė angiogenezė.

Pericitų svarba kraujagyslių laidumo reguliavimui taip pat pademonstruota ne kartą. Jų danga būtina kraujo – smegenų barjerui užtikrinti (pericitų trūkumas padidina centrinės nervų sistemos kapiliarų laidumą) (Armulik ir kt., 2010; Daneman ir kt., 2010). Be to, navikų kraujagyslių laidumas įvairiuose modeliuose atvirkščiai koreliuoja su pericitų dangos tankiu (Hamzah ir kt., 2008; Mazzone ir kt., 2009; Helfrich ir kt., 2010).

Visgi būtina paminėti, kad ne visi tyrėjai pastebi apsauginį pericitų efektą. Pvz., keliuose modeliuose pericitų danga neapsaugojo kraujagyslių nuo regresijos (Baluk ir kt., 2004; Inai ir kt., 2004). Kodėl pericitų danga ne visada stabilizuoja

kraujagysles, neaišku. Gali būti, kad pericitų buvimo kraujagyslės sienelėje negana – svarbus tinkamų sąveikų tarp endotelio ląstelių ir pericitų susidarymas ir pericitų branda (Baluk ir kt., 2004; von Tell ir kt., 2006). Taigi, pericitų poveikis kraujagyslių stabilumui sudėtingas ir dar ne iki galo ištirtas.

Kaip pericitai stabilizuoja kraujagysles? Iš dalies jų funkcija struktūrinė: audiniuose, kur pericitų danga ypač tanki, pvz., centrinėje nervų sistemoje, ji gali mechaniškai sutvirtinti kraujagyslę (von Tell ir kt., 2006; Mathiisen ir kt., 2010). Tačiau daugumoje audinių, ko gero, svarbesni kiti du mechanizmai:

- pericitai gamina pamatinės laminos komponentus ir reguliuoja jų ardančių fermentų aktyvumą, o pamatinė lamina sutvirtina kraujagyslės sienelę, sumažina jos laidumą, palaiko kraujagyslės struktūrą ir indukuoja ramybės būseną endotelio ląstelėse (Hallmann ir kt., 2005; Murakami, 2012);
- pericitai taip pat gamina, aktyvina ir endotelio ląstelėms pateikia išgyvenimo ir stabilizavimo veiksnius (von Tell ir kt., 2006; Gaengel ir kt., 2009; Ribatti ir kt., 2011).

Kad pericitai ir endotelio ląstelės dalinasi pamatine lamina, pastebėta dar ankstyvuosiuose mikroskopijos darbuose (apžvelgta Sims, 1986). Iškelta hipotezė, kad pericitai prisideda prie pamatinės laminos komponentų gamybos. Vėliau patvirtinta, kad pericitai geba sintetinti pamatinės laminos komponentus *in vitro* ir *in vivo* (Mandarino ir kt., 1993; Stratman ir kt., 2009; Stratman ir kt., 2010). Dabartinei sampratai, kaip pericitų ir endotelio ląstelių tarpusavio sąveikos prisideda prie pamatinės laminos sintezės ir, per pamatinę lamina, prie kraujagyslių stabilizavimo, daug davė Davis laboratorijos darbai. Ši laboratorija parodė, kad tiek *in vitro* (vamzdelių formavimosi kolageno gelyje), tiek *in vivo* (putpelės embrione) kraujagyslių padengimas pericitais koreliuoja su pamatinės laminos sintezės pradžia (Stratman ir kt., 2009). Kai endotelio ląstelės buvo auginamos *in vitro* kartu su pericitais, tarp šių dviejų tipų ląstelių vienas į kitą atkreiptų paviršių kaupėsi daugiau pamatinės laminos komponentų: kolageno IV, lamininų, fibronektino, nidogenų, perlekano. Genų raiškos tyrimai parodė, kad

tiek endotelio ląstelės, tiek pericitai gamina pamatinės laminos baltymus, ir kad endotelio ląstelių ir pericitų auginimas kartu padidina šių baltymų genų raišką abiejų tipų ląstelėse (Stratman ir kt., 2009). Pericitų danga šiame modelyje reguliavo endotelio ląstelių vamzdelių skersmenį. Veikiant antikūnais, neleidžiančiais susiformuoti fibronektino tinklui, parodyta, kad šiam pericitų poveikiui būtinas fibronektino tinklo, t.y., tvarkingos pamatinės laminos, formavimas. Pericitai taip pat nebevaldė endotelio ląstelių vamzdelių skersmens, kai buvo pridėta antikūnų, neleidžiančių ląstelių integrinams sąveikauti su pamatinės laminos komponentais (Stratman ir kt., 2009). PDGF-BB ir HB-EGF signalinių kelių slopinimas sumažino vamzdelių padengimą pericitais *in vitro* bei kraujagyslių padengimą pericitais putpelės embrione ir sutrikdė pamatinės laminos komponentų sintezę (Stratman ir kt., 2010). Putpelės embrione pericitų dangos ir pamatinės laminos anomalijos koreliavo su kraujagyslių tinklo anomalijomis. Daugelyje embrionų išsivystė kraujosrūvos (Stratman ir kt., 2010). Taigi, pericitai prisideda prie pamatinės laminos, kuri stabilizuoja kraujagysles, formavimo.

Uždegimo, hipoksijos ar kitokių signalų aktyvintos endotelio ląstelės (ir kitų tipų ląstelės) gamina tarpląstelinio užpildo metaloproteazės MMP, kurios ardo pamatinę laminą (Carmeliet ir Jain, 2011a; Potente ir kt., 2011). MMP svarbios tiek angiogenezei, tiek regresijai (Johnson ir kt., 2004; Bergers ir kt., 2000; Schrimpf ir kt., 2012). Pericitai prie pamatinės laminos stabilumo prisideda ne tik gamindami jos komponentus, bet ir valdydami MMP aktyvumą. *In vitro* kraujagyslių regresijos modeliuose parodyta, kad pericitai gamina MMP slopiklį TIMP3, kuris stabdo kraujagyslių regresiją (Saunders ir kt., 2006; Schrimpf ir kt., 2012). Be to, pelių inkstų išemijos modelyje pericitų atšoka nuo inkstų endotelio ląstelių ir diferenciacija į miofibroblastus koreliavo su sumažėjusia TIMP3 ir padidėjusia ADAMTS1 (vienos iš MMP) raiška. Pelių su išveiklintu TIMP3 baltymą koduojančiu genu inkstų kapiliarų tankis normaliomis sąlygomis buvo didesnis nei kontrolinių pelių, bet po išemijos ir reperfuzijos daugiau *Timp3*^{-/-}

peliių kapiliarų regresavo, kapiliarai buvo laidesni, be to, pastebėta inkstų fibrozė ir susilpnėjusi inkstų funkcija (Schrimpf ir kt., 2012).

Pericitai ne tik sintezuoja pamatinės membranos komponentus ir reguliuoja ją ardančių fermentų aktyvumą, bet taip pat išskiria stabilizavimo ir išgyvenimo veiksnius, kurie tiesiogiai veikia endotelio ląsteles. Bene geriausiai žinomas pericituose sintezuojamas stabilizavimo veiksnys yra angiopoetinas-1 (**ANG-1**). Angiopoetiniai – tai maždaug 70 kDa molekulinės masės sekretuojami augimo veiksniai (apžvelgta Singh ir kt., 2011). ANG-1 ir ANG-2 yra geriausiai ištirti angiopoetinų šeimos nariai. Pagrindinis angiopoetinų receptorius yra TIE2 – tai receptorinė tirozino kinazė. TIE2 daugiausia ekspresuoja endotelio ląstelės. Pericitai ir lygiųjų raumenų ląstelės gamina ANG-1, kuris jungiasi prie TIE2 receptoriaus endotelio ląstelių membranose. ANG-1 vaidmuo gan sudėtingas: ilgą laiką manyta, kad jis svarbus pericitų pritraukimui prie augančių kraujagyslių, nes pelių su išveiklintu *Ang1* genu kraujagyslėms trūksta pericitų, ir jos labai netvarkingos struktūros. Manyta, kad šios pelės gaišta būtent dėl pericitų stokos sukeltų kraujagyslių defektų (Suri ir kt., 1996). Neseniai paaiškėjo, kad pirminis ANG-1 trūkumo sukeltas defektas yra sutrikęs širdies vystymasis, o kraujagyslių defektai šioje vystymosi stadijoje greičiausiai tėra sutrikusios širdies veiklos pasekmė (Jeansson ir kt., 2011). Pericitų trūkumo šiame darbe išvis nepastebėta. Išveiklinus *Ang1* geną vėlyvojo embriono vystymosi metu (t.y., tada, kai širdies vystymuisi jis greičiausiai nebereikalingas), pastebėtas kraujagyslių išsiplėtimas ir pamatinės laminos anomalijos kepenyse ir inkstuose, nors pasidengimas pericitais buvo normalus (Jeansson ir kt., 2011). Taigi, vis dar manoma, kad ANG-1 svarbus embriono kraujagyslių stabilizavimui, bet ne dėl to, kad pritraukia pericitus prie kraujagyslių, o kaip pericitų sintezuojamas veiksnys, lemiantis normalią kraujagyslių struktūrą.

Ramybės būsenos suaugusio organizmo kraujagyslėms ANG-1 nebūtinus, bet aktyvios angiogenezės atveju jis gali slopinti VEGF poveikį kraujagyslėms: padidėjusį laidumą (Thurston ir kt., 1999; Jeansson ir kt., 2011) ir naujų

kraujagyslių augimą (Visconti ir kt., 2002; Jeansson ir kt., 2011). Tiesa, kiti autoriai sutinka, kad ANG-1 slopina kraujagyslių laidumą, bet apibūdina jį kaip veiksnį, skatinantį, o ne slopinantį naujų kraujagyslių augimą (Suri ir kt., 1998; Thurston ir kt., 1999). Taigi, ANG-1 poveikis kraujagyslių augimui greičiausiai priklauso nuo aplinkos. Taip pat parodyta, kad ANG-1 slopina uždegiminių ir kraujo krešėjimo veiksnių sintezę, sukeltą VEGF ir TNF α (Augustin ir kt., 2009). Minėtina, kad ANG-1 injekcija į pelės akį iš dalies panaikino tinklainės kraujagyslių pažaidas, kurias sukėlė pericitų trūkumas dėl slopinančio PDGFR β antikūno injekcijos (Uemura ir kt., 2002). Taigi, pericitai kraujagysles stabilizuoja iš dalies per ANG-1.

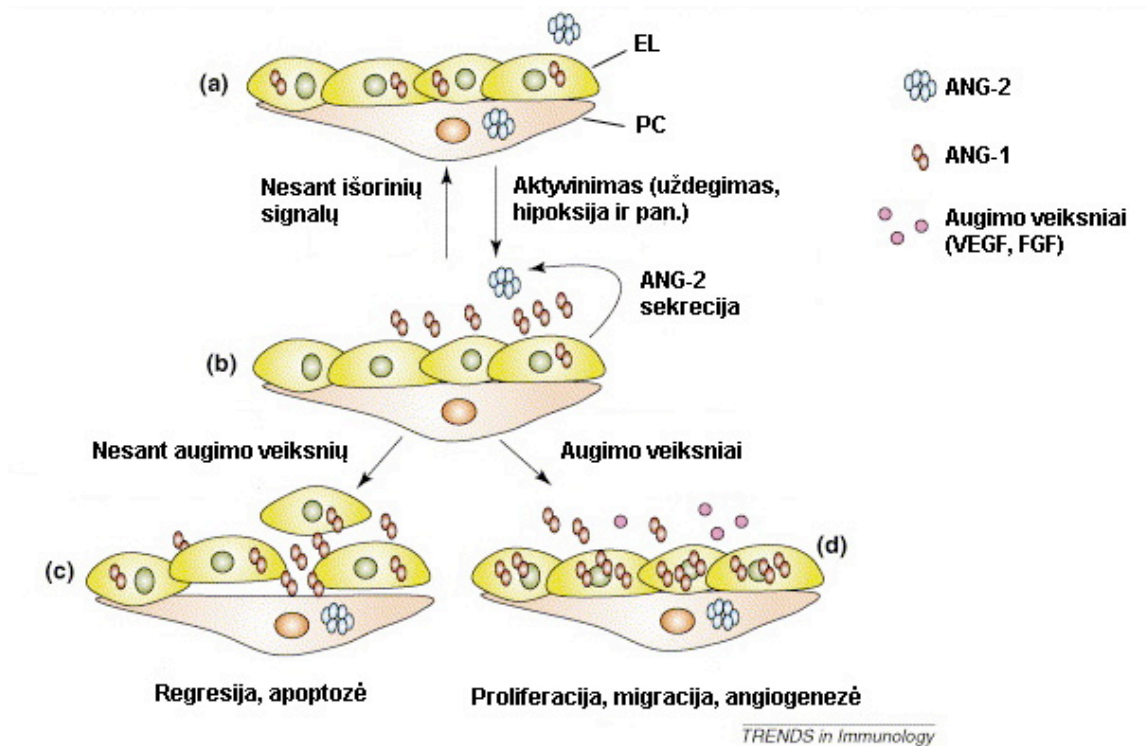
ANG-1 poveikio endotelio ląstelėms molekuliniai mechanizmai tiriami. Parodyta, kad TIE2 gali aktyvinti fosfatidilinozitolio-3 kinazę (PI3K), per ją aktyvinti kinazę Akt ir per Akt substratus skatinti išgyvenimą ir slopinti apoptozę (apžvelgta Augustin ir kt., 2009). TIE-2 aktyvinimas taip pat trukdo internalizuoti VE-kadheriną ir taip stiprina endotelio ląstelių sąlyčio jungtis (Gavard ir kt., 2008). ANG-1 aktyvintas TIE2 taip pat silpnina NF- κ B signalinio kelio aktyvumą ir taip slopina uždegimo veiksnių sintezę (Jeon ir kt., 2003).

ANG-2 taip pat jungiasi prie TIE2 receptoriaus, bet sukelia daug silpnesnį signalinį atsaką ir todėl laikomas ANG-1 antagonistu (Augustin ir kt., 2009; Singh ir kt., 2011). ANG-2 daugiausia sintezuoja pačios endotelio ląstelės. Jo poveikis kraujagyslėms vėlgi priklauso nuo aplinkos, tačiau daugumos autorių jis laikomas destabilizuojančiu: skatinančiu kraujagyslių augimą esant angiogeninių veiksnių, skatinančiu regresiją esant regresijos / nesant angiogeninių veiksnių ir didinančiu kraujagyslių laidumą (Fiedler ir Augustin, 2006; Augustin ir kt., 2009; Jeansson ir kt., 2011). ANG-2 raiška padidėja aktyvios angiogenezės ir regresijos metu (Maissonpierre ir kt., 1997; Goede ir kt., 1998; Gale ir kt., 2002) ir esant hipoksijai arba uždegimui (šios sąlygos paprastai sukelia angiogenezę) (Fiedler ir Augustin, 2006). Augančiame kraujagyslių tinkle ANG-2 raiška būdinga tįstančios kraujagyslės priekiui (Maissonpierre ir kt., 1997). ANG-2 svarbą

kraujagyslių destabilizavimui parodė šie darbai: 1) pelių su išveiklintu *Ang2* genu stiklakūnio kraujagyslės neregresuoja, o tinklainės kraujagyslių augimas sulėtėjęs (Gale ir kt., 2002; Hackett ir kt., 2002); 2) padidinta ANG-2 raiška embriono vystymosi metu sukelia kraujagyslių tinklo defektus (Maissonpierre ir kt., 1997); 3) ANG-2 stimuliuoja vyzdžio membranos (tai vienas iš stiklakūnio kraujagyslių sluoksnių) endotelio ląstelių dalijimąsi, išgyvenimą ir migraciją esant VEGF, bet skatina apoptozę, kai VEGF nuslopintas (Lobov ir kt., 2002); 4) ANG-2 skatina naujų kraujagyslių augimą deguoninės retinopatijos modelyje, bet vėliau skatina šių kraujagyslių regresiją (Oshima ir kt., 2005). Manoma, kad ANG-2 destabilizuoja kraujagysles neleisdamas ANG-1 veikti (stabilizuoti kraujagyslių). Kita vertus, keliuose modeliuose parodyta, kad ANG-2 sumažina kraujagyslių pericitų dangos tankį (Zhang ir kt., 2003; Hammes ir kt., 2004; Feng ir kt., 2007), taigi galbūt destabilizuoja dar ir tokiu būdu.

Apibendrinti turimą informaciją apie ANG-1, ANG-2, pericitus ir kraujagyslių stabilumą galima taip (1.5 pav.): pericitų gaminamas ANG-1 stabilizuoja kraujagysles; uždegimas, hipoksija ar kitokios endotelį aktyvinančios sąlygos padidina ANG-2 raišką (paprastai kartu su VEGF); ANG-2 destabilizuoja kraujagyslę (konkuruodamas su ANG-1 ir / arba pašalindamas pericitus) ir taip padeda VEGF sukelti naujų kraujagyslių augimą. Padidėjusi ANG-2 raiška nesant VEGF ar kitokių angiogeninių veiksnių sukelia regresiją. Taigi, pericitų gaminamas ANG-1 veikia lyg stabdžiai, mažinantys kraujagyslių jautrumą angiogeniniams, regresijos, uždegimo ir krešėjimą skatinantiems veiksniams. Minėtina, kad kraujo tėkmė (per transkripcijos veiksnių KLF2) mažina ANG-2 ir didina TIE2 raišką endotelio ląstelėse (Parmar ir kt., 2006). Taigi, tikėtina, kad ir kraujo tėkmė kraujagysles stabilizuoja iš dalies per angiopoetinų / TIE2 signalinį kelią. ANG-2 raiška padidėjusi kai kuriose su kraujagyslių disfunkcija siejamose žmogaus patologijose (pvz., sergant sepsiu, proliferacine diabetine retinopatija, kai kuriais vėžio tipais) ir neigiamai koreliuoja su ligos prognoze (Augustin ir kt.,

2009). Be to, mutacijos žmogaus *TIE2* gene siejamos su paveldimomis ir somatinėmis venų deformacijomis (Murakami, 2012).



1.5 pav. Kraujagyslių ramybės būsenos (a), aktyvios būsenos (b), regresijos (c) ir angiogenezės (d) reguliavimo per ANG-1 ir ANG-2 modelis. EL – endotelio ląstelė, PC – pericitas. (Fiedler ir Augustin, 2006).

Pericitai stabilizuoja endotelį dar ir skatindami endotelio ląstelių išgyvenimą. Pericitai išskiria VEGF-A, kuris yra vienas iš svarbiausių endotelio ląstelių išgyvenimo veiksnių (Darland ir kt., 2003; Evensen ir kt., 2009). Jie taip pat paskatina VEGF-A gamybą pačiose endotelio ląstelėse (Franco ir kt., 2011). Galiausiai pericitai sintetuoja ir aktyvina TGF- β , kurio vaidmuo, kaip jau minėta, sudėtingas, bet kuris paprastai siejamas su endotelio ląstelių išgyvenimu ir kraujagyslių stabilumu (Sato ir Rifkin, 1989; Shih ir kt., 2003; Walshe ir kt., 2009).

1.1.5.4 Kitos pericity funkcijos. Klinikinė reikšmė

Pastaruoju metu pericitai sulaukia vis daugiau dėmesio. Paaiškėjo, kad šios ląstelės ne tik svarbios kraujagyslių stabilizavimui, bet turi ir kitų funkcijų bei veikia įvairiuose patologiniuose procesuose.

Iškelta hipotezė, kad pericitai – tai mezenchiminės kamieninės ląstelės (MSC, angl. *mesenchymal stem cells*). MSC apibrėžiamos kaip į fibroblastus panašios ląstelės, galinčios diferencijuoti į osteoblastus, adipocitus ir chondrocitus (apžvelgta Nombela-Arrieta ir kt., 2011). Jų atrasta daugelyje audinių, bet jų kilmė ir tapatybė neaiški. Per pastarąjį dešimtmetį parodyta, kad MSC daugelyje audinių būna greta kraujagyslių, kad pericitai *in vitro* ir *in vivo* geba diferencijuoti į osteoblastus, adipocitus ir chondrocitus, ir kad pericitų ir MSC žymenų raiška panaši (apžvelgta Corselli ir kt., 2010). Šie duomenys, be abejo, labai įdomūs medikams ir mokslininkams, dirbantiems sparčiai besivystančioje regeneracinės biologijos srityje ir ieškantiems alternatyvų embrionų kamieninėms ląstelėms. Tačiau būtina pabrėžti, kad dėl anksčiau minėtų pericitų identifikavimo sunkumų (panašumo į kitų tipų ląsteles, kurios irgi aptinkamos kraujagyslių sienelėse, atrankių žymenų stokos) sunku neginčijamai pademonstruoti, kad pericitai ir MSC – vienas ir tas pats ląstelių tipas (Armulik ir kt., 2011).

Pastaruoju metu susidomėta pericitų reikšme audinių fibrozei. Fibrozė – tai patologinis jungiamojo audinio išvešėjimas ir randėjimas (paprastai dėl lėtinio uždegimo ar kitokių pažeidimų) (apžvelgta Wynn, 2008). Fibrozės eigai labai svarbūs miofibroblastai – į fibroblastus panašios ląstelės, kurios fibrozės metu aktyvinamos, proliferuoja ir gamina patologinio tarpląstelinio užpildo komponentus. Manoma, kad bent tam tikrais atvejais miofibroblastai išsivysto iš pericitų (Armulik ir kt., 2011; Kida ir Duffield, 2011). Pvz., inkstų fibrozės modelyje miofibroblastai išsivystė bent iš dalies iš pericitų, kurie migravo nuo kapiliarų gilyn į audinį (Lin ir kt., 2008; Schrimpf ir kt., 2012). Panašūs duomenys gauti tiriant kepenų ir sisteminės sklerodermijos (Armulik ir kt., 2011), bet ne plaučių miofibroblastus (Rock ir kt., 2011). Jei iš tiesų miofibroblastai – tai transdiferenciuotieji pericitai, veiksniai, stiprinantys endotelio ląstelių ir pericitų

sąveikas ir slopinantys pericitų transdiferenciaciją galėtų būti panaudoti fibrozinėms ligoms gydyti (Lin ir kt., 2011).

Kadangi pericitai tokie svarbūs kraujagyslių stabilumui, domimasi, kaip jie susiję su angiogeninių ir išeminių ligų patologija, ir ar jie galėtų tapti naujų gydymo metodų taikiniai. Ypač daug apie pericitus kaip naujų vaistų taikinį diskutuojama kalbant apie vėžį. Kad navikas galėtų augti, jam būtinos maisto medžiagos ir deguonis. Naviko ląstelės sintezuoja ir išskiria angiogeninius veiksnius, kurie skatina kraujagysles augti gilyn į naviką, ir taip užtikrina maisto medžiagų ir deguonies tiekimą (Folkman, 1971). Pastaruoju metu bandoma sukurti vaistus, kurie nuslopintų šį procesą ir taip sustabdytų naviko vystymąsi. Pagrindinis tokių vaistų taikinytis kol kas buvo VEGF-A signalinis kelias. Deja, klinikiniai tyrimai parodė, kad VEGF-A signalinį kelią slopinantys vaistai vėžiu sergantiems pacientams nelabai tepadeda (Kerbel, 2008). Iškelta hipotezė, kad, kaip pastebėta priešklinikiniuose modeliuose (Benjamin ir kt., 1999), dalis naviko kraujagyslių yra padengtos pericitais ir todėl nejautrios VEGF slopinimui. Todėl pasiūlyta VEGF-A signalinį kelią slopinančius vaistus derinti su vaistais, kurie trukdytų pericitų ir endotelio ląstelių sąveikoms (Bergers ir kt., 2003). Deja, paaiškėjo, kad ši taktika nėra veiksminga (Hainsworth ir kt., 2007; Sennino ir kt., 2007; Nisancioglu ir kt., 2010). Navikai nesumažėjo, o be to, pericitų trūkumas eksperimentiškai susietas su naviko polinkiu metastazuoti (Yonenaga ir kt., 2005; Xian ir kt., 2006; Cooke ir kt., 2012).

Dėl minėtų nesėkmių pastaruoju metu populiarėja iš esmės priešingas požiūris, kad reikia ne naikinti naviko kraujagysles, o jas „normalizuoti“ (Jain, 2001; apžvelgta Carmeliet ir Jain, 2011b; Goel ir kt., 2011). Šis požiūris pagrįstas pastebėjimu, kad naviko kraujagyslės skiriasi nuo normalių audinių kraujagyslių: jos ne tik prastai padengtos pericitais, bet dar ir netvarkingos struktūros, chaotiškai išsidėsčiusios, laidžios, prastai aprūpina naviką krauju. Manoma, kad dėl prastos kraujotakos išsivystanti hipoksija, mažas pH ir aukštas tarpląstelinio skysčio slėgis skatina piktybinių ląstelių atranką ir metastazavimą. Be to, dėl

prastos auglio kraujotakos į jį sunkiai patenka vaistai ir imuninės sistemos ląstelės. Manoma, kad normalizavus naviko kraujagysles, navikas lėčiau metastazuotų, o be to, būtų jautresnis chemoterapijai ir radiacijai (Carmeliet ir Jain, 2011b; Goel ir kt., 2011).

Atsižvelgiant į pericitų svarbą kraujagyslių stabilumui ir pericitų trūkumą bei anomalijas navikuose, galima manyti, kad viena iš navikų kraujagyslių „nenormalumo“ priežasčių yra pericitų trūkumas (Armulik ir kt., 2011). Visgi į šią hipotezę reikia žiūrėti atsargiai: nors pericitų trūkumas, naviko kraujagyslių anomalijos ir polinkis metastazuoti koreliuoja, priežastiniai ryšiai tarp šių reiškinių neaiškūs ir, ko gero, gan sudėtingi (Armulik ir kt., 2011; Carmeliet ir Jain, 2011b). Minėtina, kad auglio kraujagysles galima normalizuoti keliais būdais: nuslopinus ANG-2 signalinį kelią (Falcón ir kt., 2009; Nasarre ir kt., 2009), sumažinus vėžinių ląstelių NO sintazių aktyvumą ir taip atkūrus normalų NO gradientą (Kashiwagi ir kt., 2008) arba (laikinas normalizavimas) nuslopinus VEGF-A signalinį kelią (Goel ir kt., 2011). Visos šios priemonės padidina kraujagyslių pericitų dangos tankį ir / arba subrendusių pericitų žymenų raišką. Be to, kaip viena iš pericitų trūkumo navikuose priežasčių minimas augimo veiksnių, ypač VEGF-A, perteklius, nes VEGF-A neigiamai valdo kraujagyslių padengimą pericitais (Greenberg ir kt., 2008; Cao ir kt., 2010). Beje, naviko kraujagysles galima stabilizuoti ir kitokiais, iš pažiūros su pericitais nesusijusiais, metodais (Carmeliet ir Jain, 2011b).

Iš kitų su pericitais siejamų ligų verta paminėti diabetinę retinopatiją (DR). Tai diabeto komplikacija, kuria serga maždaug trečdalis diabetikų ir kuri daugelyje šalių yra pagrindinė darbingo amžiaus žmonių aklumo priežastis (Cheung ir kt., 2010). Skiriamos dvi šios ligos stadijos: neproliferacinė (pastebimos tinklainės kapiliarų ir nervinio audinio pažaidos; paprastai simptomų nėra) ir proliferacinė (prasideda naujų, patologinių kraujagyslių augimas; regėjimas pablogėja). Pirmieji pastebimi morfologiniai pokyčiai DR susirgusio paciento tinklainėje yra pericitų apoptozė / atšoka nuo kraujagyslių, sustorėjusi

pamatinė lamina, mikroaneurizmos ir taškinės kraujosrūvos (apžvelgta Frank, 2004). Vėliau pastebimi užsikimšę kapiliarai ir tuščios pamatinės laminos „rankovės“ – buvę kapiliarai. Manoma, kad kapiliarų disfunkcija sukelia tinklainės hipoksiją, ir kaip atsakas į ją prasideda kompensacinė angiogenezė ir fibrozė, galinti atplėšti tinklainę nuo akies dugno (Frank, 2004; Cheung ir kt., 2010). Dar viena diabeto pažeistų tinklainės kraujagyslių savybė yra padidėjęs laidumas, kartais sukeliantis ypač regėjimui kenkiančią makulos edemą. Kadangi pericitų atšoka yra vienas pirmųjų šios ligos požymių, ir kadangi kitos kapiliarų anomalijos panašios į būdingas pelėms, kurioms trūksta pericitų, galima manyti, kad diabetas pažeidžia pericitus, o pericitų žūtis skatina endotelio disfunkciją (Frank, 2004; Willard ir Herman, 2012). Žiurkių diabeto modelyje parodyta, kad pericitų atšokai labai svarbus ANG-2 (Hammes ir kt., 2004). Žiurkėms su išveiklinta viena *Ang2* geno kopija diabetas nesukėlė pericitų atšokos, ir tokių žiurkių tinklainėse pastebėta mažiau tuščių pamatinės laminos „rankovių“. Taigi, išsiaiškinę, kaip diabetas pažeidžia pericitus, arba išmokę stabilizuoti pericitų netekusias kraujagysles, galbūt galėsime apsaugoti tinklainę nuo tolimesnių pažeidimų.

Pabaigai verta trumpai aptarti pericitų reikšmę terapinei angiogenezei. Terapinė angiogenezė – tai naujų kraujagyslių augimo skatinimas angiogeniniais veiksniais, siekiant pagerinti kraujotaką išeminiuose audiniuose, pvz., širdies raumenyje, negaunančiame pakankamai kraujo dėl aterosklerozės. Naujų kraujagyslių augimą galima sukelti suleidus VEGF-A baltymo arba vektoriaus, koduojančio VEGF-A (arba kitokį angiogeninį veiksnį) (apžvelgta Lassaletta ir kt., 2011). Deja, VEGF-A indukuotos kraujagyslės yra netvarkingos ir laidžios, be to, greitai regresuoja (Reginato ir kt., 2011). Manoma, kad terapinė angiogenezė būtų sėkmingesnė, jei būtų ne tik skatinamas kraujagyslių augimas, bet jos būtų stabilizuojamos (Frontini ir kt., 2011; Reginato ir kt., 2011; Banfi ir kt., 2012). Kraujagysles stabilizuoti galima skatinant jų padengimą pericitais / VSMC. Šios taktikos efektyvumas pademonstruotas pelių modeliuose. Pericitų pirmtakų

injekcija į išeminį širdies raumenį paskatino naujų kraujagyslių augimą, sumažino kraujagyslių laidumą ir pagerino širdies darbą (Katare ir kt., 2011). VEGF-A raiška kartu su PDGF-B raiška nuo to paties bicistroninio vektoriaus sukėlė naujų kraujagyslių augimą galūnėse. Be to, kitaip nei kraujagyslės, indukuotos vien VEGF-A, šios kraujagyslės buvo padengtos pericitais, normalios struktūros ir pagerino raumens kraujotaką (Banfi ir kt., 2012). Naujų kraujagyslių augimą galima sukelti ir FGF2 injekcija. FGF9 injekcija kartu su FGF2 pagerino naujų kraujagyslių padengimą VSMC (Frontini ir kt., 2011). Šios kraujagyslės taip pat buvo funkcionalesnės ir lėčiau regresavo. Manoma, kad FGF9 veikė didindamas PDGFR β raišką (Frontini ir kt., 2011). Šie ir kiti eksperimentai su pelėmis leidžia manyti, kad pericitų pritraukimas galėtų pagerinti terapinės angiogenezės efektyvumą pacientuose (Reginato ir kt., 2011).

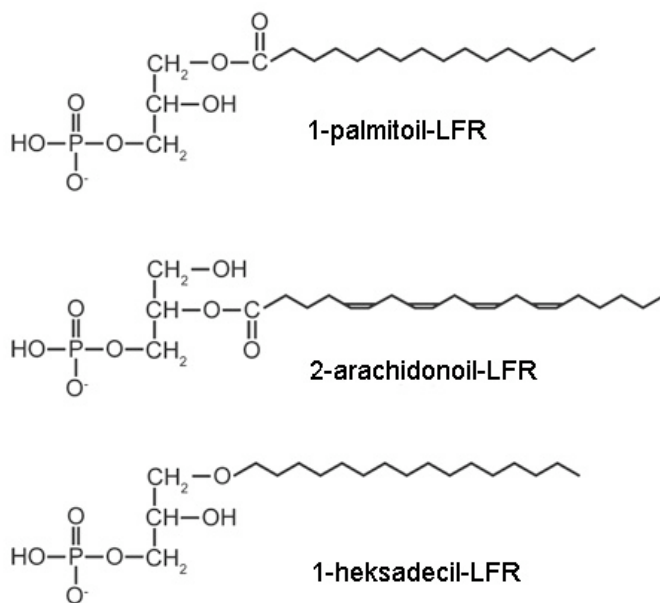
1.2 AUTOTAKSINO IR LIZOFOSFATIDO RŪGŠTIES SIGNALINIO KELIO REIKŠMĖ KRAUJAGYSLIŲ VYSTYMUISI IR FUNKCIJOMS

1.2.1 Lizofosfatido rūgštis

Lizofosfatido rūgštis (LFR) arba, tiksliau, rūgštys – tai terminas, vartojamas apibrėžti glicerofosfolipidams, prie kurių glicerolio *sn*-1 arba *sn*-2 padėties prijungta riebalų rūgštis (monoacilglicerolio-3-fosfatai) arba alkoholis (monoalkilglicerolio-3-fosfatai, monoalkenilglicerolio-3-fosfatai; paprastai *sn*-1) (1.6 pav.). Gamtoje labiau paplitę monoacilglicerolio-3-fosfatai (Moolenaar ir Hla, 2012). Jie skiriasi riebalų rūgšties padėtimi, grandinės ilgiu ir dvigubųjų ryšių skaičiumi. Žmogaus kraujo plazmoje, pvz., daugiausia yra 1-acilglicerolio-3-fosfatų su C18:2, C20:4, C18:1, C16:0, C22:6 ir C18:0 riebalų rūgščių liekanomis (Baker ir kt., 2001; Shan ir kt., 2008; apžvelgta Smyth ir kt., 2008). Nors riebalų rūgšties liekanos prigimtis ir padėtis turi įtakos jungimuisi prie LFR receptorių ir todėl greičiausiai ir biologiniam aktyvumui (Yanagida ir kt., 2009; Hama ir Aoki, 2010), daugelyje darbų tikslus cheminis junginys neakcentuojamas. Kur

nenurodyta kitaip, toliau tekste LFR vadinsime monoacilglicerolio-3-fosfatus, kaip įprasta literatūroje.

LFR yra tarpinis glicerofosfolipidų biosintezės produktas, o taip pat svarbi signalinė molekulė. Iki šiol atrasti šeši LFR receptoriai, LPA₁₋₆ (apžvelgta Lin ir kt., 2010). Tai membraniniai su G baltymais susiję receptoriai. LFR prisijungus prie receptoriaus 1) G α_i baltymas gali aktyvinti Ras – Raf – MEK – ERK signalinį kelią ir taip paskatinti ląstelių proliferaciją; 2) G α_i gali aktyvinti fosfatidilinozitolio 3-kinazę ir skatinti išgyvenimą; 3) G $\alpha_{12/13}$ gali aktyvinti RhoA, o 4) G α_i – Rac ir taip valdyti ląstelės griaučių pertvarką bei ląstelės migraciją, ir kt. (apžvelgta Lin ir kt., 2010; Houben ir Moolenaar, 2011). Kurie konkrečiai signaliniai keliai bus aktyvinti ir koks bus jų aktyvinimo rezultatas, priklauso nuo receptoriaus tipo ir ląstelių aplinkos (Houben ir Moolenaar, 2011).



1.6 pav. Lizofosfatido rūgštys.

1-palmitoil-LFR, 2-arachidonoil-LFR ir 1-heksadecil-LFR yra atitinkamai 1-acil-, 2-acil- ir 1-alkil-LFR pavyzdžiai. (Yanagida ir Ishii, 2011).

LFR aptinkama daugelyje organizmo skysčių (Tokumura, 2002; Tanaka ir kt., 2004). Sveiko žmogaus kraujo plazmoje jos koncentracija yra apie 0,1 – 1 μ M. Kraujo serume LFR yra daugiau nei plazmoje, nes LFR gaminama kraujui krešant (apžvelgta Smyth ir kt., 2008). Plazmos LFR suriša baltymai: pvz., albuminas, gelsolinas (Morris ir kt., 2009). Kraujo plazmos LFR gamina fermentas autotaksinas (ATX). Autotaksino vaidmuo patvirtintas išveiklinus jo geną pelėse:

heterozigotinių pelių kraujo plazmoje LFR koncentracija sumažėjo apie 50% (Tanaka ir kt., 2006; van Meeteren ir kt., 2006). Be to, pelių, kurių ATX raiška buvo padidėjusi, kraujo plazmoje LFR buvo daugiau (Pamuklar ir kt., 2009). Apie autotaksiną daugiau žiūr. kitame skyrelyje, o kol kas verta paminėti, kad LFR, tiek aptinkamą ląstelės viduje, tiek ir už jos ribų, tam tikromis sąlygomis gali gaminti ir kiti fermentai. Pvz., uždegimo metu už ląstelės ribų aptinkamą LFR iš fosfatido rūgšties gali gaminti sekretuojamoji fosfolipazė A2 (Fourcade ir kt., 1995). Kiaušidžių vėžio ląstelėse už ląstelių ribų aptinkamą LFR gali gaminti nuo kalcio nepriklausoma indukuojamoji fosfolipazė A2 (Zhao ir kt., 2006). Plaukų svogūnėliuose keratinocitų membraninė fosfolipazė A1 (PA-PLA_{1α}) gamina 2-acil LFR, kuri jungiasi prie LFR receptoriaus LPA₆; šis signalinis kelias svarbus plaukų svogūnėlių vystymuisi (Inoue ir kt., 2011).

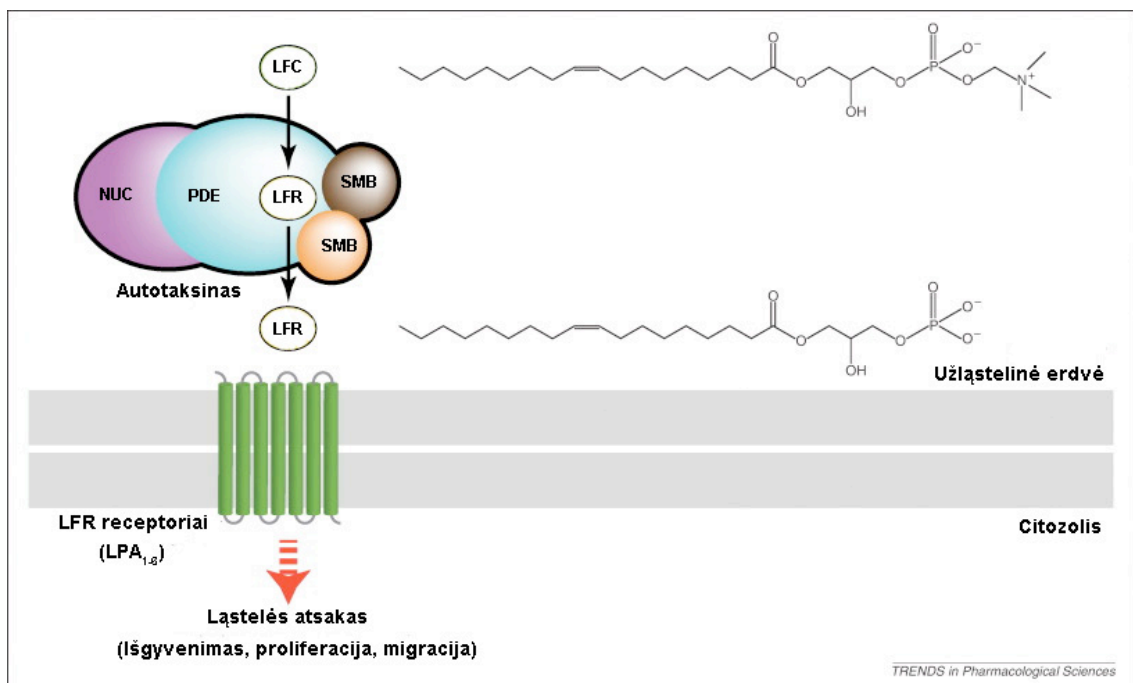
1.2.2 Autotaksinas

Autotaksinas pirmiausia identifikuotas kaip melanomos ląstelių gaminamas veiksnys, skatinantis jų pačių migraciją (Stracke ir kt., 1992), tačiau kaip jis skatino migraciją tuo metu nebuvo žinoma. Vėliau parodyta, kad ATX – tai ne kas kita, kaip jau anksčiau aprašytoji (Tokumura ir kt., 1986) kraujo plazmos lizofosfolipazė D (Tokumura ir kt., 2002; Umezu-Goto ir kt., 2002). Jos fiziologiniai substratai yra lizofosfolipidai (lizofosfatidilcholinas (LFC), lizofosfatidilserinas, lizofosfatidiletanolaminas), nuo kurių ATX atskelia polinę „galvutės“ grupę (Nakanaga ir kt., 2010). Reakcijos produktas – lizofosfatido rūgštis (1.7 pav.). LFC daug kraujo plazmoje, ir todėl jis laikomas pagrindiniu fiziologiniu ATX substratu (Aoki ir kt., 2002; Samadi ir kt., 2011).

Pagal aminorūgščių seką ATX priskirtas NPP (ektonukleotidų pirofosfatazių / fosfodiesterazių) šeimai ir dar vadinamas NPP2 arba ENPP2. ATX iš tiesų geba katalizuoti nukleotidų hidrolizę *in vitro* (Murata ir kt., 1994), nors nukleotidai, kaip minėta, nėra fiziologinis jo substratas. ATX yra sekretuojamas (Jansen ir kt., 2005) N glikozilintas (Jansen ir kt., 2007) baltymas.

Jis sudarytas iš keleto domenų: jo N gale yra du SMB (panašūs į somatomediną B) domenai, po kurių seka katalizinis fosfodiesterazės (PDE) domenas, o už jo, C gale, - neaktyvus į neatrankias endonukleazės panašus NUC domenas (1.7 pav.) (apžvelgta Moolenaar ir Perrakis, 2011; Nishimasu ir kt., 2012). Visi domenai būtini ATX kataliziniam aktyvumui (Nakanaga ir kt., 2010). SMB domenai sąveikauja su integriniais (Hausman ir kt., 2011). ATX taip pat gali jungtis prie heparino ir panašių glikozaminoglikanų (Moolenaar ir Perrakis, 2011). Manoma, kad sąveikos su integriniais ir glikozaminoglikanais lemia ATX jungimąsi prie ląstelių paviršiaus ir lokalią LFR gamybą (Fulkerson ir kt., 2011). Taip pat parodyta, kad ATX tam tikrais atvejais gali pasižymėti nuo lizofosfolipazės aktyvumo nepriklausomu biologiniu aktyvumu (Samadi ir kt., 2011; Zhao ir kt., 2011); galbūt tais atvejais būna svarbi sąryša su integriniais (Moolenaar ir Perrakis, 2011).

Neseniai rentgeno struktūrinės analizės būdu nustatyta erdvinė ATX struktūra (pavieniui ir su įvairaus ilgio LFR) (Hausman ir kt., 2011; Nishimasu ir kt., 2011). Paaiškėjo, kad PDE domenas glaudžiai sąveikauja su SMB domenais iš vienos pusės ir su NUC domenu – iš kitos pusės. Šios sąveikos greičiausiai palaiko PDE domeno struktūrą, ir todėl SMB ir NUC domenai svarbūs kataliziniam aktyvumui. PDE domene, arti aktyviojo centro, aptikta gili hidrofobinė kišenė, kurioje ATX kristaluose su LFR įsitaiso riebalų rūgšties grandinė. Manoma, kad ši kišenė svarbi substrato prisijungimui ir kad jos dydis ir forma greičiausiai lemia ATX atrankumą monoacilglicerolio fosfatams (o ne diacilglicerolio fosfatams) ir tam tikroms riebalų rūgščių liekanoms. Aktyviajame centre greta kataliziniam aktyvumui būtino Thr210 aptikti du cinko jonai, koordinaciniais ryšiais sujungti su evoliuciškai konservatyviomis aminorūgščių liekanomis. Greta aktyviojo centro taip pat aptiktas dar vienas hidrofobinis tunelis. Jo vaidmuo neaiškus, bet spėjama, kad per jį iš aktyviojo centro galėtų pasišalinti reakcijos produktas (Hausman ir kt., 2011; Nishimasu ir kt., 2011).



1.7 pav. Autotaksino – LFR signalinis kelias.

ATX hidrolizuoja LFC į LFR (ir choliną; nepavaizduota). LFR jungiasi prie savo receptorių ląstelės membranoje ir juos aktyvina. (Nishimasu ir kt., 2012).

Remiantis šiais ir kitais ATX enzimologijos, mutagenzės ir struktūrinės analizės tyrimų rezultatais, pasiūlytas toks šio fermento veikimo modelis: 1) ATX jungiasi prie ląstelių paviršiaus sąveikaudamas su integriniais; 2) prie fermento aktyviojo centro prisijungia substratas (pvz., LFC; substrato riebalų rūgšties grandinė įsiterpia į hidrofobinę kišenę); 3) substratas paverčiamas produktu LFR (katalizei svarbus nukleofilas Thr210 ir du cinko jonai); 4) LFR pašalinama per hidrofobinį tunelį, galbūt tiesiai receptoriui „į glėbį“ (Moolenaar ir Perrakis, 2011; Nishimasu ir kt., 2012). Minėtina, kad fermento aktyvumas reguliuojamas neigiamojo grįžtamojo ryšio kilpa: jį slopina LFR ir kitas panašios struktūros lipidas sfingozino-1-fosfatas (S1F) (van Meeteren ir kt., 2005).

ATX koduoja *ENPP2* genas. Žmogaus ir pelės geno struktūra labai panaši; jis sudarytas iš 27 egzonų (Giganti ir kt., 2008). Nustatytos penkios dėl

alternatyvaus splaisingo atsirandančios izoformos – α , β , γ , δ ir ϵ (Giganti ir kt., 2008; Hashimoto ir kt., 2012). β ir δ yra pagrindinės ATX izoformos *in vivo*; skirtinguose organizmuose ir skirtinguose audiniuose skiriasi jų raiška, bet biologinis aktyvumas panašus (Hashimoto ir kt., 2012).

1.2.3 Fosfolipidų fosfatazės

Parodyta, kad suleidus pelėms į kraują ATX slopiklio, kraujyje esanti LFR degraduojama (puslaikis apie 3 min.) ir kad ATX aktyvumas būtinas pastoviai jos koncentracijai palaikyti (Albers ir kt., 2010). Geriausiai ištirti už ląstelių ribų aptinkamos LFR hidrolizę katalizuojantys fermentai yra fosfolipidų fosfatazės (LPP, angl. *lipid phosphate phosphatases*). Žinduoliai turi tris LPP genus: *PPAP2A*, kuris koduoja LPP1, *PPAP2C*, kuris koduoja LPP2, ir *PPAP2B*, koduojanti LPP3. Taip pat aptikta kataliziškai aktyvi LPP1a izoforma, atsirandanti dėl *PPAP2A* alternatyvaus splaisingo (apžvelgta Brindley, 2004; Pyne ir kt., 2004; Brindley ir Pilquill, 2009). LPP yra glikozilinti integraliniai membranos baltymai. Jie greičiausiai turi šešis transmembraninius segmentus, o kataliziniam aktyvumui svarbios evoliuciškai konservatyvios aminorūgštys išsidėsčiusios kilpose tarp 3 – 4 ir 5 – 6 segmentų (Zhang ir kt., 2000). Aktyvusis centras nukreiptas į ląstelės išorę (kai LPP yra ląstelės išorinėje membranoje) arba į viduląstelių membranių organelių (pvz., endoplazminio tinklo) vidų. LPP *in vitro* geba defosforilinti įvairius fosfolipidus, bet *in vivo* jų pagrindiniai substratai greičiausiai yra LFR ir S1F (Brindley, 2004; Pyne ir kt., 2004; Samadi ir kt., 2011). Reakcijos produktai atitinkamai yra monoacilglicerolis (MAG) ir sfingozinas.

LPP1 ir LPP3 reikšmė už ląstelių ribų aptinkamos LFR defosforilinimui įrodyta šiais *in vitro* eksperimentais: 1) padidinus LPP raišką įvairių tipų ląstelėse, terpėje buvusi žymėta LFR buvo skaidoma sparčiau (LPP1: Jasinska ir kt., 1999; Smyth ir kt., 2003; Zhao ir kt., 2005; Morris ir kt., 2006; LPP3: Tanyi ir kt., 2003; Morris ir kt., 2006); 2) sumažinus LPP raišką įvairių tipų ląstelėse, žymėta LFR buvo hidrolizuojama lėčiau (LPP1: Morris ir kt., 2006; LPP3: Escalante-Alcalde ir

kt., 2003). LPP1 vaidmuo patvirtintas ir *in vivo*: pelių, kurių LPP1 raiška buvo sumažinta, audinių geba defosforilinti žymėtą LFR buvo silpnesnė, kraujo plazmoje buvo maždaug 30% daugiau LFR, o žymėtos LFR, suleistos į kraujotaką, išnykimo puslaikis pailgėjo nuo 3 min. iki 12 min. (Tomsig ir kt., 2009). Tačiau svarbu paminėti, kad pelių, kurių LPP1 raiška buvo padidinta, kraujo plazmos LFR koncentracija nepasikeitė (Yue ir kt., 2004). Parodyta, kad LPP3 *in vivo* valdo S1F signalinį kelią (López-Juárez ir kt., 2011; Bréart ir kt., 2011). Ar ji *in vivo* taip pat hidrolizuoja LFR, kol kas nežinoma. Apie LPP2 kaip apie fosfolipidų fosfatazė žinoma labai nedaug. Ji identifikuota pagal sekos panašumą į LPP1 ir LPP3 (Roberts ir kt., 1998). Parodyta, kad ląstelių, kuriose buvo dirbtinai indukuota LPP2 raiška, ekstraktai greičiau defosforilina įvairius fosfolipidus (Roberts ir kt., 1998; Morris ir kt., 2006), tačiau nesuardytoms ląstelėms greitesnis į terpę pripiltų fosfolipidų defosforilinimas nebūdingas (Morris ir kt., 2006).

Kokia už ląstelės ribų aptinkamos LFR defosforilinimo biologinė prasmė? Kadangi defosforilinus LFR susidaręs MAG nebegali aktyvinti LFR receptorių, manoma, kad LPP reikalingos „išjungti“ LFR perduodamam signalui (Morris ir kt., 2009). Kartu su ląstelių jautrumo LFR mažinimu, nujautrinus ir internalizavus receptorių, LFR koncentracijos ląstelės aplinkoje mažinimas slopina ir / arba sustabdo LFR biologinį poveikį (van Meeteren ir Moolenaar, 2007; Morris ir kt., 2009).

Be LPP, aprašyta ir kitokių fosfatazių, kurios defosforilina LFR. Pvz., prostatos rūgštinė fosfatazė yra sekretuojamoji fosfatazė, defosforilianti LFR už ląstelių ribų (Tanaka ir kt., 2004). LFR ląstelės viduje defosforilina fosfatazės, kurios kitaip nei LPP yra jautrios N-etilmaleimidui, ir kurių aktyvumui būtini magnio jonai (Brindley, 2004).

1.2.4 ATX – LFR signalinio kelio funkcijos

Kaip jau minėta, LFR aptinkama daugelyje organizmo skysčių. Be to, daugeliui audinių ir ląstelių būdinga LFR receptorių, LPP ir ATX raiška. Todėl nenuostabu, kad ATX – LFR – LFR receptorių signaliniam keliui priskirta daug biologinių (ir patologinių) funkcijų. Trumpai paminėsime geriausiai ištirtas, ir daugiau pasigilinsime į ATX ir LFR vaidmenį augant ir funkcionuojant kraujagyslėms.

LFR yra svarbi normaliam nervų sistemos vystymuisi ir funkcionavimui. Embriono vystymosi metu ATX raiška pirmiausia pastebima nerviniame audinyje (Bächner ir kt., 1999). Pelės su išveiklintu *Enpp2* genu gaišta dar negimusios, ir vienas iš pagrindinių jų vystymosi defektų - nenormalus nervinio vamzdelio formavimas (Tanaka ir kt., 2006; van Meeteren ir kt., 2006; Koike ir kt., 2011). Parodyta, kad LFR keičia neuronų formą ir valdo jų šakojimąsi (apžvelgta van Meeteren ir Moolenaar, 2007; Furuta ir kt., 2012). LFR taip pat susijusi su nervų sistemos patologijomis – manoma, kad ji gali prisidėti vystantis vaisiaus smegenų vandenei (Yung ir kt., 2011) ir neuropatiniam skausmui (apžvelgta Ueda, 2011).

ATX ir LFR yra svarbūs riebalinio audinio vystymuisi. Adipocitai išskiria ATX, kuris gamina LFR, kuri skatina adipocitų proliferaciją ir slopina diferenciaciją (Ferry ir kt., 2003). Pelės, kurių ATX raiška ir LFR koncentracija kraujo plazmoje padidėjusi, šeriamos riebiu pašaru nutuko greičiau (Federico ir kt., 2012). Kita vertus, išveiklinus *Enpp2* geną pelių adipocituose parodyta, kad tokios pelės taip pat linkusios tukti (Dusaulcy ir kt., 2011). Ar iš esmės priešingus šių darbų rezultatus lėmė techninės priežastys, ar skirtingas plazmos ATX ir adipocitų gaminamo ATX vaidmuo, neaišku.

ATX taip pat siejamas su artrito vystymusi (ir galbūt su kai kuriomis kitomis uždegiminėmis / autoimuninėmis ligomis). Parodyta, kad artritu sergančių pelių sąnariuose (tiksliau, sinoviniuose fibroblastuose) yra padidėjusi ATX raiška (Nikitopolou ir kt., 2012). Daugiau ATX aptikta ir artritu sergančių žmonių kraujo

serume. Pelių modelio atveju *Enpp2* išveiklinimas pagerino sąnarių būklę (Nikitopolou ir kt., 2012).

Ypač daug duomenų sukaupta apie ATX ir LFR reikšmę vėžio patogenezei (apžvelgta Houben ir Moolenaar, 2011; Gotoh ir kt., 2012). Daugeliui vėžinių ląstelių linijų būdinga didelė ATX raiška. Tam tikruose navikuose (tiek pelių vėžio modeliuose, tiek ir žmonių navikuose) taip pat daug ATX, LFR ir didelė LFR receptorių raiška. Kraujo serumo ATX koncentracija koreliuoja su folikulinės limfomos ligos sunkumu ir prognoze. Be to, kasos vėžiu sergančių pacientų serume daugiau ATX (Houben ir Moolenaar, 2011). *ENPP2* yra vienas iš 64 genų, kurių raiška koreliuoja su maža plaučių vėžiu sergančių žmonių išgyvenimo tikimybe (Lu ir kt., 2006). Didelė LPA₁ receptoriaus raiška krūties vėžio ląstelėse koreliuoja su geba metastazuoti (David ir kt., 2012). Priežastiniai ryšiai tarp ATX / LFR ir vėžio patogenezės pademonstruoti pelių modeliuose: suleidus pelėms transformuotų ląstelių, kuriose ATX raiška buvo padidinta, navikai augo greičiau ir dažniau metastazavo (Nam ir kt., 2000). Kataliziškai neaktyvus ATX (su Thr210 mutacija) tokiu poveikiu nepasižymėjo. Padidinta LFR receptorių raiška krūties ir kiaušidžių vėžio ląstelėse taip pat skatino navikų augimą ir metastazavimą, o receptorių genų išveiklinimo poveikis buvo priešingas (Houben ir Moolenaar, 2011). ATX arba LPA₁₋₃ raiška nuo MMTV viruso promotoriaus pelės pieno liaukoje sukėlė agresyvių, metastazuoti linkusių navikų augimą (S. Liu ir kt., 2009). LPA₂ neturinčios pelės buvo labiau atsparios cheminių toksinų sukeltam žarnyno vėžiui (Lin ir kt., 2009). Taigi, eksperimentiniai duomenys liudija, kad ATX / LFR skatina navikų augimą ir metastazavimą. Koks LFR poveikio molekulinis mechanizmas, neaišku, bet manoma, kad jis susijęs su LFR geba skatinti ląstelių proliferaciją ir migraciją (Samadi ir kt., 2011). Minėtina, kad ATX ir LFR receptorių slopikliai mažino metastazių skaičių, pirminio naviko agresyvumą ir, kai kuriais atvejais, pirminio naviko augimo greitį pelių vėžio modeliuose (Gotoh ir kt., 2012). Tiesa, LPA₆ receptorius, atrodo, veikia priešingai nei kiti – kaip vėžio supresorius. Funkcijos

praradimą lemiančios mutacijos šio receptoriaus gene siejamos su paveldimu šlapimo pūslės vėžiu (Houben ir Moolenaar, 2011).

1.2.5 ATX – LFR signalinio kelio reikšmė kraujagyslių augimui, regresijai ir funkcijoms

Kaip jau minėta, kraujo plazmoje ir ypač serume yra nemažai LFR. LFR receptorių aptikta beveik visose kraujagysles sudarančiose ir jomis cirkuliuojančiose ląstelėse (Morris ir kt., 2009). Turimi duomenys rodo, kad ATX / LFR yra svarbūs įvairiems su kraujagyslėmis susijusiems fiziologiniams ir patologiniams procesams.

Parodyta, kad ATX / LFR veikia kraujagyslių tinklo morfogenezę. Viena, pelės su išveiklintu *Enpp2* genu nugaišo 9,5 – 10,5 embriono vystymosi dieną, ir be jau minėtų nervinio vamzdelio defektų, jose pastebėti dideli kraujagyslių defektai (Tanaka ir kt., 2006; van Meeteren ir kt., 2006). Nors endotelio ląstelės diferencijavo normaliai, trynio maišelyje trūko kraujagyslių, o paties embriono audiniuose jos buvo išsiplėtusios, netvarkingos struktūros. Panašūs rezultatai gauti išveiklinus zebražuvių ATX koduojantį geną – jų segmentinės arterijos sustojo augti pusiaukelėje ir neteisingai susijungė su gretimomis kraujagyslėmis (Yukiura ir kt., 2011). Tai sulėtino kraujo tėkmę ir sukėlė edemą. Panašus fenotipas pastebėtas kartu išveiklinus zebražuvių LPA₁ ir LPA₄ receptorius (Yukiura ir kt., 2011). Minėtina, kad nors dauguma pelių su išveiklintu LPA₄ koduojančiu genu išgyveno iki brandos, dalis jų irgi turėjo kraujagyslių ir limfagyslių anomalijų – joms buvo būdingos poodinės kraujosrūvos, edema; kraujagyslės ir limfagyslės buvo išsiplėtusios; pericitų danga buvo reta (Sumida ir kt., 2010). Nedidelei daliai pelių su išveiklintu LPA₁ receptoriaus genu buvo būdingos galvos srities hematomos (Contos ir kt., 2000). Pelėse LPA₁ ir LPA₄ kartu išveiklinti kol kas nebuvo. Taip pat verta pastebėti, kad pelės, neturinčios LPP3 baltymo, nugaišo maždaug 10,5 embriono vystymosi dieną, ir be kitų defektų jų endotelio ląstelės nesugebėjo suformuoti kapiliarų tinklo (Escalante-Alcalde ir kt., 2003). Tačiau

sunku pasakyti, ar taip atsitiko būtent dėl LFR pertekliaus, nes, be LFR, LPP3 turi ir kitą substratą – S1F. Be to, LPP3 pasižymi ir nuo jos fosfatazinio aktyvumo nepriklausomu poveikiu endotelio ląstelėms (Humtsoe ir kt., 2010).

Taigi, ATX / LFR signalinis kelias svarbus kraujagyslių tinklo formavimui ir / arba brendimui embriono vystymosi metu, tačiau kaip konkrečiai šis signalinis kelias veikia besiformuojančias kraujagysles, nežinoma. Bent jau *in vitro* LFR skatina endotelio ląstelių migraciją (Panetti ir kt., 2000) ir kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir migraciją (Smyth ir kt., 2008). Vienas iš G baltymų, per kuriuos perduodamas LFR signalas, yra G_{13} , o G_{13} koduojančio geno išveiklinimo fenotipas labai panašus į *Enpp2* išveiklinimo fenotipą (Offermanns ir kt., 1997). Taigi, ATX poveikio besiformuojančioms kraujagyslėms paprasčiausias (bet nebūtinai tikslus ir teisingas) paaiškinimas būtų toks: ATX katalizuoja LFR gamybą, o LFR per savo receptorių ir G_{13} baltymą skatina endotelio ląstelių ir kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių migraciją ir proliferaciją, o tai svarbu kraujagyslių formavimuisi (van Meeteren ir Moolenaar, 2007).

Be embriono kraujagyslių vystymosi stebėjimo genetiškai modifikuotuose organizmuose, ATX / LFR geba valdyti kraujagyslių formavimąsi pademonstruota ir keliuose kituose *in vitro* ir *in vivo* angiogenezės modeliuose. Pvz., ATX skatino žmogaus virkštelės venos endotelio ląsteles formuoti kraujagysles primenančius vamzdelius (Nam ir kt., 2001). Be to, suleidus pelėms transformuotų ląstelių, kurių ATX raiška buvo padidinta, iš jų išaugę navikai buvo didesni ir turėjo daugiau kraujagyslių (Nam ir kt., 2000). Ir atvirkščiai, iš gimdos kaklelio vėžio ląstelių, kurių LPA2 ir LPA3 raiška buvo sumažinta, išaugo mažesni navikai su mažiau kraujagyslių (Chen ir kt., 2012). Tačiau ne visos grupės, tyrusios ATX / LFR įtaką auglių augimui ir metastazavimui, pastebėjo didesnę kraujagyslių tankį (David ir kt., 2012).

Mūsų laboratorijoje parodyta, kad tam tikrais atvejais ATX / LFR gali veikti kaip kraujagyslių regresijos veiksniai. Endotelio ląsteles pasėjus tarp dviejų

kolageno gelio sluoksnių ir užpylus terpės su VEGF-A, ląstelės suformuoja tuščiavidurius, kraujagysles primenančius vamzdelius. Šie vamzdeliai ilgainiui regresuoja, nors kasdien keičiama terpė ir pripilama šviežio VEGF. Parodėme, kad regresuojantys vamzdeliai gamina ATX, ATX gamina LFR, o LFR per savo receptorius endotelio ląstelėse perdavė signalą, sukeltą regresiją (Im ir kt., 2010). Sumažinus ATX raišką endotelio ląstelėse, jos nustojo regresuoti. Taip pat parodėme, kad pelių, kurių ATX raiška padidinta (Pamuklar ir kt., 2009), stiklakūnio kraujagyslės regresavo greičiau (Im ir kt., 2010). Atsižvelgdami į savo ir kitų laboratorijų darbus, manome, kad ATX / LFR patys savaime nėra nei regresijos, nei angiogeniniai veiksniai; jie skatina endotelio ląstelių migraciją, o migracijos pasekmės ir galutinis rezultatas (naujų kraujagyslių augimas, senųjų suirimas) priklauso nuo aplinkos, pvz., kitų veiksnių koncentracijos kraujagyslėje ir greta jos. Taigi, ATX / LFR šiuo metu laikome kraujagyslių aktyvinimo / destabilizavimo veiksniais.

Toliau tirdami ATX / LFR ryšį su kraujagyslių formavimu ir regresija, susidomėjome diabetine retinopatija – diabeto komplikacija, kurios proliferacinei stadijai būdingas patologinių kraujagyslių augimas tinklainėje ir iš tinklainės į stiklakūnį (Cheung ir kt., 2010). Parodėme, kad diabetu sergančių pelių tinklainės kolageno geliuose išaugino kraujagysles, nejautrias LFR regresiniam poveikiui. Be to, ilgesnį laiką auginus žmogaus arba jaučio tinklainės endotelio ląsteles terpėje su didele gliukozės koncentracija, iš jų suformuoti vamzdeliai irgi neberegresavo, nors ir buvo paveikti LFR (Aranda ir kt., 2012). Taip pat parodėme, kad akies stiklakūnyje yra LFR, ir kad ji biologiškai aktyvi: gali sukelti vamzdelių, suformuotų iš endotelinių ląstelių, regresiją *in vitro*. Pacientų, sergančių proliferacine diabetine retinopatija, stiklakūnio LFR prarado biologinį aktyvumą (Aranda ir kt., pateikta spausdinti). Taigi, ATX / LFR ne tik valdo kraujagyslių formavimą ir regresiją fiziologinėmis sąlygomis, bet gali būti svarbūs reguliuojant patologinę angiogenezę.

Be kraujagyslių formavimo ir regresijos, ATX / LFR buvo susieti ir su kitoms kraujagyslių funkcijoms. Viena, jie pasižymi uždegiminiu poveikiu. LFR *in vitro* skatina endotelio ląstelių uždegiminį atsaką – citokinų ir sąlyčio molekulių, kurios gali pritraukti leukocitus ir padėti jiems prisitvirtinti prie endotelio, raišką (Rizza ir kt., 1999). Be to, LFR skatina įvairių imuninės sistemos ląstelių migraciją (Smyth ir kt., 2008). *in vivo* parodyta, kad specializuotos limfmazgių kraujagyslės (HEV, angl. *high endothelial venules*), per kurių sienelės į limfmazgį iš kraujo patenka limfocitai, gamina ypač daug ATX (Kanda ir kt., 2008; Nakasaki ir kt., 2008). LFR veikė tiek endotelio ląsteles, tiek ir limfocitus, ir skatino jų tarpusavio sąveikas (Kanda ir kt., 2008; Nakasaki ir kt., 2008). Suleidus pelėms į kraujotaką kataliziškai neaktyvaus ATX, žymėtų limfocitų skaičius limfmazgiuose sumažėjo (Kanda ir kt., 2008). Remiantis šiais duomenimis, manoma, kad HEV išskiriamas ATX gamina LFR, kuri skatina limfocitų migraciją per kraujagyslės sienelę į limfmazgio vidų.

Esama duomenų, kad LFR gali reguliuoti kraujagyslių spindį ir kraujospūdį (Smyth ir kt., 2008). LFR taip pat keičia kraujagyslių laidumą; vienų autorių duomenimis, LFR stiprina, o kitų – silpnina endotelio barjerines savybes *in vitro* (apžvelgta van Meeteren ir Moolenaar, 2007). Pelių plaučių fibrozės modelyje patologinis kraujagyslių laidumas sumažėjo, išveiklinus LPA₁ koduojantį geną (Tager ir kt., 2008).

Be to, LFR aktyvina žmogaus trombocitus ir skatina jų agregaciją *in vitro*, taigi, gali būti, skatina kraujo krešėjimą (Smyth ir kt., 2008). Minėtina, kad aterosklerozinėse plokštelėse ir oksiduotuose mažo tankio lipoproteinuose (LDL) būna daug LFR (Siess ir kt., 1999). Neseniai parodyta, kad pacientų, sergančių ūminiu koronariniu sindromu, kraujo plazmoje irgi daugiau LFR (Dohi ir kt., 2012). Pasiūlyta hipotezė, kad LFR gali stimuliuoti aterotrombozės vystymąsi, skatindama kraujo krešėjimą (pvz., plyšus aterosklerozinei plokštelei, trombocitams taptų prieinama jos viduje esanti LFR, kuri paskatintų krešulio susidarymą). Be to, kaip jau minėta, LFR pasižymi uždegiminiu poveikiu ir

skatina lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir migraciją, o šie procesai taip pat siejami su aterosklerozės patogenezė (Smyth ir kt., 2008). Minėtina, kad graužikų trombocitų LFR neaktyvina; netgi atvirkščiai - pelių, kurių ATX raiška padidinta, kraujas krešėjo lėčiau (Pamuklar ir kt., 2009).

Taigi, ATX – LFR signalinis kelias svarbus kraujagyslių augimui, regresijai ir funkcijoms, tačiau kaip konkrečiai jis veikia kraujagysles sudarančias ląsteles, vis dar tiriama. Kol kas iš esmės neišku, kaip reguliuojama ATX, LPP ir LFR receptorių raiška; kaip reguliuojamas ATX, LPP ir LFR aktyvumas; kodėl biologiniuose skysčiuose tiek daug LFR, tačiau LFR receptoriai nėra nuolat aktyvinti; ar skiriasi kraujo plazmos LFR ir ląstelės aplinkoje pagamintos LFR vaidmuo; kam reikalingi šeši skirtingi LFR receptoriai, ir kaip integruojami jų signalai; kaip šie signalai gali sukelti tiek skirtingų atsakų ir įtakoti tiek biologinių procesų. Kadangi ATX – LFR signalinis kelias siejamas su nemažai patologinių procesų, pastaruoju metu juo labai domimasi ir klinikiniu požiūriu. Tiek ATX (kraujyje cirkuliuojantis fermentas), tiek ir LFR receptoriai (farmakologų „mėgstami“ su G baltymais susiję receptoriai) yra patogūs vaistų taikiniai. Prasidejusios ATX / LFR slopiklių, veikiančių *in vivo*, paieškos ir gerokai suintensyvėję ATX / LFR biologijos, biochemijos ir patologijos tyrimai artimiausiu metu turėtų pateikti daug įdomių rezultatų.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 MEDŽIAGOS, LAŠTELĖS IR EKSPERIMENTINIAI GYVŪNAI

2.1.1 Reagentai ir tirpalai

Darbe naudoti reagentai buvo pirkti iš Sigma – Aldrich, išskyrus kur nurodyta kitaip.

Lipidai

Eksperimentuose naudota lizofosfatido rūgštis buvo 1-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatas (1-(9Z-oktadecenoil)-*sn*-glicero-3-fosfatas). Eksperimento dieną ji ištirpinta nedideliame tūryje PBS tirpalo su 0,5% jaučio serumo albumino (be riebalų rūgščių) ir prieš pat eksperimentą praskiesta ląstelių auginimo terpe. Koncentruotiems tirpalams ruošti ir saugoti naudoti stikliniai mėgintuvėliai, nes LFR adsorbuojasi prie plastikinių paviršių. Eksperimentuose naudotas lizofosfatidilcholinai buvo 1-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinai. Fosfatido rūgštis buvo 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfatas, paruoštas iš kiaušinio trynio lecitino. Monoacilglicerolis buvo 1-oleoil-*rac*-glicerolis.

Slopikliai

ATX slopiklis HA130 buvo dr. Huib Ovaa (Nyderlandų vėžio institutas) dovana. LFR receptorių slopiklis BrP-LPA pirktas iš Echelon Bioscience. MMP slopiklis GM6001 ir MMP2/9 slopiklis pirkti iš Calbiochem.

Antikūnai

ATX antikūnai imunofermentinei analizei (*Western blot*) buvo dr. Timothy Clair (Valstybiniai sveikatos institutai, JAV) dovana. ATX antikūnus, tinkamus imunohistochemijai, padovanojo dr. Junken Aoki (Tohoku universitetas, Japonija). RasGAP ir PDGFR β antikūnai pagaminti laboratorijoje. LPP1 antikūnai pirkti iš Sigma-Aldrich. LPP2 antikūnai pirkti iš Abgent. LPP3 antikūnai pirkti iš Novus Biologicals. Kolageno IV antikūnai pirkti iš Abcam. NG2 antikūnai pirkti iš Millipore. β -aktino antikūnai, antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų

peroksidaze, ir neimunizuotų gyvūnų IgG (naudoti kaip izotipo kontrolė) pirkti iš Santa Cruz Biotechnology. Antriniai antikūnai, konjuguoti su fluorescenciniais dažais, pirkti iš Jackson Immunoresearch.

Baltymai

Eksperimentuose naudotas VEGF buvo rekombinantinis žmogaus VEGF-A (164 izoforma), gautas iš Valstybinio vėžio instituto (JAV). Koncentruoti VEGF tirpalai ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$) laikyti $+4^\circ\text{C}$ temperatūroje iki 7 dienų, o labiau praskiesti tirpalai iki 24 val.

Rekombinantinis ATX baltymas buvo dr. Timothy Clair (Valstybiniai sveikatos institutai, JAV) dovana.

Tirpalai

PBS – druskų tirpalas. 1 l 10 k. koncentruoto tirpalo ruošiamas iš 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 ir 2,4 g KH_2PO_4 .

HBSS – druskų ir D-gliukozės (5,56 mM) tirpalas, pirktas iš Gibco.

2.1.2 Ląstelės

Visos ląstelės augintos $+37^\circ\text{C}$ temperatūros inkubatoriuje su 5% CO_2 ir vandens vonėle oro drėkinimui. Ląstelės persėtos kas antrą – kas trečią dieną, skiedžiant 1:2 – 1:4. Terpė keista bent kas antrą dieną. Ląstelėms pakelti naudotas 0,25% tripsino tirpalas su 0,9 mmol/l EDTA (Gibco).

Jaučio tinklainės endotelio ląstelės (angl. *bovine retinal endothelial cells*, BREC) išskirtos iš suaugusių karvių ir jaučių akių. Akys buvo gautos iš vietinės skerdyklos, per naktį laikytos $+4^\circ\text{C}$ temperatūroje ir po to 1 val. dezinfekuotos joduoto povidono tirpalu kambario temperatūroje (10% joduoto povidono tirpalas buvo praskiestas PBS santykiu 1:5). Steriliai išpreparuotos tinklainės buvo nuplautos PBS ir švelniai homogenizuotos. Homogenatas mikropipete perkeltas ant membraninio filtro su 90 μm poromis ir keletą kartų perplautas PBS. Ant filtro susikaupę kapiliarų fragmentai perkelti į mėgintuvėlį su 12 ml 0,5% kolagenazės II (Gibco) tirpalu EBM terpėje (Lonza). Inkubuota 45 min. $+37^\circ\text{C}$ vonioje, kas

keletą minučių mėgintuvėlį papurtant. Centrifuguota 10 min. 240 x g pagreičiu, esant +4°C temperatūrai. Nuosėdos suspenduotos 12 ml šviežio kolagenazės II tirpalo ir vėl inkubuota 45 min. +37°C vonioje. Pasibaigus inkubacijai, kolagenazės fermentinis aktyvumas neutralizuotas užpylus 12 ml EBM terpės su 10% arklio serumo (Lonza). Centrifuguota 10 min 240 x g pagreičiu, esant +4°C temperatūrai. Nuosėdos praplautos terpe su serumu. Po centrifugavimo nuosėdos suspenduotos EBM terpėje su 10% arklio serumo, 12 µg/ml jaučio smegenų ekstrakto (Hammond Cell Tech) ir 80 U/ml penicilino – streptomicino tirpalo (Gemini Bio Products) ir perkeltos į plastikines lėkšteles, padengtas jaučio fibronektinu (50 µg/ml). Lėkštelės inkubuotos +37°C temperatūroje per naktį. Kitą dieną lėkštelės triskart praplautos PBS ir ant ląstelių užpilta šviežios terpės. Terpė keista kasdien. Kai ląstelės padengė daugiau nei pusę lėkštelės ploto, jos pakeltos nuo paviršiaus silpnu tripsino ir EDTA tirpalu (0,25% tirpalas buvo 20 kartų praskiestas PBS; inkubuota 2 - 3 min.) ir persėtos į naujas lėkšteles. Toks silpnas tripsino tirpalas nepajėgia nuo paviršiaus atitraukti stipriau prisitvirtinusių kitų tipų ląstelių, todėl kelis kartus šitaip ląsteles persėjus gaunama beveik gryna endotelio ląstelių kultūra. Kultūros grynumas patvirtintas morfologiškai (endotelio ląstelės auga tankiu monosluoksniu, primenančiu grindinį (angl. *cobblestone morphology*)). Be to, >99% ląstelių sąveikavo su fluorescenciškai pažymėtu lektinu IB4-GS (šis lektinas atrankus endotelio ląstelėms) ir <1% ekspresavo NG2 (pericitų žymuo). Po išskyrimo BREC augintos ant fibronektinu padengtų lėkštelių EBM terpėje su 10% arklio serumo, 12 µg/ml jaučio smegenų ekstrakto ir 80 U/ml penicilino – streptomicino. Eksperimentams naudotos devinto - dvylikto pasažų ląstelės.

Jaučio tinklainės pericitai (angl. *bovine retinal pericytes*, BRP) buvo dr. George Davis (Missouri – Columbia universitetas) dovana. Dr. Davis laboratorijoje pericitai iš tinklainių buvo išskirti pagal literatūroje aprašytą protokolą (Nayak ir kt., 1988). Pericitai auginti ant želatina (0,1%) padengtų lėkštelių DMEM terpėje (Gibco) su 1 g/l D-gliukozės, 15% negimusio veršelio

serumo (FBS, Lonza) ir 80 U/ml penicilino – streptomicino tirpalo. >99% ląstelių ekspresavo pericitų žymenį NG2. Eksperimentams naudotos penkto - septinto pasažų ląstelės.

C3H 10T1/2 ląstelės pirktos iš ATCC. Tai C3H pelės embriono fibroblastai. C3H 10T1/2 ląstelės augintos DMEM terpėje su 4,5 g/l D-gliukozės, 10% FBS ir 80 U/ml penicilino – streptomicino tirpalo. Eksperimentams naudotos penkiolikto - dvidešimto pasažų ląstelės.

Žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelės (angl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) pirktos iš Lonza. HUVEC augintos tiekėjo rekomenduojamoje EGM-2 terpėje (Lonza). Galutinė serumo (FBS) koncentracija terpėje buvo 2%. Eksperimentams naudotos penkto - septinto pasažų ląstelės.

Žmogaus smegenų smulkiųjų kraujagyslių pericitai (angl. *human brain microvascular pericytes*, HBVP) pirkti iš ScienCell Research Laboratories. Šie pericitai auginti ant poli-L-lizinu padengtų lėkštelių (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) tiekėjo rekomenduojamoje PM terpėje. Galutinė serumo (FBS) koncentracija terpėje buvo 2%. Eksperimentams naudotos penkto - septinto pasažų ląstelės.

HEK293 (transformuotos žmogaus embriono inkstų) ląstelės augintos DMEM terpėje su 4,5 g/l D-gliukozės, 10% FBS ir 80 U/ml penicilino – streptomicino tirpalo.

293T ląstelės (naudojamos lentivirusų gamybai) gautos iš ATCC. Jos augintos DMEM terpėje su 4,5 g/l D-gliukozės, 10% FBS ir 80 U/ml penicilino – streptomicino tirpalo.

2.1.3 Eksperimentiniai gyvūnai

Visi eksperimentai su pelėmis buvo patvirtinti Schepens akių tyrimų instituto gyvūnų globos komiteto ir atitiko JAV valstybinius standartus.

Enpp2^{F/+} pelės (kamienas – C57Bl/6) buvo gautos iš dr. Wouter H. Moolenaar laboratorijos (van Meeteren ir kt., 2006) (Nyderlandų vėžio institutas).

Tie2-Cre pelės (mišraus kamieno) (Kisanuki ir kt., 2001) buvo gautos iš dr. Yuko Fujiwara (Bostono vaikų ligoninė).

2.2 METODAI

2.2.1 Vamzdelių formavimosi ir regresijos kolageno gelyje tyrimas

Kolageno gelis paruoštas iš jaučio kolageno tirpalo (galutinė koncentracija 2,48 mg/ml, Advanced BioMatrix), 0,02 N NaOH, 20 mM HEPES (Lonza), 2 mg/ml NaHCO₃, 0,5 µg/ml fibronektino, 0,5 µg/ml laminino ir 10,5 mg/ml RPMI terpės miltelių (Gibco). Gelis išpilstytas į plastikinės lėkštelės šulinėlius (po 400 µl, jei lėkštelė 24-ių šulinėlių), ir jam leista sustingti 1 val. +37°C temperatūroje. Ant gelio pasėtos endotelio ląstelės (paprastai 60 tūkst. BREC arba 90 tūkst. HUVEC, jei lėkštelė 24-ių šulinėlių). Tais atvejais, kai formuoti mišrūs vamzdeliai, pericitai arba C3H 10T1/2 ląstelės sėtos ant jau prisitvirtinusių endotelio ląstelių, praėjus 16 valandų po to, kai buvo pasėtos pastarosios. Optimalus pericitų ir C3H 10T1/2 ląstelių skaičius priklausė nuo ląstelių tipo ir buvo nustatytas eksperimentiškai. Kai formuoti mišrūs vamzdeliai, endotelio ląstelių sėta mažiau nei formuojant vamzdelius tik iš endotelio ląstelių, kad bendras pradinis ląstelių skaičius būtų vienodas (išskyrus kur nurodyta kitaip). Dar po 8 val. nusiurbta ląstelių auginimo terpė ir užpiltas antras kolageno gelio sluoksnis (150 µl). Jam leista sustingti. Pasibaigus kolageno polimerizacijai, užpilta ląstelių auginimo terpės su 2,5 ng/ml VEGF-A. Vamzdelių formavimasis ir regresija stebėti invertuotu mikroskopu (Nikon Eclipse TE2000-S). Vamzdelių formavimasis įvertintas praėjus 16 val. po terpės su VEGF užpylimo. Vamzdelių regresija įvertinta praėjus 24 val., 48 val. ir (HUVEC atveju) 72 val. po VEGF poveikio pradžios, išskyrus kur nurodyta kitaip. Terpė kasdien keista šviežia terpe su VEGF.

Kiekybiniai duomenys gauti taip: nufotografuota kiekvieno šulinėlio centrinė dalis (40 k. padidinus). ImageJ vaizdų analizės programa (Valstybiniai sveikatos institutai, JAV) išmatuotas kiekvieno vamzdelio ilgis. Vamzdelių ilgiai susumuoti ir išreikšti mm. Daugelyje eksperimentų vamzdelių ilgių suma 24-ą, 48-ą ir 72-ą valandomis išreikšta procentais, vamzdelių ilgių sumą tame pačiame šulinėlyje 16-ą valandą prilyginus 100%. Apskaičiuotas 3 – 4 šulinėlių vidurkis. Kiekvienas eksperimentas pakartotas bent 3 kartus.

2.2.2 Fluorescencinė mikroskopija

Ląstelių fluorescencinė mikroskopija

Fluorescencinės mikroskopijos eksperimentams ląstelės augintos specialiuose induose, kurių dugnas yra objektinis stiklelis, ir kurių viršutinę dalį pašalinus ląstelės lieka ant objekcinio stiklelio (angl. *chamber slides*). Kur nenurodyta kitaip, dirbta kambario temperatūroje. Nusiurbus auginimo terpę, ląsteles dukart praplautos PBS. Fiksuota 4% paraformaldehido tirpalu PBS (šviežiai paruoštu iš 16% tirpalo, Electron Microscopy Sciences) 30 min. Du kartus praplauta PBS. Ląstelės pralaidintos 0,1% Triton X-100 tirpalu PBS 10 min. Tris kartus praplauta PBS. Po to ant ląstelių užpilta blokavimo tirpalo (1% jaučio serumo albumino, 0,1% Triton X-100, PBS) ir inkubuota 1 val. Pašalinus blokavimo tirpalą, užlašinta pirminių antikūnų (arba lektino), praskiestų blokavimo tirpalu. NG2 antikūnai skiesti 1:200 – 1:400, PDGFRβ antikūnai - 1:1000, IB4-GS lektinas (konjuguotas su fluorescencine žyme, Invitrogen) skiestas 1:250. Ląstelės kontroliniuose šulinėliuose buvo paveiktos to paties izotipo kontroliniais (neimunizuotų gyvūnų) antikūnais. Inkubuota 1 val. kambario temperatūroje arba +4°C temperatūroje per naktį. Dukart praplauta PBS. Užlašinta antrinių antikūnų, konjuguotų su fluorescencinėmis žymėmis (praskiestų blokavimo tirpalu 1:200). Ląstelės, kurios buvo dažytos IB4-GS lektinu, vietoj antrinio antikūno tirpalo buvo paveiktos blokavimo tirpalu. Inkubuota 1 val. Dukart praplauta PBS. Užlašinta sutvirtinimo terpės su branduolių dažu DAPI

(Vector Laboratories). Uždengta dengiamuoju stikleliu. Fluorescencija stebėta Zeiss Axioskop 2 mot plus mikroskopu ir fiksuota AxioCam kamera.

Vamzdelių fluorescencinė mikroskopija

Vamzdeliai formuoti 48-ių šulinėlių lėkštelėje. Šulinėliai 3 k. praplauti +37°C temperatūros HBSS tirpalu. Užpilta 200 µl 1 mg/ml kolagenazės I tirpalo. Inkubuota 10 min. +37°C temperatūroje lėtai supant, kad kolagenazė iš dalies suardytų viršutinį kolageno gelio sluoksnį. Praplauta atšaldytu PBS tirpalu. Vamzdeliai fiksuoti 4% paraformaldehido tirpalu 1 val. +4°C temperatūroje. 3 k. po 15 min. plauta kambario temperatūros PBS. Blokuota ir pralaidinta PBS su 3% pieno miltelių, 0,1% jaučio serumo albumino, 0,5% Triton-X100 ir 1 mM CaCl₂ per naktį +4°C temperatūroje. Kitą dieną antikūnai ir / arba lektinas praskiesti blokavimo tirpalu (NG2 antikūnai skiesti 1:100, IB4-GS lektinas irgi skiestas 1:100) ir užpilti ant vamzdelių. Inkubuota 24 val., esant +4°C temperatūrai. Plauta PBS su 0,1% Triton-X100 3 val., kas pusvalandį keičiant plovimo tirpalą. Antriniai antikūnai praskiesti blokavimo tirpalu 1:200 ir užpilti ant vamzdelių. Inkubuota 24 val., esant +4°C temperatūrai. 2 val. plauta PBS, kas 15 min. keičiant tirpalą. Ant objektinio stiklelio užlašinta tvirtinimo terpės su DAPI. Kolageno gelis su vamzdeliais pincetu iškeltas iš šulinėlio, įmerktas į tvirtinimo terpės lašą ir uždengtas dengiamuoju stikleliu. Fluorescencija stebėta Leica TCS-SP5 konfokaliniu mikroskopu.

2.2.3 Kolageno gelių suardymas baltymų raiškos ir lipidų koncentracijos matavimams

Kolageno geliai suardyti kolagenazės I tirpalu HBSS buferyje (10 mg/ml, maždaug 1/10 gelio tūrio). Inkubuota +37°C temperatūroje 20 - 30 min., kol nebeliko pastebimų gelio gabalėlių. Lipidų (žymėtos fosfatido arba lizofosfatido rūgštis) koncentracijos matavimams toks gelio tirpalas naudotas su ląstelėmis (t.y., ląstelių neatskyrus). Baltymų raiškos matavimui ląsteles reikėjo išskirti iš suardyto kolageno gelio. Tam kolageno gelio tirpalas nucentrifuguotas 5 min.

1000 x g pagreičiu, esant +4°C temperatūrai. Nusėdusios ląstelės dukart praplautos šaltu PBS tirpalu ir suardytos elektroforezės pavyzdžio buferiu (žiūr. sk. 2.2.7).

2.2.4 Mikrosomų frakcijos su rekombinantine LFR aciltransferaze paruošimas

pTrcHisC plazmidinį vektorių su pelės LFR aciltransferazės geno kDNR seka padovanojo dr. Kazuhiko Kume iš Tokijo universiteto (Kume ir Shimizu, 1997). Šis vektorius buvo cheminės transformacijos metodu įvestas į kompetentines *Escherichia coli* bakterijas (DH5α). Transformantai atrinkti pagal atsparumą karbenicilinui (Gemini Bio Products). Viena transformantų kolonija perkelta į 500 ml LB terpės ir auginta iki logaritminės fazės vidurio. Aciltransferazės raiška indukuota 1 mM IPTG. Po 3 val. bakterijos nucentrifuguotos 10 min 3000 x g +4°C temperatūroje. Nupylus terpę, bakterijos praplautos atšaldytu 0,2 M Tris-HCl (pH=7,4) tirpalu ir vėl nucentrifuguotos. Nupylus tirpalą, jos suspenduotos 5 ml šviežio Tris-HCl tirpalo ir suardytos ultragarsu. Bakterijų lizatas nucentrifuguotas 20 min. 10000 x g +4°C temperatūroje. Nuopilas 90 min. centrifuguotas ultracentrifugoje 100000 x g pagreičiu, esant +4°C temperatūrai. Taip surinkta mikrosomų frakcija. Nuosėdos suspenduotos 200 µl 0,2 M Tris-HCl (pH=7,4) tirpalo. Bicinchono rūgštis (BCA) metodu nustatyta baltymų koncentracija. Naudotas Pierce (Thermo Scientific) rinkinys, ir matavimai atlikti pagal gamintojo rekomendacijas. Suspensija praskiesta tuo pačiu Tris-HCl tirpalu iki 1 mg/ml mikrosominių baltymų.

2.2.5 LFR koncentracijos matavimas

LFR koncentracija mėginiuose išmatuota pagal (Saulnier-Blache ir kt., 2000) su keletu pakeitimų. Lipidai iš nežinomų mėginių ir iš pavyzdžių su žinoma LFR koncentracija išskirti lygiu tūriu vandens prisotinto 1-butanolio. Stipriai papurčius ir nucentrifugavus (5 min. 3000 x g kambario temperatūroje), organinė

fazė atskirta nuo vandeninės, ir tirpiklis išgarintas. Mėgintuvėlyje likę lipidai suspenduoti 200 µl reakcijos suspensijos (1 µl (50 nCi) radioaktyvios žymės – ^{14}C -oleoil-kofermento A (58 mCi/mmol, Perkin Elmer), 20 µl 200 mM Tris-HCl (pH=7,5), 10 µl *Escherichia coli* mikrosomų suspensijos su rekombinantine LFR aciltransferaze, 8 µl 500 µM Na_3VO_4 tirpalo ir 161 µl 1 mg/ml vandeninio Tween-20 tirpalo). Inkubuota 2 val., kas 15 min. papurtant. Reakcija sustabdyta įpylus 400 µl tirpalo iš chloroformo, metanolio ir 12N druskos rūgšties (40:40:0,26). Po centrifugavimo (5 min. 12000 x g kambario temperatūroje) viršutinė fazė nusiurbta, o apatinė išgarinta. Mėgintuvėlyje likę lipidai ištirpinti 20 µl chloroformo ir metanolio tirpalo (1:1) ir užlašinti ant silikageliu 60 padengtos plonasluoksnės chromatografijos plokštelės (EMD Biosciences). Taip pat užlašinta standarto – 50 µg nežymėtos fosfatido rūgšties (FR). Plonasluoksnė chromatografija vykdyta 2 val.. Tirpiklių sistema buvo CHCl_3 , metanolio, NH_4OH ir vandens tirpalas (65:25:0,9:3). Po chromatografijos nežymėtos FR dėmė identifikuota jodo garais. ^{14}C izotopu pažymėta FR identifikuota autoradiografiškai ir (kadangi pastebėta keletas skirtingų žymėtų medžiagų) pagal migracijos atstumo sutapimą su nežymėtos FR migracijos atstumu. Autoradiogramos signalų intensyvumas išmatuotas Quantity One programa (BioRad). LFR koncentracija nežinomuose mėginiuose apskaičiuota pagal kalibravimo tiesės lygtį. Tiesinis LFR koncentracijos intervalas buvo 0,03 – 1 µM. Labiau koncentruoti pavyzdžiai buvo praskiesti, kad LFR koncentracija patektų į tiesinį intervalą.

2.2.6 ^{14}C -LFR metabolizmo greičio matavimas

^{14}C -LFR skaidymo / perdirbimo į kitus junginius greitis matuotas pagal (McDermott ir kt., 2006) su keletu pakeitimų. [oleoil-1- ^{14}C] lizofosfatido rūgštis (55 mCi/mmol) pirka iš American Radiolabeled Chemicals. Prieš pat eksperimentą ji ištirpinta nedideliame tūryje PBS su 0,5% jaučio serumo albumino (be riebalų rūgščių) ir praskiesta ląstelių auginimo terpe (su 2,5 ng/ml VEGF) iki

40 nCi/ml. Šia terpe paveikti kolageno geliuose susiformavę vamzdeliai ir kolageno geliai be ląstelių. Po 6 val. surinkta terpė ir kolageno geliai. Lipidai iš terpės ir kolagenazės tirpalu suardytų gelių (žiūr. sk. 2.2.3) išskirti taip: 1) užpilta chloroformo, metanolio ir koncentruotos HCl tirpalo (200:400:5, 375 µl, jei pavyzdžio pradinis tūris 300 µl) ir papurtyta; 2) užpilta 125 µl chloroformo, papurtyta; 3) užpilta 125 µl 0,1 M HCl, papurtyta; 4) nucentrifuguota 5 min. 12000 x g kambario temperatūroje; 5) apatinioji fazė perpilta į švarų mėgintuvėlį ir išgarinta. Lipidai ištirpinti 20 µl chloroformo ir metanolio tirpalo (1:1) ir užlašinti ant silikageliu 60 padengtos plonasluoksnės chromatografijos plokštelės. Taip pat užlašinta standarto – 50 µg nežymėtos LFR. Plonasluoksnė chromatografija vykdyta 2 val.. Tirpiklių sistema buvo CHCl₃, metanolio ir acto rūgšties tirpalas (38:9:4,5). Po chromatografijos nežymėtos LFR dėmė identifikuota jodo garais. ¹⁴C izotopu pažymėta LFR identifikuota autoradiografiškai ir (kadangi pastebėta keletas skirtingų žymėtų medžiagų) pagal migracijos atstumo sutapimą su nežymėtos LFR migracijos atstumu. Autoradiogramos signalų intensyvumas išmatuotas Quantity One programa. Žymėtos LFR koncentracija mėginyje išreikšta procentais, signalo intensyvumą terpėje 0 val. prilyginus 100%.

2.2.7 Baltymų NDS-PAAG elektroforezė

Baltymų elektroforezinis atskyrimas atliktas vadovaujantis įprasta metodika, pagal Laemmli, 1970. Surinktas vertikalus elektroforezės aparatas užpildytas skiriamąjo gelio tirpalu, kurio galutinė akrilamido koncentracija buvo 12% (10 ml: 4,55 ml dist. H₂O; 4 ml 30% akrilamido/ N,N'-metilenbisakrilamido (37,5:1) tirpalo (BioRad); 1,25 ml Tris-HCl (3 M, pH=8,8); 100 µL 10% NDS (natrio dodecilsulfato) tirpalo; 100 µl 10% APS (amonio peroksosulfato, BioRad) tirpalo; 4 µl TEMED (tetrametilendiamino, BioRad). Pasibaigus skiriamąjo gelio polimerizacijai, ant jo užpiltas koncentruojamojo gelio sluoksnis, kurio galutinė akrilamido koncentracija buvo 5% (5 ml: 3,4 ml dist. H₂O; 830 µl 30%

akrilamido/ N,N'-metilenbisakrilamido tirpalo; 630 µl Tris-HCl (1 M, pH=6,8); 50 µl 10% NDS tirpalo; 50 µl 10% APS tirpalo; 5 µl TEMED). Įstatytos šukos. Pasibaigus koncentruojamojo gelio polimerizacijai, išimtos šukos. Viršutinis ir apatinis elektroforezės aparato rezervuarai užpildyti elektrodiniu buferiu (1 l buferio sudėtis: 3 g Tris, 14 g glicino, 1 g NDS, vanduo). Į gelio šulinėlius supilti pavyzdžio buferyje ištirpintų baltymų ar pavyzdžio buferiu suardytų ląstelių mėginiai, pavirinti 5 min. ir nucentrifuguoti 5 min. 10000 x g. Pavyzdžio buferio sudėtis: 10% glicerolio, 50 mM Tris-HCl (pH=6,8), 2 mM Na-EDTA, 2% NDS, 1% β-merkaptioetanolio, 0,01% bromfenolio mėlio. Elektroforezė vykdyta, naudojant 120 V įtampos nuolatinę elektros srovę.

2.2.8 Imunofermentinė analizė (*Western blot*)

Imunofermentinė analizė atlikta pagal įprastą metodiką.

Baltymų pernešimas ant polivinilidenfluorido (PVDF) membranos

Po elektroforezės poliakrilamido gelis pamerktas į pernešimo buferį (buferio sudėtis: 48 mM Tris, 39 mM glicino, 20% metanolio). Surinktas pusiau sauso pernešimo aparatas (BioRad). Ant anodinės aparato dalies, sudrėkintos pernešimo buferiu, uždėtas buferyje pamirkytas gelio dydžio storo popieriaus lapelis. Ant jo uždėta tokio paties dydžio PVDF membrana, sudrėkinta pernešimo buferyje, o ant jos – gelis. Ant gelio uždėtas dar vienas popieriaus lapelis. Lazdele išstumtas oras, esantis tarp sluoksnių, ir uždėtas katodinis dangtis (taip pat sudrėkintas pernešimo buferiu). Pernešimas vykdytas 45 min., esant 25 mA nuolatinei srovei.

Imunofermentinė analizė

Membrana su perneštais baltymais pamerkta į blokavimo buferį (1l: 9 g NaCl, 1,26 g Tris-HCl, 0,24 g Tris bazės, 10 g neriebaus pieno miltelių, 0,5 ml Tween-20, 0,05% NaN₃). 1 val. inkubuota švelniai supant. 3 kartus po 15 min. plauta plovimo tirpalu (1l: 9 g NaCl, 1,26 g Tris-HCl, 0,24 g Tris bazės). Po to užpilta pirminių antikūnų, praskiestų blokavimo buferiu (RasGAP antikūnai

skiesti 1:10000; LPP3 – 1:2500; ATX, β -aktino – 1:1000; LPP2, LPP1 – 1:400). Inkubuota, esant +4°C temperatūrai, 16 – 36 val. arba, esant +20°C temperatūrai, 30 min. – 1 val. Membrana 3 kartus po 15 min. plauta plovimo buferiu. Po to užpilta su krienų peroksidaze konjuguotų antrinių antikūnų tirpalo (antikūnai praskiesti blokavimo buferiu be NaN_3 santykiu 1:3000). Inkubuota 1 val. kambario temperatūroje. Membrana 3 kartus po 15 min. plauta plovimo tirpalu. Užpilta po 2,5 ml chemiluminescencinių reagentų (Thermo Scientific). Inkubuota 5 min. supant. Membrana nusausinta ir įdėta tarp skaidrių plėvelių. Ant jų uždėta fotojuosta. Eksponuota 5 s – 1 val. Po eksponavimo juosta išryškinta. Juostelių intensyvumas pusiau kiekybiškai išmatuotas Quantity One vaizdų analizės programa.

2.2.9 Genų tildymas RNR interferencija

siRNR

LPP1 – LPP3 raiška BREC ir BRP ląstelėse tildyta mažosiomis interferencinėmis RNR (siRNR). siRNR oligonukleotidai pirkti iš Dharmacon (Thermo Scientific). Oligonukleotidų sekos parinktos Dharmacon siDesign programa. Kiekvienam taikiniui užsakyti ir išbandyti 4 skirtingi oligonukleotidai. Išbandėme keletą skirtingų transfekcijos reagentų, skirtų oligonukleotidų įterpimui į pirmines ląsteles, ir nustatėme, kad tiek BREC, tiek BRP transfekcijai geriausiai tiko DharmaFECT 1 (Dharmacon) reagentas. Transfekcijos sėkmingumas buvo įvertintas modifikuotomis, fluorescenciškai pažymėtomis siRNR (siGLO, Dharmacon) pagal gamintojo rekomendacijas. Ląstelės buvo transfekuotos taip (ląstelių skaičius, transfekcijos reagento koncentracija, inkubacijos su transfekcijos reagentu trukmė parinkti eksperimentiškai):

- BREC. Į 24-ių šulinėlių lėkštelės šulinėlius pasėta po 7 tūkst. ląstelių. Kitą dieną ląstelės paveiktos transfekcijos reagentu (0,5 μl / šulinėliui) ir 50 nM siRNR (nukreiptos prieš LPP1, 2, 3 arba liuciferazės mRNR (neigiama kontrolė)) pagal transfekcijos reagento gamintojo rekomendacijas. Ląstelės su šiais reagentais

inkubuotos 6 val., ir po to pakeista terpė. Baltymų raiška tirta praėjus 48, 72, 96 ir 120 val. po transfekcijos.

- BRP. Į 24-ių šulinėlių lėkštelės šulinėlius pasėta po 30 tūkst. ląstelių. Kitą dieną ląstelės paveiktos transfekcijos reagentu (1,5 µl / šulinėliui) ir 50 nM siRNR (nukreiptos prieš LPP1, 2, 3 arba liuciferazės mRNR) pagal transfekcijos reagento gamintojo rekomendacijas. Ląstelės su šiais reagentais inkubuotos 24 val., ir po to pakeista terpė. Baltymų raiška tirta praėjus 48, 72, 96 ir 120 val. po transfekcijos.

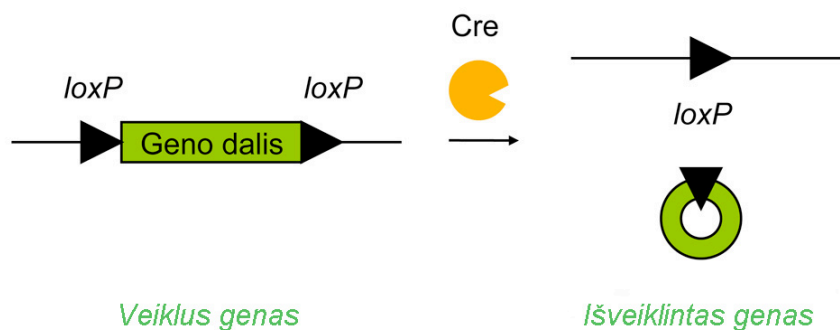
Tiek BREC, tiek ir BRP atveju nė vienas iš LPP1 ir LPP3 oligonukleotidų reikšmingai nesumažino savo taikinio raiškos. LPP2 oligonukleotidas, kurio mRNR seką atitinkančios grandinės (angl. *sense strand*) seka buvo 5'-UGACAGACCUGGCCAAGUAUU-3', LPP2 raišką sumažino maždaug 75%. Mažiausia LPP2 raiška nustatyta praėjus 72 ir 96 val. po transfekcijos.

shRNR

LPP raiška C3H 10T1/2 ląstelėse mažinta shRNR (angl. *short hairpin RNA*). shRNR sekos gautos iš The RNAi Consortium (Broad institutas, Bostonas, JAV). Plazmidiniai vektoriai pLKO.1 su įterptomis shRNR sekomis arba kontroline GFP shRNR seka užsakyti iš Dana Farber vėžio instituto. Lentivirusai su šiais vektoriais pagaminti pagal The RNAi Consortium rekomendacijas: į 293T pakavimo ląsteles įterptos pLKO.1 plazmidės, plazmidė, koduojanti viruso *gag*, *pol* ir *rev* genus (PCMV-DR8.91, Dana Farber vėžio institutas), ir plazmidė, koduojanti viruso kapsidės baltymą (VSV-G/pMD2.G, Dana Farber vėžio institutas). Transfekcijai naudotas TransIT-LT1 transfekcijos reagentas (Mirus Bio). Terpė su virusais surinkta praėjus 36 ir 60 val. po transfekcijos. Terpė užšaldyta ir iki infekcijos laikyta –80°C temperatūroje. C3H 10T1/2 ląstelės infekuotos, kai jos buvo padengusios maždaug 80% lėkštelės ploto. Ląstelės (10 cm lėkštelėje) paveiktos 0,5 ml terpės su virusais ir 8 µg/ml *polybrene* reagento. Po 24 val. infekuotų ląstelių atrankai į terpę pripilta 5 µg/ml puomicino. Ląstelės augintos terpėje su puomicinu maždaug 2 savaites, kol žuvo visos virusų negavusios ląstelės kontrolinėse lėkštelėse.

2.2.10 ATX ECKO pelių išvedimas

ATX koduojančiam genui (*Enpp2*) endotelio ląstelėse išveiklinti pasirinkome Cre – lox metoda (2.1 pav.) (apžvelgta Tronche ir kt., 2002). Šio metodo esmė tokia: į geno, kurį norima išveiklinti, seką įterpiamos dvi *loxP* sekos. Tai 34 bp sekos, kurias atpažįsta bakteriofago P1 rekombinazė Cre. Pelės su *loxP* sekomis gene, kurį norima išveiklinti, sukryžminamos su transgeninėmis pelėmis, kurios ekspresuoja Cre rekombinazę. Jų palikuonyse Cre baltymas atpažįsta *loxP* sekas ir katalizuoja rekombinaciją tarp jų, taip „iškirpdamas“ geno fragmentą ir geną išveiklindamas. Jei pasirenkamos pelės, kurios ekspresuoja Cre tik tam tikrose ląstelėse ar tam tikrame audinyje (t.y., Cre raišką valdo audiniui ar ląstelių tipui atrankus promotorius), genas atrankiai išveiklinamas būtent tose ląstelėse ar tame audinyje.



2.1 pav. Cre – lox metodo schema

ATX koduojančiam genui atrankiai išveiklinti endotelio ląstelėse pasirinkome transgenines Tie2-Cre peles. Šios pelės Cre rekombinazę ekspresuoja nuo Tie2 promotoriaus, atrankaus endotelio ląstelėms, kai kurioms kraujotakos ląstelėms ir endotelio kilmės širdies ląstelėms (Kisanuki ir kt., 2001). Tie2 promotoriaus valdoma Cre raiška labai dažnai naudojama endotelio ląstelių genams išveiklinti.

Tie2-Cre peles kryžminome su pelėmis, į kurių *Enpp2* geną abipus fermento aktyvų centrą koduojančių 6 ir 7 egzonų buvo įterptos *loxP* sekos. Šias peles vadinsime *Enpp2*^{F/F} pelėmis (žiūr. 2.1 lentelę).

2.1 lentelė. Darbe minimi *Enpp2* ir Tie2-Cre aleliai

Alelio pavadinimas	Paaiškinimas
<i>Enpp2</i> ⁺	Gamtinio tipo <i>Enpp2</i> genas
<i>Enpp2</i> ^F	<i>Enpp2</i> genas su įterptomis <i>loxP</i> sekomis (nuo angliško alelio su <i>loxP</i> sekomis pavadinimo „ <i>floxed</i> “)
<i>Enpp2</i> ^Δ	<i>Enpp2</i> ^F genas po rekombinacijos, su „iškirptais“ 6 ir 7 egzonais
Tie2-Cre	Transgenas, koduojantis bakteriofago P1 rekombinazės Cre raišką nuo endotelio ląstelėms atrankaus Tie2 promotoriaus. Tie2-Cre ⁺ nurodo, kad pelė turi Tie2-Cre transgeną. Tie2-Cre ⁻ nurodo, kad pelė šio transgeno neturi.

ATX ECKO pelės, *Enpp2*^{F/F} Tie2-Cre⁺, išvestos sukryžminus *Enpp2*^{F/F} peles su Tie2-Cre (Tie2-Cre⁺) pelėmis. Peles kryžminome tokia tvarka:

1. *Enpp2*^{F/+} peles sukryžminome tarpusavyje ir atrinkome *Enpp2*^{F/F} palikuonis;
2. *Enpp2*^{F/F} peles sukryžminome su Tie2-Cre pelėmis. Visi palikuonys buvo *Enpp2*^{F/+} Tie2-Cre⁺;
3. *Enpp2*^{F/+} Tie2-Cre⁺ peles sukryžminome su *Enpp2*^{F/F} pelėmis. Maždaug 25% šių pelių atsivestų pelių buvo ATX ECKO pelės (*Enpp2*^{F/F} Tie2-Cre⁺).

Toliau ATX ECKO peles veisėme kryžmindami ATX ECKO patinėlius su *Enpp2*^{F/F} Tie2-Cre⁻ patelėmis. ATX ECKO patelių veisimui naudoti negalėjome. Pastebėjome, kad visi jų palikuonys – net ir tie, kurie nepaveldėjo Tie2-Cre transgeno – turėjo rekombinuotą *Enpp2* alelį *Enpp2*^Δ. Mums kilo įtarimas, kad *Enpp2*^F alelio rekombinacija įvyko patelių lytinėse ląstelėse, ir todėl visose jų palikuonių ląstelėse (t.y., ne tik endotelio) buvo išveiklintas *Enpp2* genas. Literatūroje radome informacijos, kad Tie2 promotorius iš tiesų gali būti veiklus Tie2-Cre pelių patelių lytinėse ląstelėse, ir todėl šiose ląstelėse gali įvykti

rekombinacija (de Lange ir kt., 2008). Tačiau patinėlių lytinėse ląstelėse Tie2 neaktyvus, ir todėl tolimesniai ATX ECKO veisimui naudojome ATX ECKO patinėlius ir $Enpp2^{F/F}$ Tie2-Cre⁻ patėles. Pusė jų palikuonių buvo ATX ECKO pelės, o kita pusė – $Enpp2^{F/F}$ Tie2-Cre⁻ pelės, kurias toliau vadinsime kontrolinėmis pelėmis, ir su kuriomis eksperimentų metu lyginome ATX ECKO peles.

2.2.11 Pelių genotipavimas

Genomo DNR išskyrimas

Genomo DNR pelių genotipavimui išskyrimė iš uodegėlių galiukų (maždaug 2 mm ilgio). DNR išskirta taip: ant audinio užpilta tirpalo su 0,1 M Tris-HCl (pH=8,5), 0,05 M Na-EDTA, 1% NDS, 0,5 M NaCl ir 0,25 mg/ml proteinazės K. Inkubuota 4 val. +55°C temperatūroje ir po to nucentrifuguota 8 min. 12000 x g pagreičiu, esant kambario temperatūrai. Nuopilas perpiltas į mėgintuvėlį su tokiu pačiu tūriu izopropanolio. Gerai išmaišius, centrifuguota 8 min. 12000 x g pagreičiu, esant +4°C temperatūrai. Nuosėdos praplautos 70% etanolio tirpalu. Nucentrifuguota 8 min. 12000 x g pagreičiu, esant +4°C temperatūrai. Etanolis nupiltas. Nuosėdos 15 - 30 min. padžiovintos kambario temperatūroje ir ištirpintos 50 µl distiliuoto vandens. DNR tirpalas pakaitintas 10 min. +65°C temperatūroje, kad būtų nuslopintas proteinazės K aktyvumas. DNR laikyta –20°C temperatūroje.

Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

$Enpp2^+$, $Enpp2^F$, $Enpp2^{\Delta}$ ir Tie2-Cre aleliai identifikuoti PGR. $Enpp2^+$ ir $Enpp2^F$ aleliai nustatyti PGR su pradmenimis P583 ir P584 (žiūr. 2.2 lentelę). Reakcijos produktai buvo 170 bazių porų (bp) fragmentas, atitinkantis $Enpp2^+$ alelį, ir 300 bp fragmentas, atitinkantis $Enpp2^F$ alelį. $Enpp2^{\Delta}$ identifikuotas pradmenimis P640 ir P643 (reakcijos produktas buvo 370 bp). Tie2-Cre alelis identifikuotas pradmenimis Tie2 ir Cre (Kisanuki ir kt., 2001) (reakcijos produktas buvo 500 bp). PGR mišinio sudėtis nurodyta 2.3 lentelėje (visi

reagentai pirkti iš Promega), o reakcijos eiga – 2.4 lentelėje. Reakcijos produktai frakcionuoti 1,5% agarozės gelyje pagal standartinę metodiką.

2.2 lentelė. Pradmenys, naudoti pelėms genotipuoti

Pradmenys pavadinimas	Nukleotidų seka, 5'-3'	Nustatomi aleliai
P583	TGCTTGAAGTGTGTGTGCAC	<i>Enpp2</i> ⁺ , <i>Enpp2</i> ^F
P584	TTGAATCCTGAGCAATATGG	<i>Enpp2</i> ⁺ , <i>Enpp2</i> ^F
P640	GCACATACCTTTAATTCCAGCAC	<i>Enpp2</i> ^Δ
P643	ACAGACTTCTCTCTGAAGCTGAC	<i>Enpp2</i> ^Δ
Tie2	CCCTGTGCTCAGACAGAAATGAGA	Tie2-Cre ⁺
Cre	CGCATAACCAGTGAAACAGCATTGC	Tie2-Cre ⁺

2.3 lentelė. PGR mišinio sudėtis

Pradmenų pora →	P583, P584	P640, P643	Tie2, Cre
Reagentas↓			
<i>Taq</i> polimerazė	1,25 aktyvumo vnt	1,25 aktyvumo vnt	1,25 aktyvumo vnt
Reakcijos buferis	5 μl	5 μl	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl
dNTP (10 mM)	0,3 μl	0,3 μl	0,5 μl
Pradmenys (100 μM)	Po 0,05 μl	Po 0,05 μl	Po 0,125 μl
DNR	1 μl	1 μl	1 μl
Dist. vanduo	Iki 25 μl	Iki 25 μl	Iki 25 μl

2.4 lentelė. PGR eiga

Pradmenų pora →	P583, P584	P640, P643	Tie2, Cre
Reakcijos žingsnis↓			
1. Pradinė denatūracija	5 min. +94°C	5 min. +94°C	5 min. +94°C
2. Denatūracija	30 s +94°C	30 s +94°C	1 min. +94°C
3. Pradmenų prilipimas	30 s +58°C	30 s +60°C	90 s +60°C
4. DNR sintezė	30 s +72°C	30 s +72°C	2 min. +72°C
5. Ciklų skaičius (kartojami žingsniai 2 - 4)	29	29	29
6. DNR sintezė	5 min. +72°C	5 min. +72°C	5 min. +72°C

2.2.12 Baltymų raiškos limfmazgių kraujagyslėse nustatymas imunohistocheminiu metodu

Baltymų (ATX ir kolageno IV) raiška limfmazgių kraujagyslėse nustatyta imunohistocheminio dažymo metodu. Pelių kaklo ir kirkšnies limfmazgiai 24 val. fiksuoti 10% formalino tirpale. Limfmazgiai dehidratuoti etanoliu ir ksilenu bei įlieti į parafiną. Paruošti 4 µm storio pjūviai (limfmazgiai dehidratuoti, įlieti į parafiną ir supjaustyti Schepens akių tyrimų instituto morfologijos laboratorijos darbuotojų). Objektiniai stikleliai 2 val. pakaitinti +60°C temperatūros džiovavimo spintoje. Išskyrus kur nurodyta kitaip, toliau dirbta kambario temperatūroje. Pjūviai deparafinizuoti palaikius objektinius stiklelius vonelėje su ksilenu (2 k. po 3 min.) ir po to su ksileno ir 100% etanolio tirpalu (3 min.). Pjūviai rehidratuoti vonelėje su 100% etanoliu (inkubuota 2 k. po 3 min.), po to vonelėje su 95% etanoliu (3 min.), 75% etanoliu (3 min.) ir 50% etanoliu (3 min.). Objektiniai stikleliai nuplauti vandeniu. Epitopų struktūra atkurta 20 min. pavirinus stiklelius epitopų struktūros atkūrimo tirpale (angl. *antigen retrieval solution*, Vector Laboratories). Stikleliams 20 min. leista atvėsti, ir jie nuplauti PBS tirpalu. Peroksidazių aktyvumas nuslopintas ant pjūvių užlašinus 1% H₂O₂ tirpalo metanolyje ir palaikius 10 min. Nuplauta PBS (2 k. po 5 min.). Avidino ir biotino jungimosi sritys užblokuotos avidino ir biotino blokavimo tirpalais (Vector Laboratories, po 15 min, tarp skirtingų blokavimo tirpalų praplaunant PBS). Nuplauta PBS (2 k. po 5 min.). Užpilta blokavimo buferio, paruošto iš PBS su 0,2% Tween-20 ir 3% serumo (naudojamas tos rūšies gyvūnų, kuriuose pagaminti antriniai antikūnai, kraujo serumas). Inkubuota 30 min. Nusiurbus blokavimo buferį, užpilta pirminių antikūnų, praskiestų blokavimo buferyje. ATX antikūnai ir žiurkės IgG (izotipo kontrolė) praskiesti 100 k., o kolageno IV antikūnai ir triušio IgG – 400 k. Inkubuota per naktį +4°C temperatūroje. Kitą dieną praplauta PBS (3 k. po 10 min.). Užpilta antrinio antikūno (konjuguoto su biotinu, Jackson Immunoresearch), 500 k. praskiesto blokavimo buferiu. Inkubuota 1 val. Praplauta

PBS (3 k. po 10 min.). Pagal gamintojo (Vector Laboratories) rekomendacijas paruoštas ABC reagentas (avidino, biotino ir peroksidazės kompleksas). Jo užlašinta ant pjūvių ir inkubuota 45 min. Praplauta PBS (3 k. po 5 min.). Pagal gamintojo rekomendacijas (Thermo Scientific) paruoštas peroksidazės substratas - 3,3'-diaminobenzidino (DAB) reagentas. Pjūviai 12 min. dažyti DAB (per tą laiką susidarė rudos spalvos peroksidazės reakcijos produktas). Nuplauta PBS. Užlašinta tvirtinimo terpės iš 50% glicerolio ir 50% PBS. Uždengta dengiamuoju stikliuku. Pjūviai apžiūrėti šviesaus lauko mikroskopu ir nufotografuoti.

2.2.13 Stiklakūnio kraujagyslių regresijos tyrimas

Stiklakūnio kraujagyslių regresijai (žiūr. sk. 1.1.4.1) tirti buvo surinktos 1, 7, 14 ir 21 d. amžiaus pelių akys. Jos buvo bent 24 val. fiksuotos 10% buferiniu formalino tirpalu ir praplautos PBS. Schepens akių tyrimų instituto morfologijos laboratorijoje akys buvo įlietos į metilmetakrilatą, ir buvo paruošti 3 µm storio sagitaliniai pjūviai, maždaug per akies obuolio centrą. Jie nudažyti hematoksilino ir eozino dažais. Paruošti 45 kiekvienos akies pjūviai, ir kas penktame (iš viso dešimtyje) suskaičiuoti ląstelių branduoliai, esantys stiklakūnio kraujagyslių sienelėse. Branduolių skaičius 10-yje pjūvių sudėtas.

2.2.14 Tinklainės kraujagyslių tinklo tankio ir struktūros įvertinimas

Tinklainės buvo išpreparuotos iš 3 mėn. amžiaus pelių akių. Akys prieš tai buvo 1 val. fiksuotos 4% paraformaldehido tirpalu ir nuplautos PBS (3 k. po 15 min.). Dirbta kambario temperatūroje. Tinklainės buvo 24 val. dažytos IB4-GS lektinu, 50 k. praskiestu PBS su 1 mM CaCl₂ ir 0,5% Triton-X100. Po dažymo tinklainės praplautos PBS (3 k. po 15 min.). Tinklainės įkirptos 4-5 vietose (neperkerpant per centrą), kad būtų lengviau jas išskleisti ant objektinio stiklelio. Užlašinta sutvirtinimo terpės (Vector Laboratories) ir uždengta dengiamuoju stikleliu. Tinklainės kraujagyslių tinklas apžvelgtas fluorescenciniu mikroskopu ir

nufotografuotas. Nusidažiusių endotelio ląstelių užimamas plotas įvertintas vaizdų analizės programa ImageJ ir išreikštas viso paveikslėlio ploto procentais.

2.2.15 Statistinė analizė

Duomenys analizuoti GraphPad Prism ir Microsoft Excel programomis. Dviejų imčių vidurkių palyginimui naudotas Stjudento t kriterijus (porinių imčių atveju – porinis t kriterijus). Trijų ir daugiau grupių lyginimui naudotas vienfaktorinės arba dvifaktorinės dispersijos analizės (ANOVA) metodas. Kai duomenys buvo blokuoti, naudotas blokuotų duomenų vienfaktorinės arba dvifaktorinės ANOVA metodas. *post hoc* kriterijai buvo Bonferroni (dvifaktoringei analizei), Tukey (vienfaktorinei, kai tarpusavyje lygintos visos grupės) arba Dunnett (vienfaktorinei, kai grupės lygintos su kontrole).

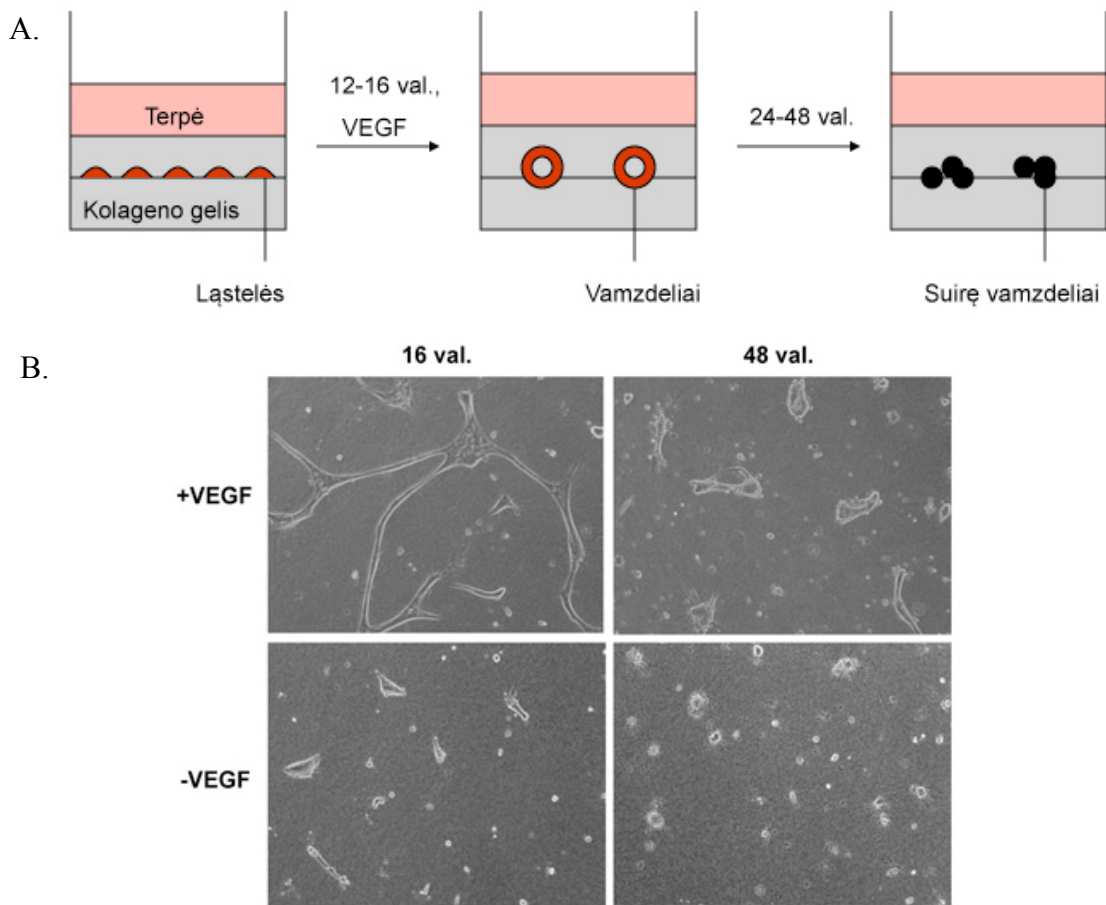
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 PERICITŲ POVEIKIO KRAUJAGYSLIŲ STABILUMUI *IN VITRO* MODELIO IŠVYSTYMAS

Pericitų poveikio kraujagyslių stabilumui molekuliniais mechanizmams tirti pasirinkome *in vitro* kraujagyslių formavimosi ir regresijos modelį. Kraujagysles primenantys tuščiaviduriai vamzdeliai šiame modelyje susiformuoja iš endotelio ląstelių (EL), jas pasėjus tarp dviejų kolageno gelio sluoksnių ir paveikus kraujagyslių augimo veiksniu (VEGF-A, toliau tekste VEGF) (3.1 pav.). Vamzdeliai susiformuoja maždaug per 12 – 16 val. po VEGF užpylimo. Po to vamzdeliai pradeda savaime regresuoti (trauktis ir nykti) (3.1 pav.), nors kasdien pakeičiama terpė ir pripilama šviežio VEGF. Regresija baigiasi maždaug 48 val. po VEGF užpylimo. Šis modelis tiksliai atspindi ne visus kraujagyslių formavimosi ir regresijos gyvame organizme aspektus, tačiau jis paprastesnis ir greitesnis už *in vivo* modelius. Mūsų laboratorijoje jis sėkmingai panaudotas įvairiems kraujagyslių formavimosi ir regresijos molekulinį mechanizmų aspektams tirti (Im ir Kazlauskas, 2006b; Im ir Kazlauskas, 2007; Im ir kt., 2010; Aranda ir kt., 2012).

Literatūroje gausu duomenų, kad pericitai stabilizuoja kraujagysles *in vivo* (žiūr. sk. 1.1.5.3). Taip pat žinojome, kad jie gali stabilizuoti vamzdelius *in vitro* modeliuose, panašiuose į mūsų (Saunders ir kt., 2006; Schrimpf ir kt., 2012). Norėdami patikrinti, ar pericitai gali sustabdyti vamzdelių iš EL regresiją mūsų modelyje, kartu su jaučio tinklainės endotelio ląstelėmis (BREC) ant kolageno gelio pasėjome pericitų pirmtakų – pelės C3H 10T1/2 ląstelių (toliau 10T). Šios ląstelės – tai pelės embriono fibroblastai, kurie auginami kartu su EL diferencijuojama į pericitus primenančias ląsteles (Hirschi ir kt., 1998) ir dažnai naudojami vietoj pirminių pericitų ir kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių (Darland ir kt., 2003; Kale ir kt., 2005; Stewart ir kt., 2011; Fabian ir kt., 2012),

nes yra gerai apibūdinti ir lengvai auginami. Pasėtos tarp dviejų kolageno gelio sluoksnių kartu su endotelio ląstelėmis, 10T ląstelės iš tiesų ekspresavo pericitų žymenis NG2 (3.2 pav.; fluorescencinės konfokalinės mikroskopijos darbus atliko dr. Jorge Aranda) ir PDGFR β (duomenys neparodyti). Dauguma 10T ląstelių, kaip būdinga pericitams, jungėsi prie EL vamzdelių iš išorinės pusės (3.2 pav.), nors, kitaip nei pericitai *in vivo*, ne visu ląstelės kūnu.



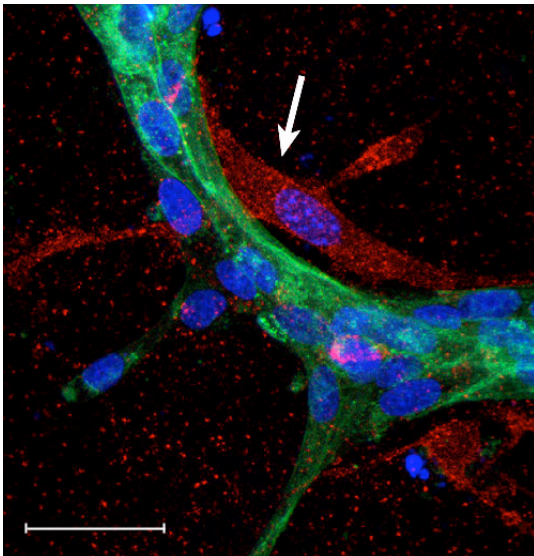
3.1 pav. Kraujagyslių formavimosi ir regresijos modelis.

Endotelio ląstelės pasėjamos tarp dviejų kolageno gelio sluoksnių. Užpylus terpės su 2,5 ng/ml VEGF, per 12 – 16 val. susiformuoja kraujagysles primenantys vamzdeliai. Praėjus 24 – 48 val. po VEGF užpylimo, vamzdeliai regresuoja. Be VEGF vamzdelių formuojasi mažai.

A. Eksperimento schema.

B. Vamzdeliai iš jaučio tinklainės endotelio ląstelių (BREC), stebimi invertuotu mikroskopu.

Vamzdeliai, suformuoti iš BREC ir 10T ląstelių, kitaip nei vamzdeliai suformuoti tik iš BREC, neregresavo (3.3 pav.). Taigi, 10T ląstelės stabilizavo vamzdelius. Svarbu pabrėžti, kad pačios savaime 10T ląstelės vamzdelių neformavo (duomenys neparodyti). Modelį optimizavome, parinkę tinkamiausią pericitų pirmtakų ir EL skaičiaus santykį. Stabilizavimas buvo pastebimas, kai 10T ląstelės sudarė dešimtadalį ar daugiau viso ląstelių skaičiaus (duomenys neparodyti), tačiau dėl geresnio atsikartojamumo tolimesniems eksperimentams pasirinkome santykį 1:5 (t.y., 1/6 10T ląstelių, 5/6 BREC). Minėtina, kad *in vivo* EL ir pericitų santykis, priklausomai nuo kraujagyslės tipo, yra 1:100-1:1 (Armulik ir kt., 2011).



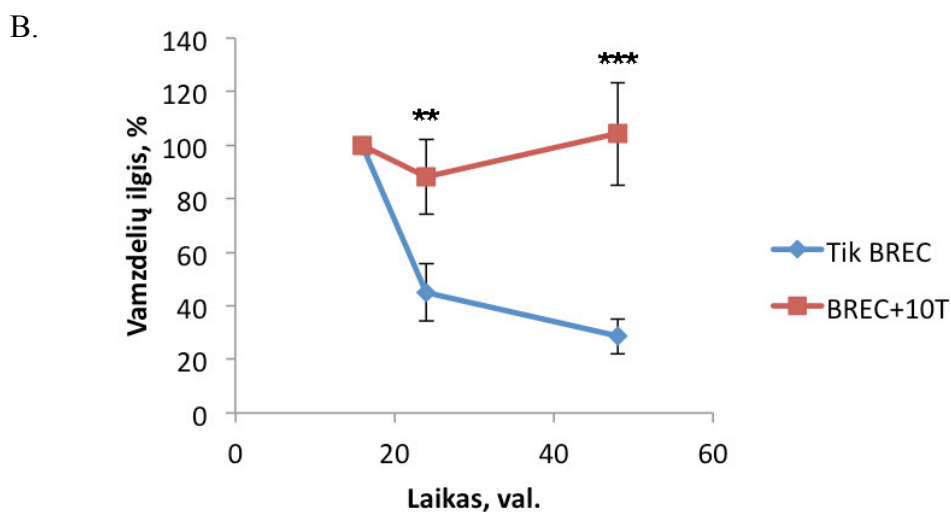
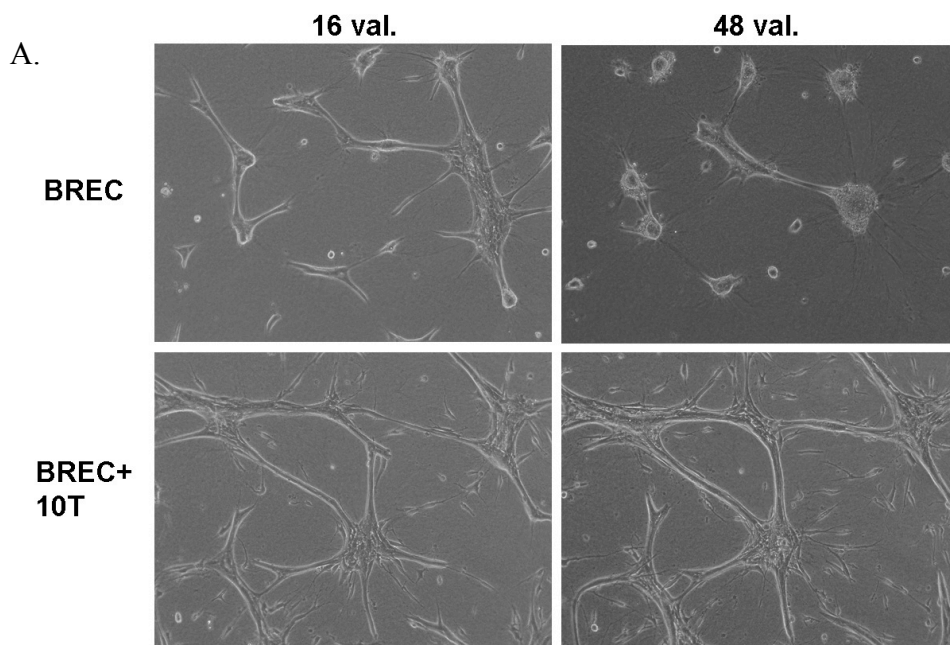
3.2 pav. BREC ir 10T ląstelių vamzdeliai, stebimi fluorescenciniu mikroskopu.

Mėlyna – branduoliai (pažymėti DAPI), žalia – EL (identifikuotos pagal sąveiką su fluorescenciškai pažymėtu lektinu IB4-GS), raudona – ląstelės, ekspresuojančios pericitų žymenį NG2. Balta rodyklė nukreipta į ląstelę, kuri ekspresuoja NG2, nesąveikauja su IB4-GS lektinu ir yra prisijungusi prie EL vamzdelio iš išorinės jo pusės (t.y., pasižymi pericito savybėmis). Horizontalus brūkšnyš atitinka 25 μm . Dr. Jorge Aranda nuotrauka.

Kartais mišrių vamzdelių jau 16 val. buvo šiek tiek daugiau nei vamzdelių iš BREC (3.3 pav., A), galbūt todėl, kad regresija kartais prasideda anksčiau nei 16 val., taigi 16 val. tokiais atvejais jau pastebimas stabilizavimas. Taip pat gali būti, kad 10T ląstelės šiek tiek paskatina vamzdelių formavimąsi. Vienaip ar kitaip, iš patirties žinome, kad tokie nedideli pradinio vamzdelių skaičiaus / ilgio skirtumai regresijos greičiui įtakos neturi; be to, BREC vamzdeliai regresavo

statistiškai reikšmingai greičiau net ir tais atvejais, kai jų susiformavo tiek pat ar netgi daugiau nei mišrių vamzdelių (duomenys neparodyti).

Vamzdelius iš BREC stabilizavo ne tik 10T ląstelės, bet ir pirminiai pericitai, išskirti iš jaučio tinklainės (t.y., iš to paties audinio kaip ir EL) (3.4 pav.). Šios ląstelės taip pat ekspresavo pericitų žymenis NG2 (3.5 pav.) ir PDGFR β (duomenys neparodyti), ir jungėsi prie EL vamzdelių iš išorinės vamzdelių pusės (3.5 pav.). Norėdami įsitikinti, kad stabilizavimas pericitais būdingas ne tik BREC, bet ir kitokioms EL, suformavome vamzdelius iš žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių (HUVEC). Jie taip pat savaime regresavo be pericitų, bet buvo stabilūs, kai kartu pasėjome žmogaus smegenų smulkiųjų kraujagyslių pericitų (HBVP) (duomenys neparodyti).

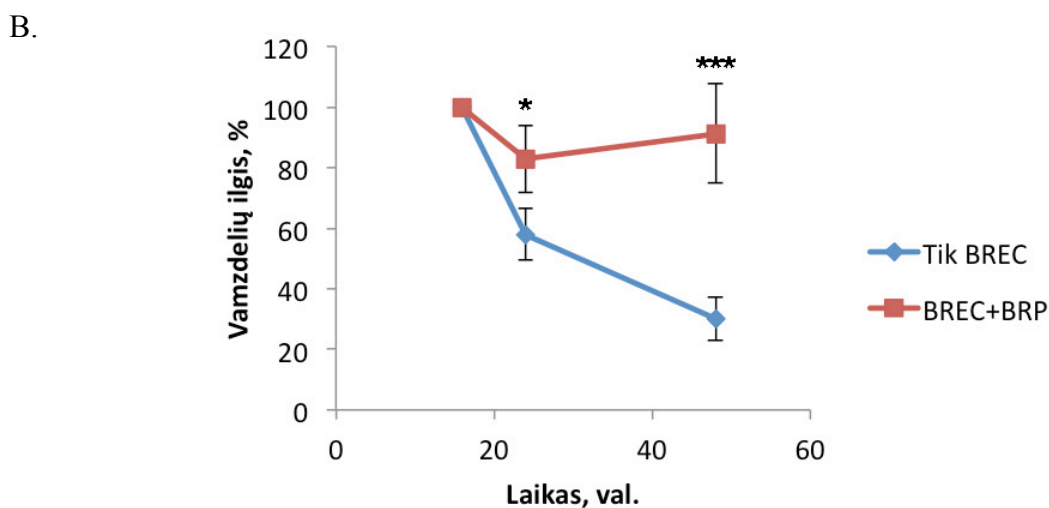
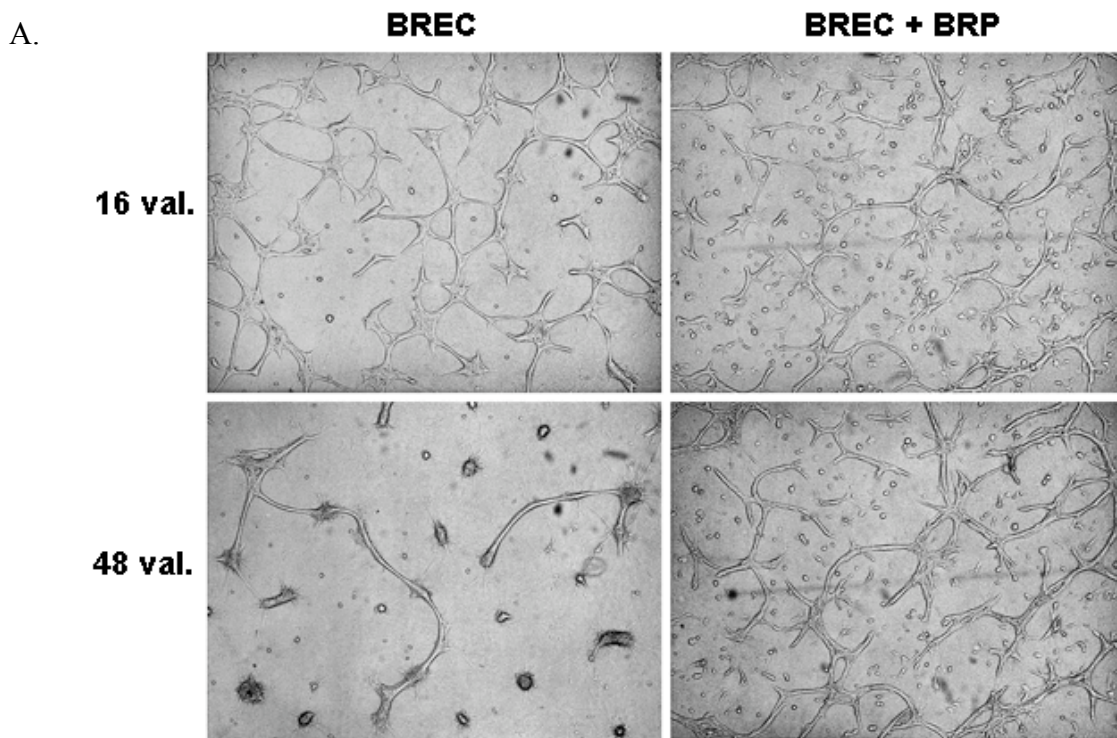


3.3 pav. C3H 10T1/2 ląstelės sustabdė modelinių kraujagyslių regresiją.

Vamzdeliai buvo suformuoti iš jaučio tinklainės endotelio ląstelių (BREC) arba jaučio tinklainės endotelio ląstelių ir pelės C3H 10T1/2 ląstelių (BREC + 10T) santykiu 5:1. Stebėtas vamzdelių formavimasis 16 val. ir regresija 24 val., 40 val. ir 48 val. po VEGF užpylimo.

A. Vamzdeliai, stebimi invertuotu mikroskopu.

B. Susumuoti penkių nepriklausomų eksperimentų duomenys. Vamzdelių ilgis 16 val. prilygintas 100%. Pateikti vidurkiai +/- SN. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (lyginta su „Tik BREC“ tą pačią val.).

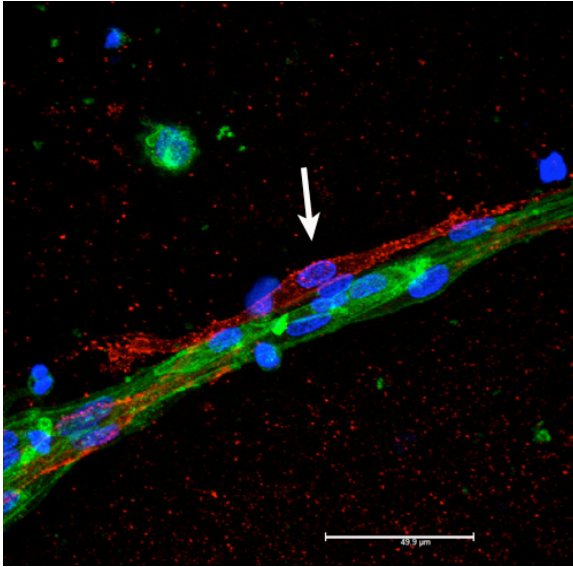


3.4 pav. Jaučio tinklainės pericitai sustabdė modeliųjų kraujagyslių regresiją.

Vamzdeliai buvo suformuoti iš jaučio tinklainės endotelio ląstelių (BREC) arba jaučio tinklainės endotelio ląstelių ir pericitų (BRP) santykiu 4:1. Stebėtas vamzdelių formavimasis 16 val. ir regresija 24 val. ir 48 val. po VEGF užpylimo.

A. Vamzdeliai, stebimi invertuotu mikroskopu.

B. Susumuoti keturių nepriklausomų eksperimentų duomenys. Vamzdelių ilgis 16 val. prilygintas 100%. Pateikti vidurkiai +/- SN. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (lyginta su „Tik BREC“ tą pačią val.).

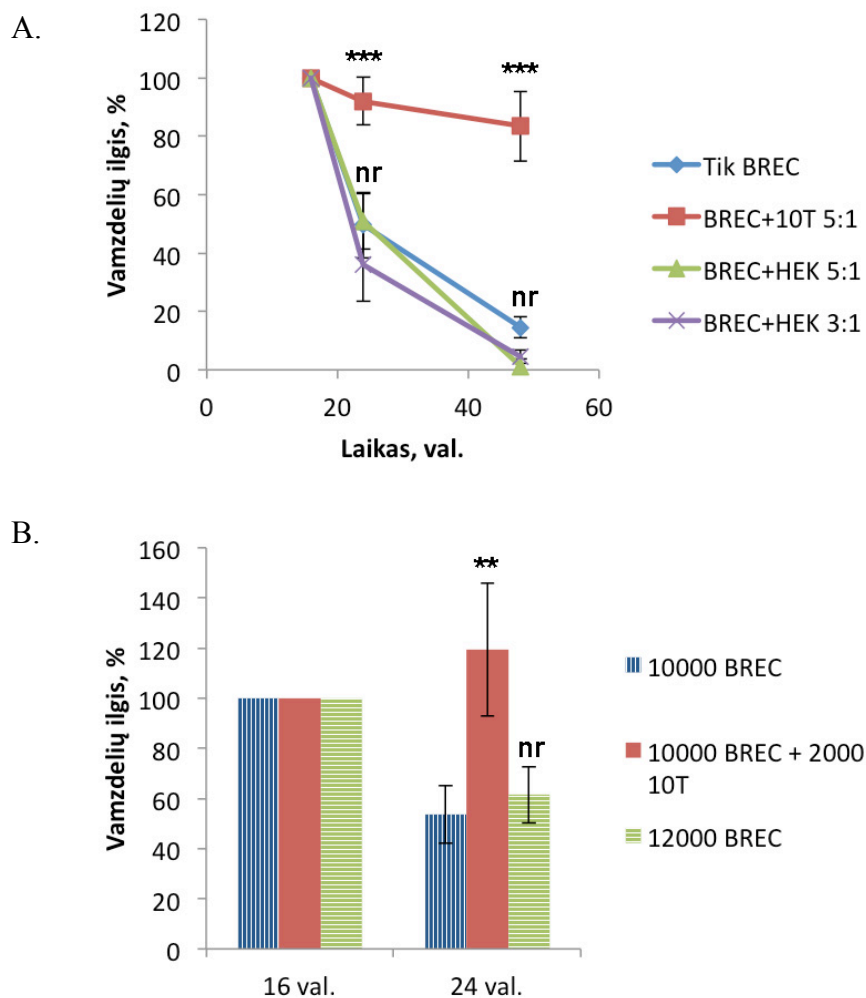


3.5 pav. BREC ir BRP vamzdeliai, stebimi fluorescenciniu mikroskopu.

Mėlyna - branduoliai (pažymėti DAPI), žalia – endotelio ląstelės (identifikuotos pagal sąveiką su fluorescenciškai pažymėtu lektinu IB4-GS), raudona – pericitai (identifikuoti pagal NG2 raišką). Balta rodyklė nukreipta į pericitą, prisijungusį prie endotelio ląstelių vamzdelio iš išorinės jo pusės. Horizontalus brūkšnys atitinka 50 μm. Dr. Jorge Aranda nuotrauka.

Galiausiai reikėjo patikrinti, ar stabilizavimo efektas atrankus, t.y., ar vamzdelių nestabilizuoja bet kokios ląstelės. Atrankumą patikrinome dvejopai: užsėję daugiau EL ir užsėję pericitams negiminingų žmogaus embriono inkstų (HEK293) ląstelių. Nei HEK293, nei daugiau EL vamzdelių nestabilizavo, nors 10T ląstelės vis dar stabilizavo vamzdelius (3.6 pav.). Be to, vamzdelių nestabilizavo (ir netgi priešingai, jų regresiją skatino) pirminiai pelės makrofagai (dr. Magdalena Staniszewska, nepublikuoti duomenys).

Taigi, turime paprastą *in vitro* modelį EL ir pericitų sąveikoms tirti. Jis atspindi keletą svarbių šių ląstelių sąveikos *in vivo* aspektų: pericitai glaudžiasi prie EL vamzdelių iš išorės; vamzdeliai iš EL ir pericitų stabilesni (t.y., neregresuoja) nei vamzdeliai tik iš EL; EL ir pericitų skaičiaus santykis panašus į nustatytą *in vivo*. Pericitai gali stabilizuoti vamzdelius iš įvairios kilmės EL (išbandėme dviejų tipų EL – BREC ir HUVEC). Stabilizuoja įvairios kilmės pericitai ir jiems giminingos ląstelės (BRP, HBVP, C3H 10T1/2), bet tikrintos pericitams negiminingos ląstelės nestabilizuoja EL vamzdelių. Taigi, išvystėme modelį, leidžiantį tirti pericitų poveikio kraujagyslių stabilumui molekulinis mechanizmus.



3.6 pav. BREC vamzdelių nestabilizavo pericitams negiminingos ląstelės.

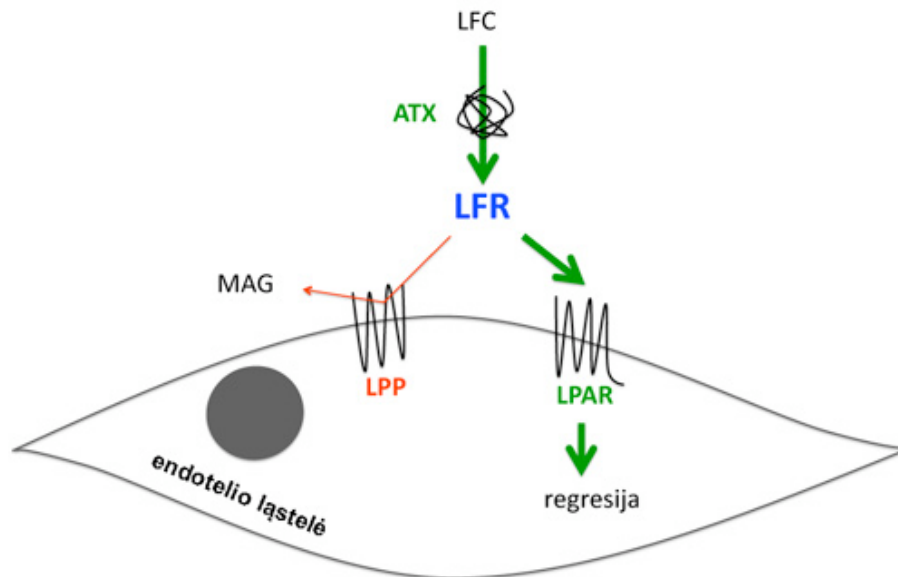
A. Vamzdeliai suformuoti iš BREC, BREC ir 10T ląstelių santykiu 5:1 arba BREC ir HEK293 ląstelių (HEK) santykiu 5:1 arba 3:1. Stebėtas vamzdelių formavimasis 16 val. ir regresija 24 val. ir 48 val. po VEGF užpylimo.

B. Vamzdeliai suformuoti iš 10000 BREC, 12000 BREC arba 10000 BREC ir 2000 10T ląstelių. Stebėtas vamzdelių formavimasis 16 val. ir regresija 24 val. po VEGF užpylimo.

A ir B. Pateikti vieno reprezentatyvaus eksperimento duomenys. Eksperimentas pakartotas 3 kartus. Vamzdelių ilgis 16 val. prilygintas 100%. Pateikti vidurkiai +/- SN (n=4; n – vieno eksperimento taip pat paveiktų šulinėlių skaičius). **p<0,01; ***p<0,001; nr – statistiškai nereikšminga (p>0,05) (A: lyginta su „Tik BREC“ tą pačią val.; B: lyginta su „10000 BREC“ 24 val.)

3.2 PERICITŲ POVEIKIO KRAUJAGYSLIŲ STABILUMUI MOLEKULINIO MECHANIZMO TYRIMAI

Anksčiau buvome parodę, kad vamzdelių tik iš endotelio ląstelių regresijai mūsų modelyje būtina ir pakankama lizofosfatido rūgštis (LFR) (Im ir kt., 2010). Apie šį regresijos veiksnį ir jo sintezę katalizuojantį fermentą autotaksiną (ATX) plačiau parašėme sk. 1.2, o čia trumpai priminsime, kad endotelio ląstelės sekretuoja ATX, o ATX katalizuoja LFR sintezę iš substrato lizofosfatidilcholino (LFC), kurio daug kraujo serume. LFR per savo receptorių endotelio ląstelėse perduoda signalą, sukeltą regresiją (Im ir kt., 2010) (3.7 pav.). Iškėlėme hipotezę, kad pericitai stabilizuoja modelines kraujagysles slopindami ATX – LFR signalinį kelią.



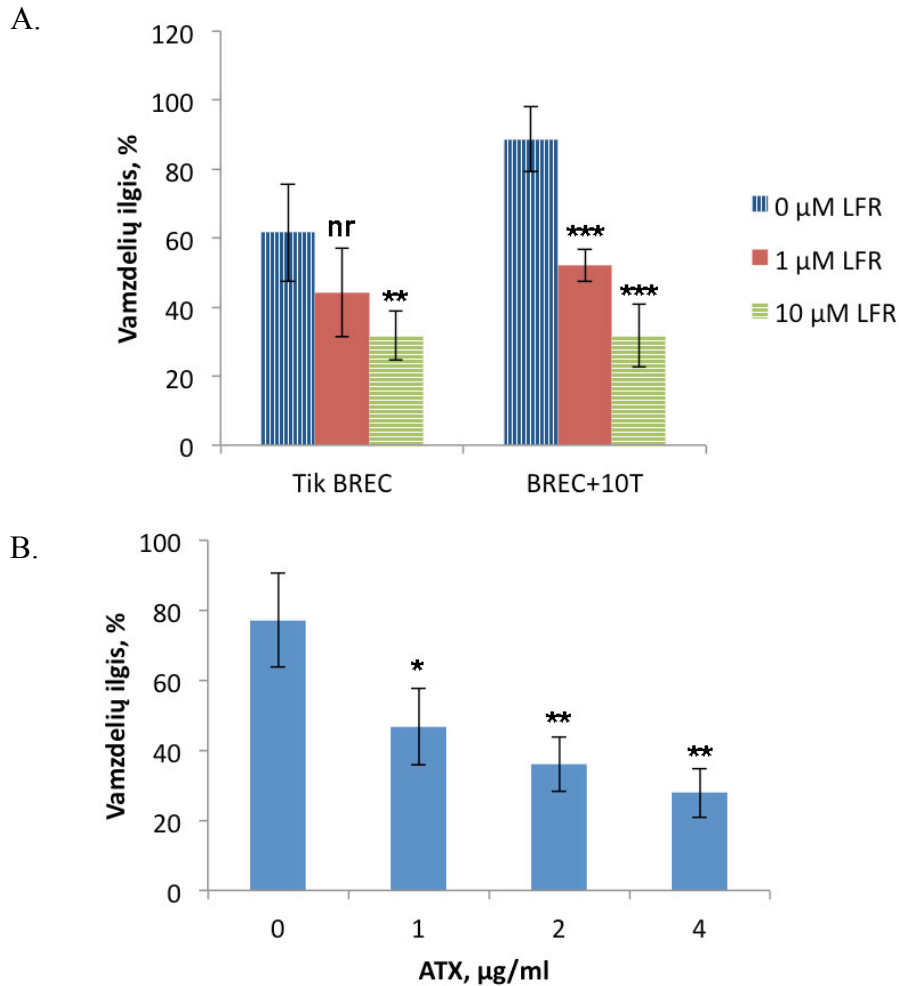
3.7 pav. Vamzdelių, suformuotų iš endotelio ląstelių, regresijos molekulinis mechanizmas.

LFR sintezę iš LFC katalizuoja sekretuojamoji lizofosfolipazė ATX. LFR jungiasi prie savo receptorių (LPAR) endotelio ląstelių išorinėje membranoje ir sukelia vamzdelių regresiją. Membranos fosfolipidų fosfatazės LPP gali defosforilinti LFR. Defosforilinimo reakcijos produktas monoacilglicerolis (MAG) nesijungia prie LFR receptorių ir nesukelia regresijos.

Kaip pericitai galėtų slopinti šį signalinį kelią? Galima išskirti keletą teorinių galimybių: pericitai galėtų slopinti endotelio ląstelių atsaką į LFR (pvz., mažinti LFR receptorių raišką endotelio ląstelėse, slopinti signalo perdavimą nuo receptoriaus ir pan.) ir / arba mažinti LFR koncentraciją / aktyvumą (pvz., mažinti ATX raišką / aktyvumą, skatinti LFR degradavimą ir pan.). Pirmiausia nutarėme patikrinti, ar pericitai slopina endotelio ląstelių atsaką į LFR.

3.2.1 Pericitai neslopino endotelio ląstelių atsako į ATX ir LFR

Norėdami patikrinti, ar pericitai keičia endotelio ląstelių jautrumą LFR, suformavome vamzdelius iš BREC ir BREC + 10T ląstelių. Prieš pat prasidedant regresijai (t.y., 16 val. po VEGF užpylimo), terpę virš kolageno gelių su vamzdeliais pakeitėme šviežia terpe, į kurią be VEGF dar pripylėme 1-oleoil-LFR. LFR pagreitino vamzdelių iš endotelio ląstelių regresiją ir sukėlė mišrių vamzdelių regresiją (3.8 pav., A). Panašius duomenis gavome ir su HUVEC ląstelėmis ir pirminiais pericitais (neparodyta). Taigi, vamzdeliai iš endotelio ląstelių ir pericitų, kaip ir vamzdeliai tik iš endotelio ląstelių, buvo jautrūs LFR. Tuo pačiu įsitikinome, kad mišrių vamzdelių regresiją galima sukelti ir rekombinantiniu ATX (3.8 pav., B), kuris taip pat pagreitina BREC vamzdelių regresiją (Im ir kt., 2010). Kita vertus, LFC vamzdelių regresijos nesukėlė (neparodyta). Iš šių rezultatų padarėme išvadą, kad mišrių vamzdelių, kurie savaime neregresuoja, regresiją galima sukelti LFR arba ATX, ir jų jautrumas šiems regresijos veiksniams panašus į vamzdelių tik iš endotelio ląstelių. Kitaip tariant, pericitai neturi įtakos endotelio ląstelių atsakui į LFR. Taigi, jei pericitai iš tiesų slopina ATX – LFR signalinį kelią, jie turėtų mažinti LFR koncentraciją ir / arba aktyvumą.



3.8 pav. Vamzdeliai regresavo, paveikti LFR arba rekombinantiniu ATX.

A. Vamzdeliai suformuoti iš BREC arba BREC ir 10T ląstelių. Vamzdeliams susiformavus, jie paveikti šviežia terpe su nurodytomis LFR koncentracijomis. Po 6 val. stebėta vamzdelių regresija.

B. Vamzdeliai suformuoti iš BREC ir 10T ląstelių. Vamzdeliams susiformavus, jie paveikti šviežia terpe su nurodytomis rekombinantinio ATX koncentracijomis. Po 6 val. stebėta vamzdelių regresija.

A ir B. Pateikti vieno reprezentatyvaus eksperimento duomenys. Eksperimentas pakartotas 3 kartus. Vamzdelių ilgis prieš pat poveikį LFR / ATX prilygintas 100%. Pateikti vidurkiai +/- SN (A: n=4, B: n=3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; nr – statistiškai nereikšminga (p>0,05) (lyginta su to paties tipo vamzdeliais, negavusiais LFR / ATX).

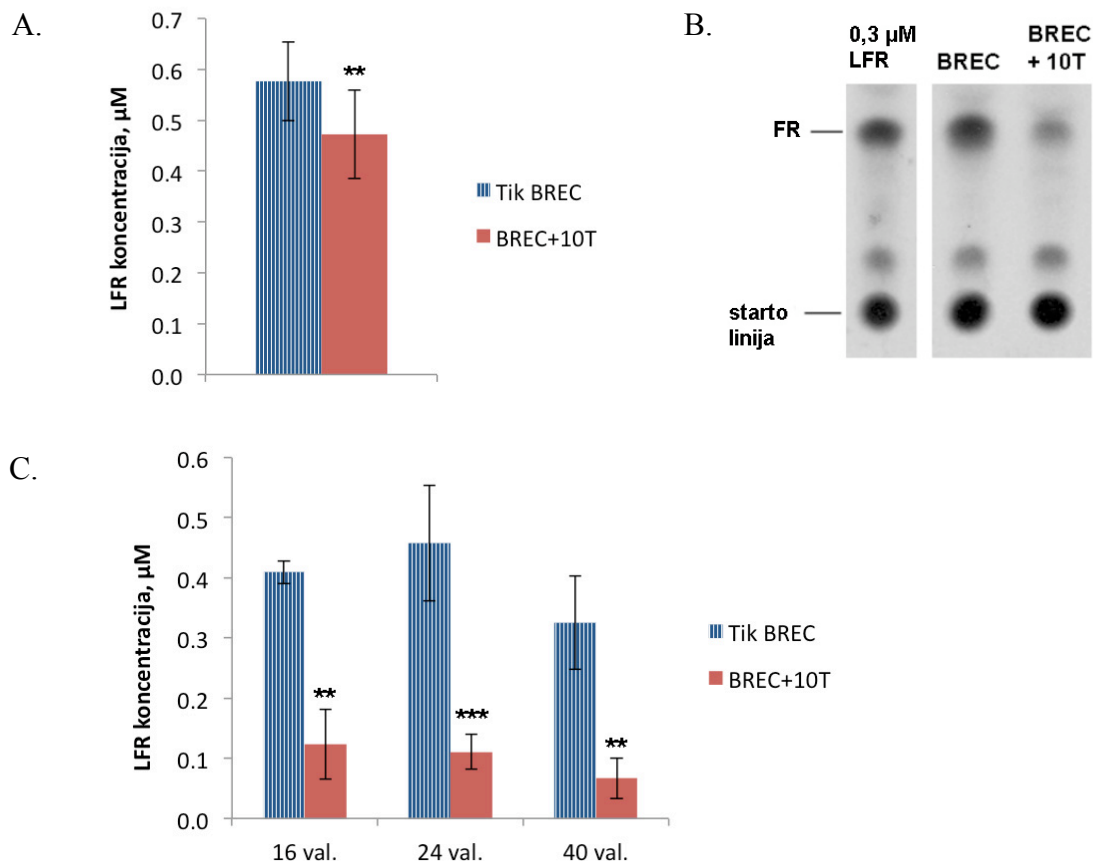
3.2.2 Pericitai sumažino LFR koncentraciją kolageno geliuose

Toliau tikrinome, ar pericitai keičia LFR koncentraciją mūsų modelinėje sistemoje. Tam reikėjo LFR koncentracijos matavimo metodo. Pasirinkome

radiofermentinį metodą, išvystytą Saulnier-Blache ir bendradarbių (Saulnier-Blache ir kt., 2000), kuris smulkiau aprašytas sk. 2.2.5. Šio metodo esmė tokia: iš pavyzdžio butanoliu išskiriami lipidai; lipidai inkubuojami reakcijos suspensijoje su radioaktyvia žyme – [oleoil-1-¹⁴C]-kofermentu A – ir mikrosomų frakcija iš bakterijų, ekspresuojančių rekombinantinę LFR aciltransferazę (LFRAT); LFRAT katalizuoja fosfatido rūgšties (FR) sintezę iš LFR ir [oleoil-1-¹⁴C]-kofermento A (3.9 pav.). Kadangi žymėtas anglies atomas yra [oleoil-1-¹⁴C]-kofermento A riebalų rūgšties grandinėje, žymė pernešama į FR. Taigi, susidariusios žymėtos FR kiekis proporcingas pradiniam LFR kiekiui pavyzdyje (3.10 pav.). Galiausiai reakcijos mišinio komponentai atskiriami plonasluoksne chromatografija, žymėta FR identifikuojama autoradiografiškai, o jos koncentracija nustatoma pagal kalibravimo tiesę.

Pirmiausia įsitikinome, kad šis metodas tinkamas LFR koncentracijai terpės pavyzdžiuose matuoti (3.10 pav.). Po to išmatavome LFR koncentraciją terpėje nuo BREC vamzdelių ir BREC + 10T ląstelių vamzdelių. Tam kaip įprasta suformavome vamzdelius ir 16 val. po VEGF užpylimo (t.y., prieš pat prasidedant EL vamzdelių regresijai) surinkome terpę nuo kolageno gelių. Pastebėjome statistiškai reikšmingą (pagal porinį t kriterijų), bet labai nedidelį skirtumą: terpėje nuo BREC vamzdelių buvo 0,58 μM LFR, o terpėje nuo mišrių vamzdelių buvo 0,47 μM LFR (18% mažiau) (3.11 pav., A). Tuomet pagalvojome, kad LFR biologinį atsaką sukelia jungdamasi prie savo receptorių ląstelės išorinėje membranoje, todėl regresijai turėtų būti svarbi ne LFR koncentracija terpėje virš kolageno gelio, o kiek yra LFR, kuri gali jungtis prie savo receptorių, t.y., susikaupusios šalia ląstelių. Iš patirties žinojome, kad kolageno gelis lėtina kai kurių molekulių difuziją iš terpės link ląstelių ir atvirkščiai, todėl padarėme prielaidą, kad LFR koncentracija terpėje ir kolageno gelyje gali skirtis.

koncentracijos geliuose su BREC vamzdeliais ir geliuose su BREC + 10T ląstelių vamzdeliais 16 val. buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$) ir išliko panašus 24 val. ir 40 val. (3.11 pav., C). Kolageno geliuose su BREC ir pirminių pericitų vamzdeliais taip pat buvo mažiau LFR nei geliuose tik su BREC, nors skirtumas buvo šiek tiek mažesnis (3.12 pav.).



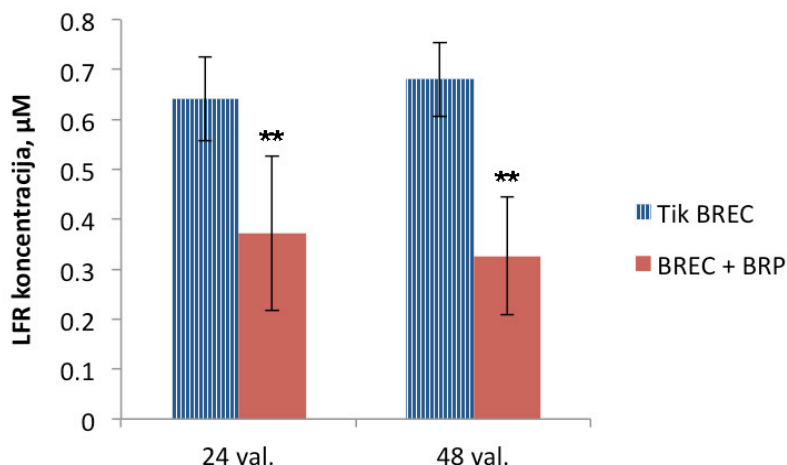
3.11 pav. Geliuose su BREC + 10T ląstelių vamzdeliais buvo mažiau LFR.

Vamzdeliai suformuoti iš BREC arba BREC ir 10T ląstelių. 16 val. po VEGF užpylimo surinkta terpė ir kolageno geliai. 24 val. ir 40 val. surinkti tik kolageno geliai. Radiofermentiniu metodu išmatuota LFR koncentracija pavyzdžiuose. A ir C: Susumuoti trijų nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai \pm SN. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (lyginta su „Tik BREC“ tą pačią valandą).

A. LFR koncentracija terpėje nuo BREC arba BREC + 10T vamzdelių 16 val. po VEGF užpylimo.

B. LFR koncentracija kolageno geliuose su BREC arba BREC + 10T vamzdeliais 16 val. po VEGF užpylimo. Reprerzentatyvi autoradiograma. FR – fosfatido rūgštis. Kairysis takelis – 0,30 μM LFR standartas.

C. LFR koncentracija kolageno geliuose su BREC arba BREC + 10T vamzdeliais 16 val., 24 val. ir 40 val. po VEGF užpylimo.



3.12 pav. Kolageno geliuose su BREC + BRP vamzdeliais buvo mažiau LFR.

Vamzdeliai suformuoti iš BREC arba BREC ir BRP. 24 val. ir 48 val. po VEGF užpylimo surinkti kolageno geliai. Radiofermentiniu metodu išmatuota LFR koncentracija pavyzdžiuose. Pateikti susumuoti keturių nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai +/- SN. ** $p < 0,01$ (lyginta su „Tik BREC“ tą pačią valandą).

Taigi, kolageno geliuose su mišriais vamzdeliais buvo mažiau LFR nei kolageno geliuose su endotelio ląstelių vamzdeliais. Šie duomenys atititiko mūsų hipotezę, kad pericitai stabilizuoja modelines kraujagysles slopindami ATX – LFR signalinį kelią. Kadangi LFR būtina ir pakankama vamzdelių tik iš endotelio ląstelių regresijai ir gali sukelti mišrių vamzdelių regresiją, mažesnė LFR koncentracija kolageno geliuose su mišriais vamzdeliais paaiškino jų stabilumą. Padarėme išvadą, kad pericitai stabilizuoja modelines kraujagysles sumažindami LFR koncentraciją jų aplinkoje.

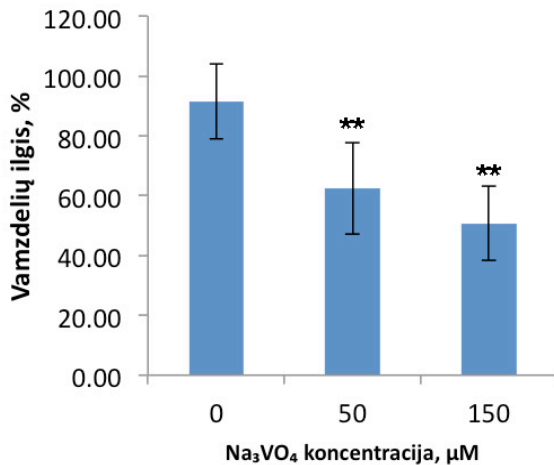
3.2.3 LPP aktyvumo slopinimas sukėlė mišrių vamzdelių regresiją

Kaip pericitai galėtų sumažinti LFR koncentraciją kolageno geliuose? Vėlgi galima išskirti keletą teorinių galimybių: pericitai galėtų sumažinti LFR gamybą ir / arba paskatinti jos skaidymą / perdirbimą į kitus junginius. Kaip minėjome sk. 1.2, pagrindinis LFR susidarymą katalizuojantis fermentas yra ATX, o pagrindiniai LFR skaidantys fermentai – fosfolipidų fosfatazės LPP (LPP1, LPP2, LPP3). Nors ląstelių viduje esanti LFR yra tarpinis

glicerofosfolipidų biosintezės produktas, informacijos apie už ląstelių ribų esančios LFR panaudojimą sudėtingesnių junginių sintezei neradome.

Jau žinojome, kad endotelio ląstelės gamina ATX, kad padidėjusi jo koncentracija koreliuoja su EL vamzdelių regresijos pradžia, ir kad jis yra būtinas ir pakankamas EL vamzdelių regresijai (Im ir kt., 2010). Taip pat buvome parodę, kad ATX gali sukelti mišrių vamzdelių regresiją (3.8 pav., B). Taigi, atrodo tikėtina, kad LFR koncentracija kolageno geliuose su mišriais vamzdeliais galėtų būti kritusi dėl sumažėjusios ATX koncentracijos arba aktyvumo. Galimybę, kad ATX trūksta substrato LFC, iškart atmetėme, nes LFC pats savaime nesukėlė vamzdelių regresijos (duomenys neparodyti), o ATX sukėlė regresiją papildomai nepripylus LFC (3.8 pav., B).

Apie LPP reikšmę mūsų modelyje žinojome kur kas mažiau nei apie ATX – tik tiek, kad LPP1 raiška nuo į BREC įvesto vektoriaus sustabdė regresiją (Im ir kt., 2010). Taigi, LPP buvo pakankamos vamzdelių stabilizavimui. Jų būtinumą patikrinome suformavę vamzdelius iš BREC ir 10T ląstelių ir paveikę juos Na_3VO_4 – fosfatazių slopikliu. Na_3VO_4 nėra atrankus LPP, tačiau gerai jas slopina – 100 μM Na_3VO_4 LPP aktyvumą sumažina 80-90% (Simon ir kt., 2002). Iš tiesų pastebėjome, kad Na_3VO_4 sukėlė mišrių vamzdelių regresiją (3.13 pav.). Na_3VO_4 poveikis gerokai susilpnėjo, kai kartu pripylėme dalies LFR receptorių slopiklio BrP-LPA (3.14 pav.). Be to, įsitikinome, kad naudotos Na_3VO_4 koncentracijos išties padidino LFR koncentraciją kolageno geliuose (3.15 pav.). Taigi, Na_3VO_4 regresiją sukėlė atrankiai, per LFR. Panašius rezultatus gavome mišrius vamzdelius paveikę ZnCl_2 , kitu LPP slopikliu (Roberts ir kt., 1998) – ZnCl_2 sukėlė mišrių vamzdelių regresiją, kurią iš dalies nuslopino BrP-LPA (duomenys neparodyti).

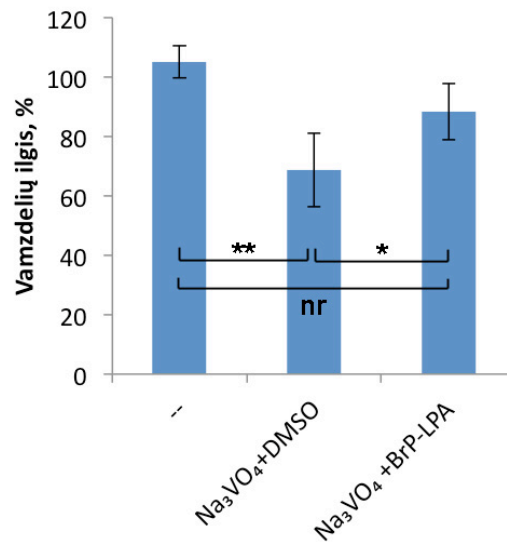


3.13 pav. Na₃VO₄ sukėlė mišrių vamzdelių regresiją.

Vamzdeliai buvo suformuoti iš BREC ir 10T ląstelių. Vamzdeliams susiformavus, jie paveikti šviežia terpe su nurodytomis Na₃VO₄ koncentracijomis. Po 6 val. stebėta vamzdelių regresija. Vamzdelių ilgis prieš pat pakeičiant terpę prilygintas 100%. Pateikti susumuoti penkių nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai +/- SN. **p<0,01 (lyginta su „0“).

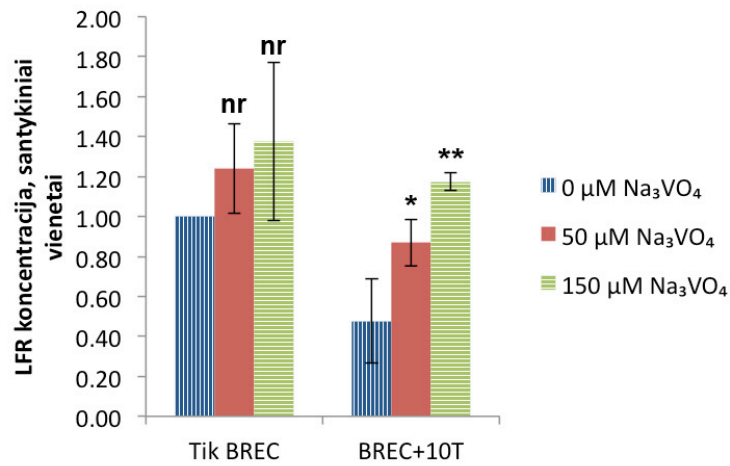
3.14 pav. BrP-LPA nuslopinė Na₃VO₄ sukeltą mišrių vamzdelių regresiją.

Vamzdeliai buvo suformuoti iš BREC ir 10T ląstelių. Vamzdeliams susiformavus, jie paveikti šviežia terpe, į kurią, kur nurodyta, pripilta 100 µM Na₃VO₄ ir arba 30 µM BrP-LPA (ištirpinto DMSO), arba toks pat tūris DMSO (tirpiklio kontrolė). Po 6 val. stebėta vamzdelių regresija. Vamzdelių ilgis prieš pat pakeičiant terpę prilygintas 100%. Pateikti vieno reprezentatyvaus eksperimento duomenys. Eksperimentas pakartotas 3 kartus. Pateikti vidurkiai +/- SN (n=4). *p<0,05; **p<0,01; nr – statistiškai nereikšminga (p>0,05).



Šie rezultatai rodo, kad mišriems vamzdeliams būdingas LPP aktyvumas, kurį nuslopinus galima padidinti LFR koncentraciją gelyje ir sukelti regresiją. Taigi, LPP raiškos arba aktyvumo sumažėjimas vamzdeliuose iš endotelio ląstelių ir pericitų irgi galėtų būti jų stabilumo priežastis. Verta paminėti, kad Na₃VO₄ reikšmingai nepadidino LFR koncentracijos geliuose su vamzdeliais tik iš BREC (3.15 pav.) ir nepagreitino jų regresijos (duomenys neparodyti). Taigi, arba BREC vamzdelių LPP aktyvumas mažas, arba LFR koncentracijai pakilti aukščiau tam

tikros ribos neleidžia kiti mechanizmai, pvz., ATX aktyvumo slopinimas didesnėmis LFR koncentracijomis (van Meeteren ir kt., 2005).



3.15 pav. Na_3VO_4 padidino LFR koncentraciją geliuose su mišriais vamzdeliais. Vamzdeliai buvo suformuoti iš BREC arba BREC ir 10T ląstelių. Vamzdeliams susiformavus, jie paveikti šviežia terpe su nurodytomis Na_3VO_4 koncentracijomis. Po 6 val. surinkti kolageno geliai ir juose išmatuota LFR koncentracija. Duomenys normalizuoti pagal LFR koncentraciją geliuose su BREC vamzdeliais, kurie nebuvo veikti Na_3VO_4 (prilyginta vienetai). Pateikti susumuoti keturių nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai \pm SN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; nr – statistiškai nereikšminga ($p > 0,05$) (lyginta su to paties vamzdelių tipo „0 $\mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$ “).

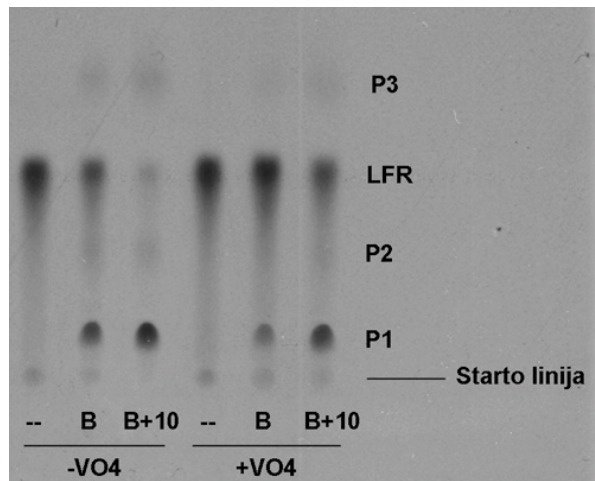
3.2.4 Mišrūs vamzdeliai greičiau metabolizavo žymėtą LFR

Toliau tikrinome, ar mišrūs vamzdeliai greičiau suskaido LFR nei vamzdeliai tik iš endotelio ląstelių. Tam suformavome BREC ir BREC + 10T vamzdelius ir užpylėme ant kolageno gelių su vamzdeliais terpės su [oleoil-1- ^{14}C]-LFR (žymėtas oleino rūgšties pirmasis anglies atomas). Žymėtos LFR prireikė todėl, kad nežymėtos LFR koncentracija sistemoje gali kisti tiek dėl jos sintezės, tiek ir dėl skaidymo (ar panaudojimo kitų junginių biosintezei) greičio pokyčių. Tuo tarpu žymėtos LFR ląstelės negamina, todėl jos pripylę galėjome tiesiogiai palyginti LFR skaidymo / panaudojimo greitį EL ir mišriuose vamzdeliuose. Po 6 val. inkubacijos su žyme surinkome kolageno gelius ir terpę virš jų, išskyrėme lipidus ir atlikome plonasluoksnių chromatografiją kaip aprašyta sk. 2.2.6. Norėdami sužinoti, kaip greitai vamzdeliai tik iš BREC metabolizuoja

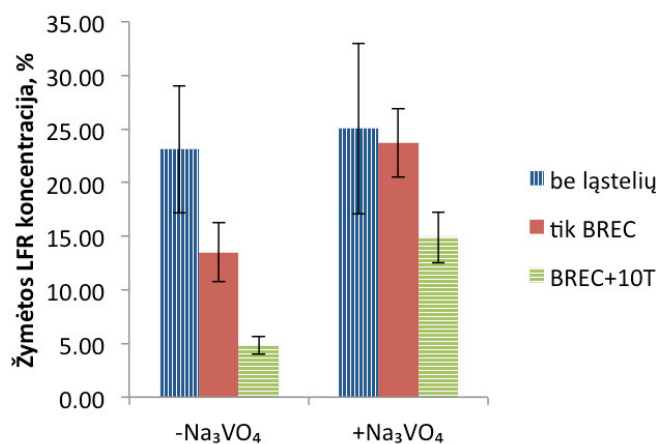
žymėtą LFR, įtraukėme kontrolę – kolageno gelius be jokių ląstelių, kurie visais kitais atžvilgiais buvo veikti lygiai taip pat, kaip ir geliai su ląstelėmis. Po 6 val. inkubacijos geliuose su BREC vamzdeliais buvo maždaug 40% mažiau LFR nei geliuose be ląstelių, ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas (3.16 pav.). Taigi, sužinojome, kad vamzdeliai tik iš BREC irgi metabolizuoja LFR. BREC ir 10T ląstelių vamzdeliai LFR koncentraciją mažino gerokai greičiau – po 6 val. geliuose su mišriais vamzdeliais buvo maždaug 80% mažiau LFR nei geliuose be ląstelių, ir maždaug 67% mažiau nei geliuose su BREC (3.16 pav.). Taigi, parodėme, kad mišrūs vamzdeliai LFR metabolizuoja greičiau nei vamzdeliai tik iš BREC.

Norėjome sužinoti, ar už žymėtos LFR išnykimą buvo atsakingos LPP. Jei taip, vienas iš reakcijos produktų turėjo būti žymėtas monoacilglicerolis (MAG), nes LPP katalizuoja LFR defosforilinimą iki MAG. Deja, nors pastebėjome bent tris skirtingas reakcijos produktų dėmeles (3.16 pav., A), nė vienos iš jų migracijos atstumas neatitiko MAG standarto (duomenys neparodyti). Tačiau gali būti, kad susidaręs MAG greitai virto kitais produktais. Kitaip LPP vaidmenį patikrinome kartu su žyme vamzdelius paveikę Na_3VO_4 . Šis fosfatazių slopiklis visiškai nuslopino LFR skaidymą / perdirbimą kolageno geliuose su BREC vamzdeliais (3.16 pav.), bet tik iš dalies geliuose su BREC + 10T vamzdeliais. Taigi, už ląstelių išorėje esančios LFR metabolizmą BREC ląstelėse greičiausiai atsakingos fosfatazės. Mišrių vamzdelių LFR metabolizmui taip pat svarbios fosfatazės, tačiau, ko gero, ir kažkokie kiti LFR skaidymo mechanizmai.

A.



B.



C.

Lyginamos sąlygos		p reikšmė
Be ląstelių	BREC	**
Be ląstelių	BREC+10T	***
BREC	BREC+10T	*
Be ląstelių, + Na ₃ VO ₄	BREC, + Na ₃ VO ₄	nr
Be ląstelių, + Na ₃ VO ₄	BREC+10T, + Na ₃ VO ₄	**
BREC, + Na ₃ VO ₄	BREC+10T, + Na ₃ VO ₄	*
Be ląstelių	Be ląstelių, + Na ₃ VO ₄	nr
BREC	BREC, + Na ₃ VO ₄	***
BREC+10T	BREC+10T, + Na ₃ VO ₄	***

3.16 pav. Mišrūs vamzdeliai greičiau metabolizavo LFR nei EL vamzdeliai.

Paruošti kolageno geliai be ląstelių, su BREC vamzdeliais arba su BREC+10T ląstelių vamzdeliais. Vamzdeliams susiformavus, pripilta [oleoil-1-¹⁴C]-LFR (40 nCi/ml). Dalis šulinėlių taip pat gavo 100 μM Na₃VO₄. Po 6 val. surinkti kolageno geliai, išskirti lipidai, atlikta plonasluoksnė chromatografija ir autoradiografija.

A. Reprezentatyvaus eksperimento autoradiograma. „--“ – gelis be ląstelių, „B“ – gelis su BREC vamzdeliais, „B+10“ – gelis su BREC ir 10T vamzdeliais, „-VO4“ – 0 μM Na₃VO₄, „+VO4“ – 100 μM Na₃VO₄, „P1-3“ – spėjami LFR metabolizmo produktai.

B. Susumuoti trijų nepriklausomų eksperimentų duomenys. Signalų stiprumas įvertintas vaizdų analizės programa ir išreikštas procentais, įpiltos žymės signalo stiprumą terpėje 0 val. prilyginus 100%. Pateikti vidurkiai +/- SN.

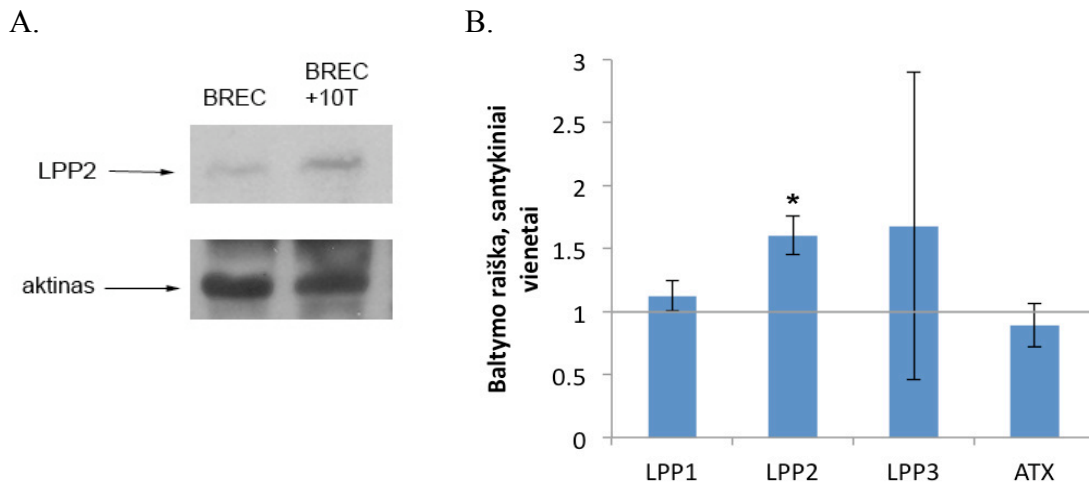
C. p reikšmių lentelė. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; nr – statistiškai nereikšminga (p>0,05).

3.2.5 Mišrių vamzdelių LPP2 raiška buvo didesnė

Aukščiau aprašyti eksperimentai parodė, kad mišrūs vamzdeliai greičiau metabolizavo LFR, tačiau tiksliai neatsakė į klausimą kaip. Literatūroje neradome duomenų apie kitokius už ląstelių ribų esančios LFR metabolizmo kelius nei defosforilinimas. Iš LFR defosforilinančių fosfatazių daugiausiai žinoma apie LPP, todėl toliau gilinomės į šių fermentų vaidmenį. Pirmiausia palyginome LPP1, LPP2 ir LPP3 raišką vamzdeliuose tik iš BREC ir vamzdeliuose iš BREC ir 10T ląstelių. Tuo pačiu palyginome ir ATX raišką, nes nebuvo atmetę tikimybės, kad mišrūs vamzdeliai ne tik greičiau skaido / perdirba LFR, bet ir mažiau jos gamina.

Visus keturis fermentus atrankiais antikūnais aptikome abiejų tipų vamzdeliuose (3.17 pav.). ATX ir LPP1 raiška abiejų tipų vamzdeliuose buvo panaši, tačiau LPP2 raiška vamzdeliuose iš BREC ir 10T ląstelių buvo maždaug 1,6 k. didesnė (3.17 pav.), ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas. LPP3 raiška labai skyrėsi skirtinguose eksperimentuose, ir todėl panašaus dydžio skirtumas tarp BREC vamzdelių ir BREC + 10T vamzdelių nebuvo statistiškai reikšmingas. Taigi, pericitų padengtų vamzdelių stabilumo negalime paaiškinti ATX arba LPP1 raiškos pokyčiais, bet pastebėta didesnė LPP2 raiška mišriuose vamzdeliuose galėtų nulemti greitesnį LFR skaidymą, mažesnę LFR koncentraciją gelyje ir vamzdelių stabilumą. Svarbu pabrėžti, kad nors ir atmetėme ATX ir

LPP1 raiškos pokyčius kaip stabilumo priežastį, gali būti, kad šie fermentai yra svarbūs, tik mišriuose vamzdeliuose pakitusi ne jų raiška, o aktyvumas.



3.17 pav. Mišrių vamzdelių LPP2 raiška buvo didesnė.

Vamzdeliai buvo suformuoti iš BREC arba BREC ir 10T ląstelių. Praėjus 16 val. po VEGF užpylimo, paruošti ląstelių lizatai, elektroforeze atskirti baltymai ir atlikta imunofermentinė analizė (*Western blot*) su ATX, LPP1, LPP2, LPP3 ir β -aktino antikūnais.

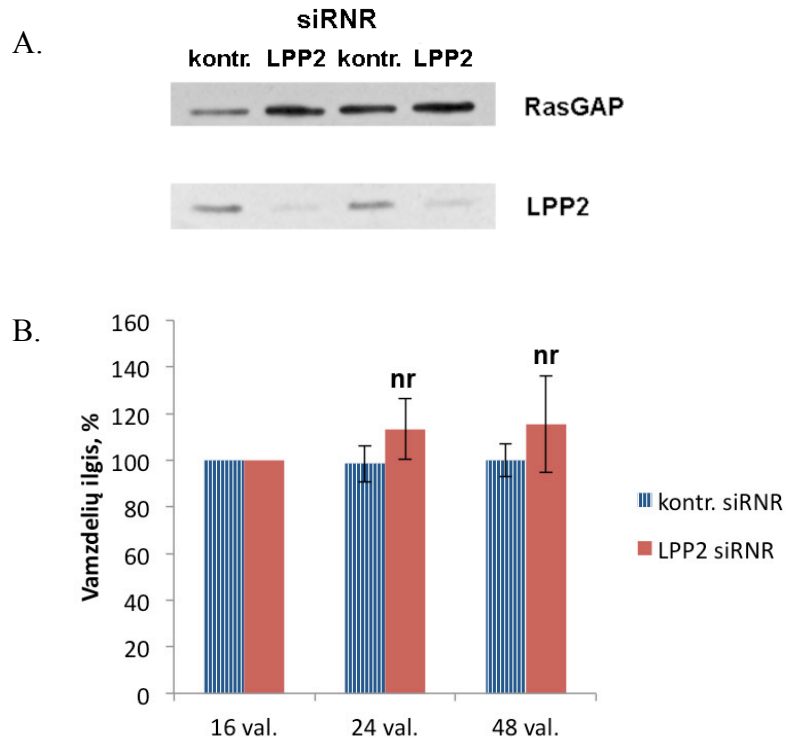
A. Reprezentatyvaus eksperimento LPP2 imunofermentinės analizės rezultatai. β -aktinas – užnešto baltymų kiekio kontrolė.

B. Kiekybiniai LPP1 – 3 ir ATX raiškos mišriuose vamzdeliuose duomenys. Imunofermentinės analizės signalų intensyvumas įvertintas vaizdų analizės programa, normalizuotas pagal β -aktino signalo intensyvumą ir po to pagal to paties baltymo (LPP1 – 3 arba ATX) raišką BREC vamzdeliuose, kuri buvo prilyginta vienetui. Horizontali tiesė žymi vienetą. Susumuoti keturių nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai \pm SP. *statistiškai reikšmingas skirtumas nuo vieneto ($p < 0,05$).

3.2.6 LPP2 raiškos BREC arba pericituose sumažinimas nesukėlė mišrių vamzdelių regresijos

Jei mišrius vamzdelius stabilizuoja padidėjusi LPP2 raiška, jos sumažinimas turėtų sukelti mišrių vamzdelių regresiją. Norėdami patikrinti, ar koreliacija tarp LPP2 raiškos ir vamzdelių stabilumo atspindi priežastinį ryšį, siRNR metodu sumažinome LPP2 raišką BREC ląstelėse. Suformavome vamzdelius iš BREC, transfekuotų LPP2 atrankia arba kontroline (liuciferazės) siRNR, ir niekaip nepaveiktų 10T ląstelių. LPP2 siRNR šio baltymo raišką

sumažino maždaug 75% (3.18 pav., A). Kitaip nei tikėjomės, vamzdeliai iš 10T ląstelių ir BREC, kuriose LPP2 raiška buvo sumažinta, neregresavo (3.18 pav., B).



3.18 pav. LPP2 raiškos BREC sumažinimas siRNR nesukėlė mišrių vamzdelių regresijos.

BREC transfekuotos 50 nM LPP2 arba kontrolinės (liuciferazės) siRNR.

A. Reprezentatyvaus eksperimento imunofermentinės analizės (*Western blot*) rezultatai. Paruošti BREC, transfekuotų LPP2 arba kontroline siRNR, lizatai, elektroforeze atskirti baltymai ir atlikta imunofermentinė analizė su LPP2 ir RasGAP antikūnais. RasGAP – užnešto baltymų kiekio kontrolė.

B. Suformuoti BREC, gavusių LPP2 arba kontrolinę siRNR, ir 10T ląstelių vamzdeliai. Stebėta jų regresija 24 val. ir 48 val. po VEGF užpylimo. Vamzdelių ilgis 16 val. prilygintas 100%. Susumuoti trijų nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai +/- SN. nr – statistiškai nereikšminga ($p > 0,05$) (lyginta su „kontr. siRNR“ tą pačią val.).

Kadangi nežinojome, ar padidėjusi LPP2 raiška mišriuose vamzdeliuose atsiranda dėl didesnės raiškos BREC ar dėl didesnės raiškos pericituose, pasinaudojome ta pačia siRNR ir sumažinome LPP2 raišką ir jaučio pericituose. Vamzdelių iš netransfekuotų BREC ir pericitų, gavusių LPP2 siRNR, stabilumas

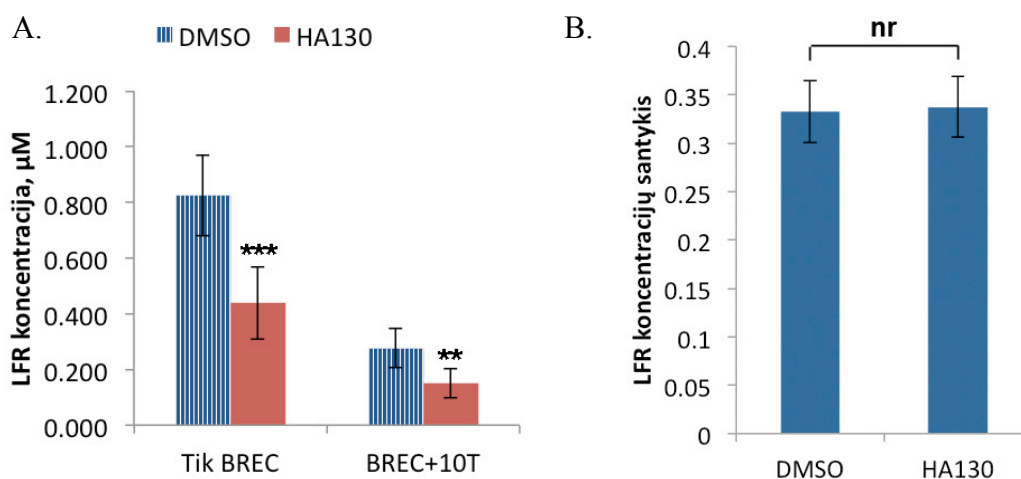
taip pat nepakito (duomenys neparodyti). Galiausiai shRNR metodu maždaug 60% sumažinome LPP2 raišką 10T ląstelėse. Vėlgi nustatėme, kad tokios 10T ląstelės vis dar taip pat gerai stabilizavo vamzdelius (duomenys neparodyti). Taigi, padarėme išvadą, kad sumažinus LPP2 raišką mišrių vamzdelių stabilumas nesumažėjo. Vadinasi, LPP2 nebuvo būtina vamzdelių stabilumui.

Kaip tuomet paaiškinti koreliaciją tarp vamzdelių stabilumo ir LPP2 raiškos? Literatūros duomenimis, LPP2 raiška endotelio ląstelėse daug mažesnė už LPP1 ir LPP3 raišką (Zhao ir kt., 2007; Bréart ir kt., 2011), taigi LPP2 indėlis į LFR defosforilinimą, ko gero, nedidelis. Iš tiesų net gerai nežinoma, ar LPP2 defosforilina už ląstelių ribų esančią LFR (žiūr. sk. 1.2.3). Taigi, gali būti, kad nors mišriuose vamzdeliuose LPP2 išties daugiau, šio baltymo raiškos pokyčiai reikšmingai nekeičia LFR koncentracijos kolageno gelyje. Norėdami įvertinti kitų dviejų LPP, LPP1 ir LPP3, svarbą, pabandėme sumažinti jų raišką BREC, BRP ir 10T ląstelėse siRNR ir shRNR. Deja, dėl nežinomų priežasčių sumažinti šių baltymų raiškos mums kol kas nepavyko nei vienoje, nei kitose ląstelėse (duomenys neparodyti). Taigi, nors ir parodėme, kad mišrūs vamzdeliai greičiau metabolizuoja LFR, likome iki galo neatsakę į klausimą, ar už tai atsakingos LPP (ir jei taip, kurios LPP) ar kažkokie kiti fermentai.

3.2.7 ATX aktyvumo slopinimas nesulygino LFR koncentracijų EL ir mišriuose vamzdeliuose

Ankstesniuose skyreliuose aprašyti eksperimentai parodė, kad mišrūs vamzdeliai greičiau metabolizavo LFR. Šio skirtumo pakanka skirtingoms LFR koncentracijoms kolageno geliuose su EL vamzdeliais ir mišriais vamzdeliais paaiškinti, tačiau gali būti, kad mišrūs vamzdeliai taip pat ir gamina mažiau LFR. Aukščiau parodėme, kad pagrindinio ląstelių išorėje esančią LFR sintezuojančio fermento ATX raiška BREC ir BREC+10T ląstelių vamzdeliuose nesiskiria (3.17 pav.), tačiau nebuvo paneigę galimybės, kad jo aktyvumas abiejų tipų vamzdeliuose nevienodas.

Norėdami įvertinti ATX aktyvumą abiejų tipų vamzdeliuose, suformavome vamzdelius iš BREC ir BREC+10T ląstelių ir paveikėme juos ATX slopikliu HA130 (Albers ir kt., 2010). Kaip ir tikėjomės, HA130 sulėtino BREC vamzdelių regresiją (duomenys neparodyti) ir taip patvirtino ATX svarbą regresijai (Im ir kt., 2010). Samprotavome, kad jei mažesnės LFR koncentracijos geliuose su mišriais vamzdeliais priežastis bent iš dalies yra mažesnis ATX aktyvumas, nuslopinus ATX, LFR koncentracijos kolageno geliuose su EL vamzdeliais ir mišriais vamzdeliais turėtų skirtis mažiau nei kai ATX aktyvus. Išmatavę LFR koncentracijas geliuose, paveiktuose HA130, sužinojome, kad LFR koncentracija abiejų tipų geliuose sumažėjo maždaug perpus (3.19 pav., A), ir kad koncentracijų santykis išliko nepakitęs (3.19 pav., B). T.y., net kai ATX buvo nuslopintas, geliuose su mišriais vamzdeliais tebebuvo 3 k. mažiau LFR nei geliuose su BREC vamzdeliais.



3.19 pav. ATX slopinimas nesulygino LFR koncentracijų geliuose su BREC ir BREC+10T ląstelių vamzdeliais.

Vamzdeliai buvo suformuoti iš BREC arba BREC ir 10T ląstelių. Vamzdeliams susiformavus, jie paveikti šviežia terpe su 10 µM HA130 (ištirpinto DMSO) arba tokiu pačiu tūriu DMSO (tirpiklio kontrolė). Po 30 val. surinkti kolageno geliai ir juose išmatuota LFR koncentracija. Pateikti susumuoti trijų nepriklausomų eksperimentų duomenys. Pateikti vidurkiai +/- SN.

A. LFR koncentracija kolageno geliuose, išreikšta µM. **p<0,01; ***p<0,001 (lyginta su to paties vamzdelių tipo „DMSO“).

B. LFR koncentracijos kolageno geliuose su BREC+10T ląstelių vamzdeliais ir geliuose su BREC vamzdeliais santykis. nr – statistiškai nereikšminga (p>0,05).

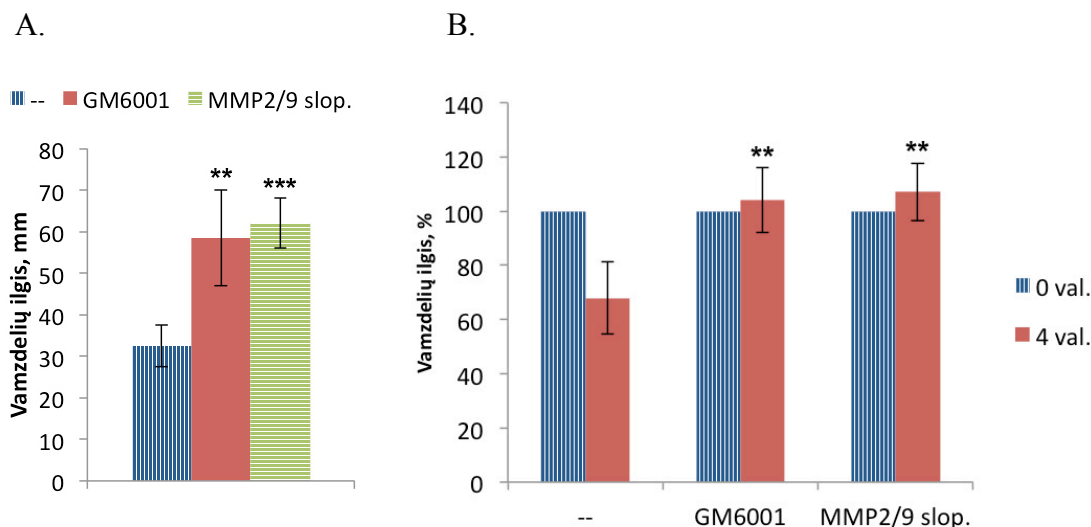
Nors tiesiogiai ATX aktyvumo nepamatavome ir todėl negalime griežtai teigti, kad ATX aktyvumas mišriuose vamzdeliuose ir EL vamzdeliuose vienodas, duomenys, rodantys, kad ATX nuslopinimas nesulygina LFR koncentracijos kolageno geliuose su EL vamzdeliais su koncentracija geliuose su mišriais vamzdeliais, leidžia manyti, kad ATX aktyvumo skirtumai greičiausiai nėra LFR koncentracijų skirtumo, taigi ir mišrių vamzdelių stabilumo, priežastis.

3.2.8 Vamzdelių regresiją slopino MMP slopiklis

Iki šiol tyrėme, kaip pericitai stabilizuoja EL vamzdelius slopindami ATX – LFR signalinį kelią. Literatūroje aprašyta keletas kitokių kraujagyslių stabilizavimo pericitais molekulinį mechanizmų. Pavyzdžiui, ANG-1, MMP slopiklis TIMP3, VEGF-A, TGFβ1 ir kai kurie kiti pericitų gaminami veiksniai skatina endotelio ląstelių išgyvenimą ir / arba valdo kraujagyslių stabilumą (žiūr. sk. 1.1.5.3). Norėjome patikrinti, ar šie veiksniai gali valdyti vamzdelių stabilumą ir regresiją mūsų modelyje, ir jei taip, ar jų poveikis kaip nors susijęs su ATX – LFR signaliniu keliu. Atlikome keletą paprastų eksperimentų: suformavome vamzdelius tik iš BREC ląstelių, po vieną užpylėme tiriamųjų veiksnių ir pažiūrėjome, ar jie pajėgs sustabdyti vamzdelių regresiją. Nei ANG-1, nei TGFβ1, nei didesnė nei paprastai naudojame VEGF-A koncentracija (50 ng/ml vietoj 2,5) nesulėtino regresijos (duomenys neparodyti). Nors šie rezultatai neleidžia teigti, kad ANG-1, TGFβ1 arba VEGF-A, kuriuos paprastai gamina pericitai, mūsų modelyje nėra svarbūs stabilumui, galime teigti, kad jų pačių savaime nepakanka.

MMP / TIMP vaidmenį patikrinome pripylę MMP slopiklio GM6001. Pripiltas prieš vamzdeliams susiformuojant (t.y., kartu su VEGF), GM6001 paskatino vamzdelių formavimąsi ir sustabdė jų regresiją (3.20 pav.). Pripiltas vėliau, jau vamzdeliams susiformavus, GM6001 pristabdė regresiją, tačiau ne taip efektyviai (duomenys neparodyti). Esame pastebėję, kad kai vamzdelių dėl kažkokių priežasčių susiformuoja labai daug, jie vien dėl to regresuoja lėčiau. Norėdami atskirti GM6001 poveikį regresijai nuo poveikio vamzdelių

formavimuisi, pasėjome dvigubai mažiau endotelinių ląstelių. Paveikus GM6001, iš jų susiformavo maždaug tiek pat vamzdelių kiek ir šulinėliuose, kurie negavo slopiklio, bet turėjo įprastinį ląstelių skaičių. Kontroliniai vamzdeliai regresavo, tuo tarpu paveikti GM6001 buvo stabilūs, nors pradinis vamzdelių skaičius nesiskyrė (duomenys neparodyti). Taigi, padarėme išvadą, kad MMP slopiklis GM6001 tiek skatino vamzdelių formavimąsi, tiek ir slopino jų regresiją. Panašius rezultatus gavome su MMP2 / MMP9 atrankiu slopikliu (3.20 pav.). Taigi, mūsų modelyje MMP, kaip ir LFR, buvo būtinos regresijai. Šie duomenys dera su jau išspausdintais darbais, parodžiusiais, kad pericitai gamina MMP slopiklį TIMP3, kuris slopina vamzdelių regresiją panašiuose į mūsų *in vitro* modeliuose ir kraujagyslių regresiją *in vivo* (Saunders ir kt., 2006; Schrimpf ir kt., 2012). Gali būti, kad ir mūsų modelyje pericitai iš dalies slopina regresiją slopindami MMP, tačiau kadangi šis mechanizmas jau neblogai išnagrinėtas, toliau šios projekto atšakos nebevystėme.



3.20 pav. MMP slopikliai skatino vamzdelių formavimąsi ir slopino regresiją.

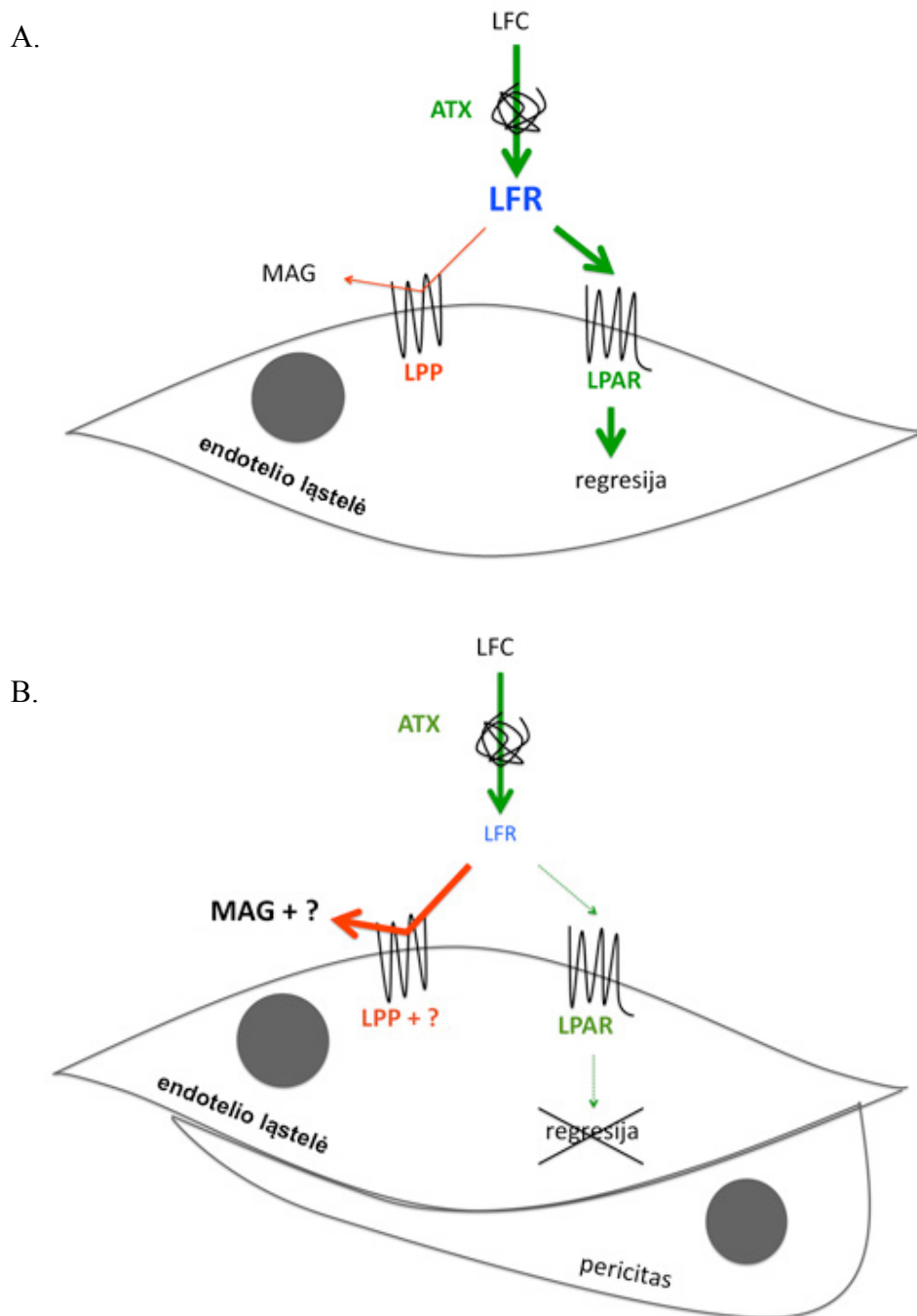
Vamzdeliai suformuoti iš BRECs, pripylus į terpę VEGF ir, kur nurodyta, bendro MMP slopiklio GM6001 (1 μ M) arba MMP2 / MMP9 atrankaus slopiklio (10 μ M). Stebėtas vamzdelių formavimasis 16 val. po VEGF užpylimo ir regresija dar po 4 val. Parodyti vieno reprezentatyvaus eksperimento duomenys. Pateikti vidurkiai \pm SN (n=4). Eksperimentas pakartotas 3 k. **p<0,01; ***p<0,001 (lyginta su „--“ tą pačią valandą).

A. Vamzdelių formavimosi duomenys, išreikšti mm.

B. Vamzdelių regresijos duomenys, išreikšti %. Vamzdelių ilgis 0 val. (t.y., 16 val. po VEGF užpylimo) buvo prilygintas 100%.

3.2.9 Vamzdelių iš endotelio ląstelių ir pericitų stabilumo molekulinio mechanizmo modelis. Tolimesnių tyrimų gairės.

Apibendrinami pristatytus rezultatus, siūlome tokį pericitais padengtų vamzdelių stabilumo molekulinį mechanizmą: pericitai stabilizuoja vamzdelius pagreitindami LFR skaidymą ir taip sumažindami šio regresijos veiksnio koncentraciją greta vamzdelių (3.21 pav.).



3.21 pav. Vamzdelių iš endotelio ląstelių ir pericitų stabilumo molekulinio mechanizmo modelis.

Vamzdeliai iš endotelio ląstelių ir pericitų (B) greičiau nei vamzdeliai tik iš endotelio ląstelių (A) metabolizuoja už ląstelių ribų esančią LFR. Tai gali lemti didesnis LPP aktyvumas, tačiau neatmestinas ir kitokių LFR metabolizuojančių fermentų vaidmuo. Sumažėjus LFR koncentracijai ląstelės išorėje, mažiau LFR jungiasi prie savo receptorių ir perduoda regresijos signalą. „?“ pažymėti neidentifikuoti LFR skaidantys fermentai ir jų katalizuojamų reakcijų produktai.

Kaip pericitai pagreitina už ląstelių ribų esančios LFR metabolizmą, kol kas tiksliai nežinome. Parodėme, kad LFR koncentraciją vamzdeliuose bent iš dalies valdo fermentai, kuriems būdingos LPP savybės: jautrumas slopikliams Na_3VO_4 ir cinko jonams. Fosfatazių, tokių kaip LPP, vaidmenį būtų galima patvirtinti arba paneigti palyginus abiejų tipų vamzdelių gebą defosforilinti LFR su žymėtu fosforu atomu. Jei paaiškėtų, kad fosfatazės yra svarbios stabilumui, kad sužinotume, ar jos yra LPP, svarbu išmokti sumažinti LPP raišką. Todėl tęsiame LPP1 ir LPP3 raiškos sumažinimo siRNR darbus. Neatmetame tikimybės, kad sužinosime, jog už mišrių vamzdelių stabilumą atsakingos fosfatazės, tačiau jos nėra LPP. Tokiu atveju nagrinėsime kitas fosfatazes, kurios galėtų defosforilinti už ląstelių ribų esančią LFR, pvz., prostatos rūgštinę fosfatazę (Tanaka ir kt., 2004). Galiausiai esame susidomėję mišriuose vamzdeliuose pastebėtu LFR metabolizmo mechanizmu, kurio neslopino Na_3VO_4 . Norime masių spektrometrija identifikuoti žymėtos LFR skaidymo produktą P1 (žiūr. 3.16 pav., A), kurio buvo daugiau kolageno geliuose su mišriais vamzdeliais, ir kurio susikaupimui Na_3VO_4 neturėjo įtakos. Manome, kad P1 gaminantis fermentas galėtų būti aktyvesnis mišriuose vamzdeliuose ir prisidėti prie jų stabilumo. Tikimės, kad šie ir kiti eksperimentai padės mums nustatyti, kurie fermentai yra atsakingi už greitesnį LFR metabolizmą ir mišrių vamzdelių stabilumą mūsų *in vitro* modelyje, kad toliau galėtume juos nuslopinti arba išveiklinti *in vivo* ir taip įvertinti jų reikšmę fiziologinei ir patologinei kraujagyslių regresijai.

3.3 ENDOTELIO LĄSTELIŲ AUTOTAKSINO REIKŠMĖS AKIES KRAUJAGYSLIŲ AUGIMUI IR REGRESIJAI TYRIMAS

Kaip minėjome literatūros apžvalgoje ir skyriuose 3.1 bei 3.2, ATX (sekretuojamoji lizofosfolipazė D) katalizuoja kai kurių fosfolipidų hidrolizę, susidarant LFR. LFR yra būtina ir pakankama endotelio ląstelių (EL) vamzdelių regresijai *in vitro* kraujagyslių formavimosi ir regresijos modelyje (Im ir kt.,

2010). Norėdami patikrinti, ar ATX valdo kraujagyslių regresiją *in vivo*, stebėjome transgeninių pelių, kurių ATX raiška padidinta (Pamuklar ir kt., 2009), stiklakūnio kraujagyslių regresiją. Parodėme, kad šių pelių stiklakūnio kraujagyslės regresavo greičiau (Im ir kt., 2010). Taigi, ATX ir *in vivo* gebėjo pagreitinti kraujagyslių regresiją. Tačiau vis dar nežinojome, ar ATX būtinas *in vivo* kraujagyslių regresijai. Bene paprasčiausia patikrinti ATX būtinumą *in vivo* regresijai būtų išveiklinus pelių ATX koduojantį *Enpp2* geną ir palyginus šių pelių ir gamtinio tipo pelių kraujagyslių regresiją. Deja, pelės su išveiklintu *Enpp2* genu gaišta embriono vystymosi metu (Tanaka ir kt., 2006; van Meeteren ir kt., 2006), taigi neišgyvena iki tokio amžiaus, kada galėtume stebėti regresiją. Pelės, heterozigotinės *Enpp2* atžvilgiu, išgyvena ir yra iš pažiūros sveikos, nors jų kraujo plazmoje yra maždaug 50% mažiau LFR (Tanaka ir kt., 2006; van Meeteren ir kt., 2006). Tai rodo, kad 50% LFR pakanka daugeliui jos funkcijų užtikrinti. Šių pelių stiklakūnio kraujagyslių regresijos greitis buvo nepakitęs (dr. Eunok Im, nepublikuoti duomenys).

Mūsų *in vitro* eksperimentuose endotelio ląstelių gaminamas ATX buvo svarbus vamzdelių regresijai. Sumažinus jo raišką endotelio ląstelėse siRNR, regresija nuslopo (Im ir kt., 2010). Todėl nutarėme išvesti peles, kurių abi *Enpp2* kopijos būtų atrankiai išveiklintos endotelio ląstelėse. Kadangi ATX gamina daug skirtingų tipų ląstelių, tikėjomės, kad atrankus išveiklinimas tik endotelio ląstelėse nesukels didelių embriono vystymosi defektų ir padės atskleisti ATX reikšmę kraujagyslių regresijai. Peles su endotelio ląstelėse išveiklintu ATX koduojančiu genu nutarėme pavadinti ATX ECKO pelėmis (angl. *ATX endothelial cell knock-out*).

3.3.1 ATX ECKO pelių išvedimas ir pradinis apibūdinimas

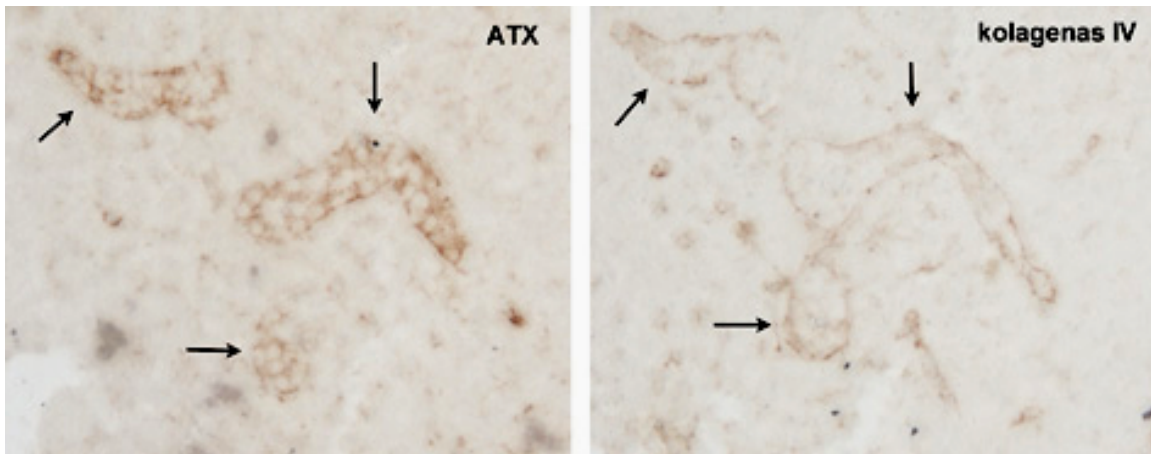
ATX ECKO pelių išvedimas plačiau aprašytas skyriuje 2.2.10. Šias peles išvedėme sukryžminę transgenines peles, ekspresuojančias Cre rekombinazę nuo Tie2 promotoriaus, atrankaus endotelio ląstelėms, endotelio kilmės širdies

ląstelėms ir kai kurioms kraujų ląstelėms (Kisanuki ir kt., 2001), su pelėmis, į kurių *Enpp2* geną abipus fermento aktyvų centrą koduojančios sekos buvo įterptos dvi Cre rekombinazės atpažįstamos *loxP* sekos (van Meeteren ir kt., 2006). Po kelių kryžminimo etapų gavome peles, kurios turėjo abi genetines modifikacijas – ekspresavo rekombinazę nuo Tie2 promotoriaus ir turėjo *loxP* sekas *Enpp2* gene. Šių pelių ląstelėse, ekspresuojančiose Cre (t.y., endotelio ir kai kuriose kitose ląstelėse) turėjo būti „iškirpta“ *Enpp2* seka tarp *loxP* sekų, t.y. turėjo būti išveiklintas *Enpp2* genas. Tai ir buvo ATX ECKO pelės.

ATX ECKO pelių gimė beveik tiek pat, kiek ir brolių / seserų, neturinčių Tie2-Cre geno, bet turinčių *loxP* sekas (t.y., kontrolinių pelių) (atitinkamai 75 ir 74). Šis santykis reikšmingai nesiskyrė nuo teorinio 1:1, prognozuojamo pagal Mendelio dėsnį. Taigi, ATX ECKO pelės negaišo embriono vystymosi metu, kitaip nei pelės, kurių ATX koduojantis genas buvo išveiklintas visose organizmo ląstelėse. Maža to, jos sėkmingai išgyveno bent iki 9 mėn. amžiaus (toliau netyrėme), buvo vaisingos ir iš pažiūros niekuo nesiskyrė nuo kontrolinių pelių.

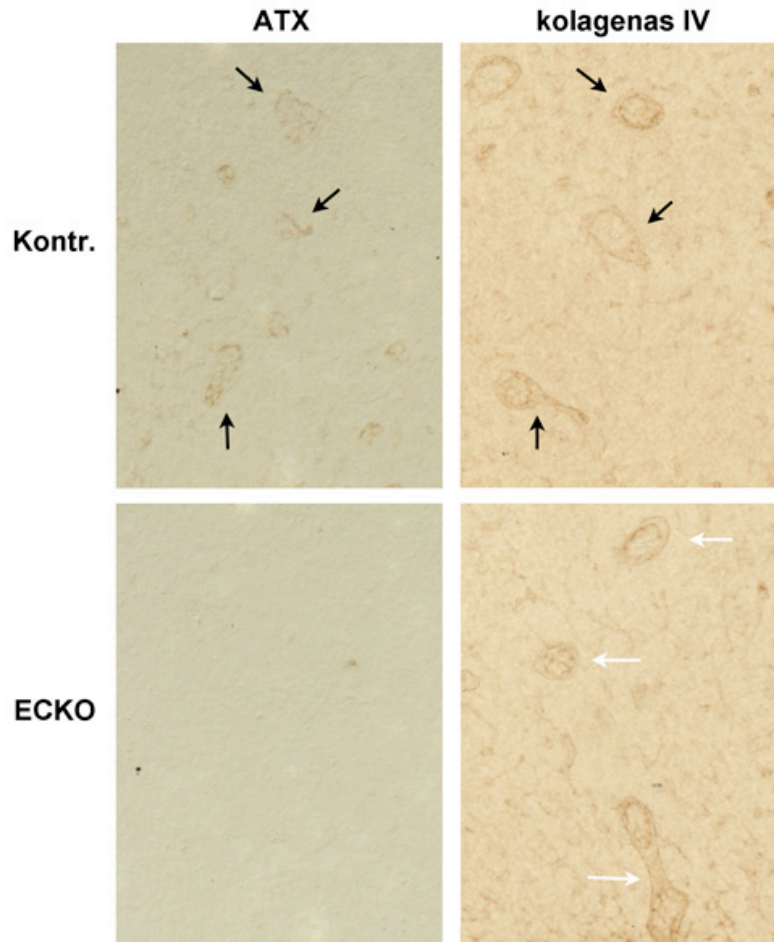
Reikėjo įsitikinti, kad ATX ECKO pelių endotelio ląstelėse išties sumažėjo ATX raiška. Kadangi ATX raiška ypač didelė specializuotų limfmazgių venulių (HEV), per kurių sienelės iš kraujų į limfmazgio vidų patenka limfocitai, endotelio ląstelėse (Kanda ir kt., 2008; Nakasaki ir kt., 2008), imunohistocheminiu metodu palyginome ATX raišką ATX ECKO ir kontrolinių pelių limfmazgių pjūviuose. Atrankiais antikūnais kontrolinių pelių limfmazgių pjūviuose sėkmingai aptikome ATX baltymą (3.22 pav.). Struktūros, ekspresavusios ATX, savo forma priminė kraujagysles. Be to, gretimuose pjūviuose panašios formos ir panašiai išsidėsčiusios struktūros ekspresavo kolageną IV – pamatinės laminos baltymą ir populiarų kraujagyslių žymenį (to paties pjūvio abiem antikūnais nudažyti negalėjome). Kai lygiai taip pat nudažėme ATX ECKO pelių limfmazgių pjūvius, pastebėjome kolageno IV raišką, tačiau ATX nebeaptikome (3.23 pav.). Taip ATX raišką palyginome penkių pelių (3 kontrolinių, 2 ECKO) kaklo ir kirkšnies limfmazgiuose. Nors radome keletą ATX

ECKO kraujagyslių, kurios šiek tiek nusidažė su ATX antikūnais (duomenys neparodyti), didžioji dauguma ATX ECKO kraujagyslių ATX ekspresavo mažiau nei galėjome aptikti. Taigi, sėkmingai išveiklinome *Enpp2* geną endotelio ląstelėse. Verta paminėti, kad limfmazgių periferijoje aptikome pavienių ląstelių ar nedidelių ląstelių grupių, kurios ekspresavo daug ATX, bet nebuvo kraujagyslės (neekspresavo kolageno IV ir buvo kitokios formos). Šias struktūras aptikome tiek kontrolinėse, tiek ir ATX ECKO pelėse (duomenys neparodyti). Tai rodo, kad, kaip ir tikėjomės, *Enpp2* genas nebuvo išveiklintas visose pelės ląstelėse.



3.22 pav. Kontrolinių pelių limfmazgių kraujagyslės ekspresuoja ATX.

Gretimi kontrolinės pelės kaklo limfmazgio pjūviai, nudažyti su ATX (kairėje) ir kolageno IV (dešinėje) antikūnais. Juodos rodyklės rodo kraujagysles, kurios ekspresuoja tiek kolageną IV, tiek ATX. Su žiurkės ir triušio IgG (atitinkamai ATX ir kolageno IV antikūnų izotipo kontrolė) signalo negauta.



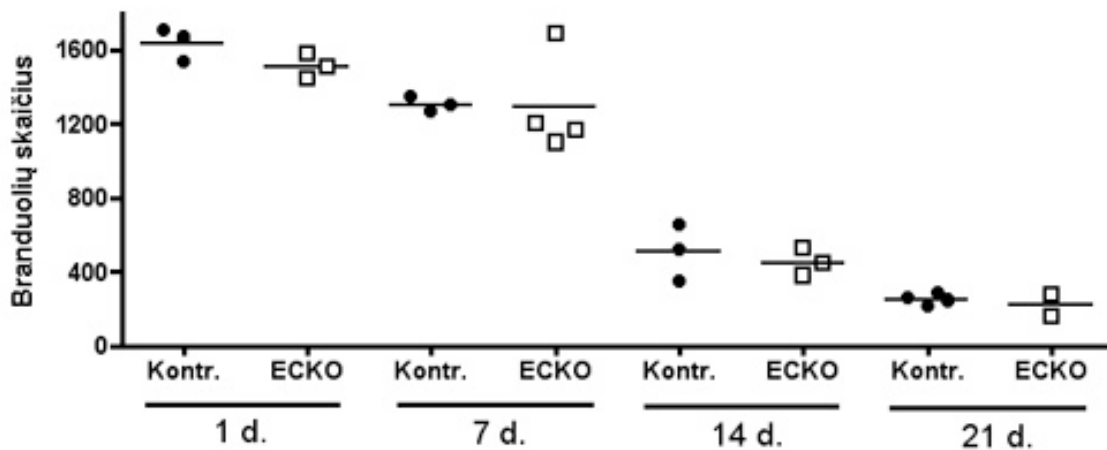
3.23 pav. ATX ECKO pelių limfmazgių kraujagyslėse ATX raiška buvo mažesnė nei galėjome aptikti.

Gretimi kontrolinės pelės (viršutinė eilė) ir ATX ECKO pelės (apatinė eilė) kaklo limfmazgio pjūviai, nudažyti su ATX (kairėje) ir kolageno IV (dešinėje) antikūnais. Juodos rodyklės rodo kontrolinės pelės kraujagysles, kurios ekspresuoja tiek kolageną IV, tiek ATX. Baltos rodyklės rodo ATX ECKO pelės kraujagysles, kurios ekspresuoja kolageną IV, bet neekspresuoja ATX. Su žiurkės ir triušio IgG (atitinkamai ATX ir kolageno IV antikūnų izotipo kontrolė) signalo negauta.

3.3.2 ATX ECKO ir kontrolinių pelių stiklakūnio kraujagyslių regresijos greitis nesiskyrė

Endotelio ATX reikšmei kraujagyslių regresijai įvertinti pasirinkome stiklakūnio kraujagyslių regresiją, kuri plačiau parašyta sk. 1.1.4.1. Trumpai priminsime, kad stiklakūnio kraujagyslės maitina besivystančio embriono akies audinius, o pradėjus augti tinklainės kraujagyslėms palaiptams regresuoja. Peliukų stiklakūnio kraujagyslės regresuoja per pirmas tris savaites po gimimo. Norėdami

palyginti ATX ECKO ir kontrolinių pelių stiklakūnio kraujagyslių regresiją, surinkome 1, 7, 14 ir 21 d. amžiaus pelių akis, paruošėme plonus pjūvius, nudažėme juos hematoksilinu ir eozinu ir 10-yje pjūvių suskaičiavome stiklakūnio kraujagysles sudarančių ląstelių branduolius. ATX ECKO pelės buvo lygintos su tos pačios vados pelėmis, neturinčiomis Cre rekombinazės, bet turinčiomis *loxP* sekas *Enpp2* gene. Sužinojome, kad ATX ECKO ir kontrolinių pelių stiklakūnio kraujagyslės regresavo tiek pat ir tokiu pačiu greičiu (3.24 pav.). Šie duomenys parodė, kad endotelio ląstelių ATX nėra būtinas stiklakūnio kraujagyslių regresijai.



3.24 pav. ATX ECKO ir kontrolinių pelių stiklakūnio kraujagyslių regresijos greitis nesiskyrė.

Nurodyto amžiaus (dienomis) ATX ECKO (□) ir kontrolinių (●) tos pačios vados pelių akių pjūviuose suskaičiuoti stiklakūnio kraujagysles sudarančių ląstelių branduoliai. Kiekvienas simbolis atitinka vieną pelę. Horizontalūs brūkšniai nurodo vidurkį. Skirtumai tarp ATX ECKO ir kontrolinių pelių nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,05$).

3.3.3 ATX ECKO pelių tinklainės kraujagyslių tinklas buvo nepakitęs

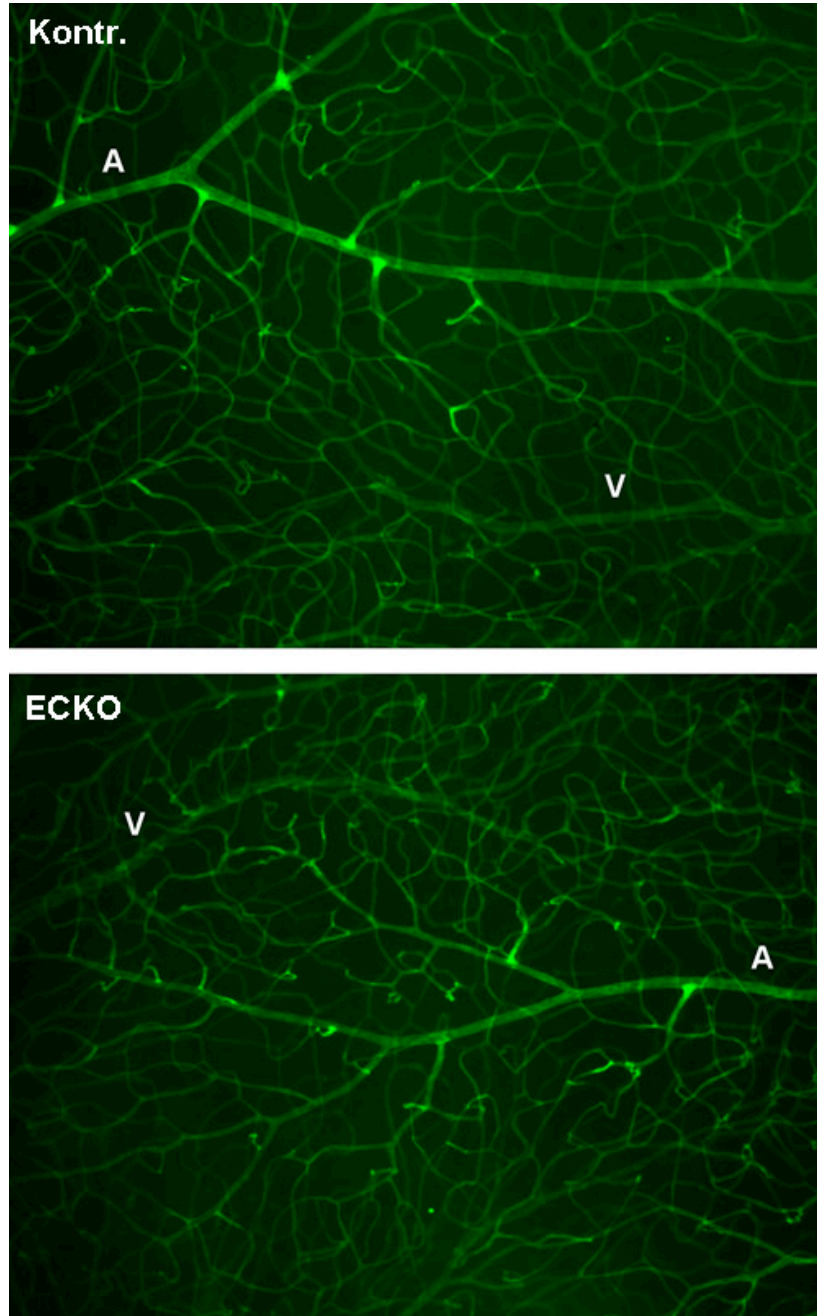
Sužinoję, kad endotelio gaminamas ATX nėra svarbus stiklakūnio kraujagyslių regresijai, nutarėme papildomai įvertinti jo svarbą kitokio kraujagyslių tinklo morfogenezei. Pasirinkome tinklainės kraujagysles. Kaip minėta sk. 1.1.4.1, tinklainės kraujagyslių tinklas formuojasi keliais etapais:

pirmiausia susiformuoja tankus, nediferencijuotas pradinis kraujagyslių tinklas; po to kraujagyslės diferencijuoja į arterijas, venas ir kapiliarus, ir perteklinės kraujagyslių atšakos regresuoja. Nors pagrindinis mūsų darbo tikslas buvo ATX reikšmės regresijai įvertinimas, privalėjome atsižvelgti į tai, kad esama duomenų, jog ATX gali būti svarbus ir kraujagyslių augimui (žiūr. sk. 1.2.5). Tinklainės kraujagyslių stebėjimas mums leido įvertinti abu vyksmus – augimą ir regresiją. Be to, tinklainės kraujagyslių išsidėstymas sluoksniais, lygiagrečiais tinklainės paviršiui, ir tinklainės paruošimo mikroskopijos darbams paprastumas leido smulkiau nei kituose audiniuose ištirti kraujagyslių tinklo struktūrą.

Norėdami įvertinti endotelio ATX reikšmę kraujagyslių tinklo formavimuisi ir brendimui, palyginome suaugusių (3 mėn. amžiaus) ATX ECKO ir kontrolinių pelių tinklainės kraujagyslių tinklo tankį ir struktūrą. Samprotavome, kad jei ATX trūkumas endotelio ląstelėse sutrikdys kraujagyslių augimą, regresiją ar kitus formavimosi ir brendimo procesus, pasibaigus šiems procesams kraujagyslių tinklo tankis ir / arba struktūra turėtų būti pakitę. Surinkę 3 mėn. amžiaus ATX ECKO ir kontrolinių pelių tinklaines, kraujagyslių endotelio ląsteles jose nudažėme fluorescenciškai pažymėtu lektinu IB4-GS. Nufotografavę ir palyginę kraujagyslių tinklus, nepastebėjome esminių skirtumų. Abiejų genotipų pelių kraujagyslių tinklai, kaip ir turi būti, buvo sudaryti iš trijų sluoksnių. Tinklo struktūra buvo panaši; buvo aiškiai matomos arterijos, venos ir kapiliarai (3.25 pav.). Kraujagyslių tinklo tankis buvo iš esmės vienodas (3.26 pav.).

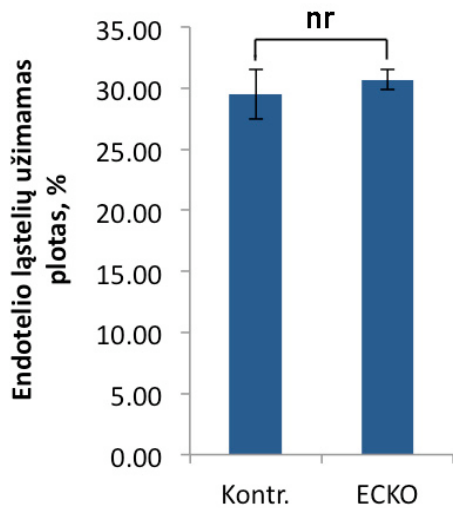
Šie duomenys rodo, kad endotelio ATX nėra būtinas brandaus tinklainės kraujagyslių tinklo susiformavimui. Nors atskirai kraujagyslių augimo ir regresijos tinklainėje netyrėme, ir todėl nežinome, ar endotelio ATX trūkumas šių procesų nesulėtino ar nepagreitino, tokie galimi pokyčiai neturėjo ilgalaikio poveikio. Atsižvelgdami į šiuos ir į stiklakūnio kraujagyslių regresijos duomenis, padarėme išvadą, kad endotelio ląstelių gaminamas ATX fiziologiniam kraujagyslių formavimuisi ir regresijai nėra būtinas.

Kaip tuomet paaiškinti mūsų *in vitro* duomenis ir *in vivo* pastebėjimą, kad stiklakūnio kraujagyslių regresija greičiau vyksta transgeninėse pelėse, gaminančiose daugiau ATX? Gali būti, kad dirbtinai padidintas ATX aktyvumas *in vivo* gali sukelti regresiją, tačiau normali, fiziologinė regresija *in vivo* vyksta nepriklausomai nuo ATX. Taip pat gali būti, kad ATX svarbus *in vivo* regresijai, tačiau endotelio ląstelės nėra svarbus ATX šaltinis. Mūsų *in vitro* modelyje endotelio ląstelių ATX buvo būtinas regresijai, tačiau *in vitro* modelis supaprastintas ir neatitinka visų *in vivo* kraujagyslių formavimosi ir regresijos aspektų. Neseniai susintetinti atrankūs, *in vivo* veikiantys ATX slopikliai (Gupte ir kt., 2011). Planuojame suleisti vieną tokių slopiklių į pelės kraują ir / arba į akies stiklakūnį akies kraujagyslių morfogenezės metu ir taip patikrinti, ar ATX (nepriklausomai nuo to, kokios ląstelės jį gamina) svarbus kraujagyslių formavimuisi ir regresijai.



3.25 pav. ATX ECKO ir kontrolinių pelių tinklainės kraujagyslių tinklai nesiskyrė.

3 mėn. amžiaus kontrolinės pelės (viršuje) ir ATX ECKO pelės (apačioje) tinklainės buvo nudažytos fluorescenciškai pažymėtu lektinu IB4-GS, atrankiu endotelio ląstelėms. A – arterija, V – vena.



3.26 pav. ATX ECKO pelių ir kontrolinių pelių tinklainės kraujagyslių tinklo tankis nesiskyrė.

3 mėn. amžiaus tos pačios vados kontrolinių pelių ir ATX ECKO pelių tinklainės buvo nudažytos fluorescenciškai pažymėtu lektinu IB4-GS, atrankiu endotelio ląstelėms. Endotelio ląstelių užimamas plotas įvertintas vaizdų analizės programa ir išreikštas % viso ploto. Pateikti vidurkiai +/- SN (n=4 pelės kiekvienoje grupėje). nr – statistiškai nereikšminga ($p>0,05$).

Galiausiai neatmetame galimybės, kad ATX nėra svarbus fiziologinei regresijai, bet prisideda prie patologinės regresijos. Tą patikrinsime neišnešiotų naujagimių retinopatijos pelių modelyje, kuriam būdingas patologinių kraujagyslių augimas ir regresija (žiūr. sk. 1.1.4.1). Planuojame sukelti retinopatiją ATX ECKO ir kontrolinėms pelėms, o taip pat gamtinio kamieno pelėms, kurioms suleisime ATX slopiklio. Tikimės, kad šie eksperimentai pateiks galutinį atsakymą, ar ATX svarbus kraujagyslių regresijai *in vivo*.

IŠVADOS

1. Mūsų išvystytoje *in vitro* modelinėje sistemoje pericitai stabilizuoja modelines kraujagysles, skatindami kraujagyslių regresijos / destabilizavimo veiksnio lizofosfatido rūgšties metabolizmą;
2. Pelės su išveiklintu endotelio ląstelių autotaksino genu *Enpp2* yra gyvybingos ir vaisingos;
3. Endotelio ląstelių autotaksino genas *Enpp2* nėra būtinas akies stiklakūnio kraujagyslių regresijai ir brandaus tinklainės kraujagyslių tinklo susiformavimui.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Aclimandos, W. 2011. Seventy years of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol.* 95:899-900.
2. Albers, H.M., A. Dong, L.A. van Meeteren, D.A. Egan, M. Sunkara, E.W. van Tilburg, K. Schuurman, O. van Tellingen, A.J. Morris, S.S. Smyth, W.H. Moolenaar, H. Ovaa. 2010. Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:7257-62.
3. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 2008. Molecular biology of the cell, 5th ed. Garland Science, New York, Abingdon. 1268.
4. Allende, M.L., T. Yamashita, R.L. Proia. 2003. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood.* 102:3665-7.
5. Ando, J., K. Yamamoto. 2011. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal.* 15:1389-403.
6. Andrae, J., R. Gallini, C. Betsholtz. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22:1276-312.
7. Aoki, J., A. Taira, Y. Takanezawa, Y. Kishi, K. Hama, T. Kishimoto, K. Mizuno, K. Saku, R. Taguchi, H. Arai. 2002. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem.* 277:48737-44.
8. Aranda, J., R. Motiejūnaitė, E. Im, A. Kazlauskas. 2012. Diabetes Disrupts the Response of Retinal Endothelial Cells to the Angiomodulator Lysophosphatidic Acid. *Diabetes.* 61:1225-33.
9. Arany, Z., S.Y. Foo, Y. Ma, J.L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S.M. Rangwala, K.H. Baek, A. Rosenzweig, B.M. Spiegelman. 2008. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature.* 451:1008-12.
10. Armulik, A., G. Genové, C. Betsholtz. 2011. Pericytes: developmental, physiological and pathological perspectives, problems and promises. *Dev Cell.* 21:193-215.
11. Armulik, A., G. Genové, M. Mäe, M.H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B.R. Johansson, C. Betsholtz. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 468:557-61.
12. Arroyo, A.G., M.L. Iruela-Arispe. 2010. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res.* 86:226-35.
13. Augustin, H.G., G.Y. Koh, G. Thurston, K. Alitalo. 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:165-77.
14. Ausprunk, D.H., J. Folkman. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 14:53-65.
15. Ausprunk, D.H., K. Falterman, J. Folkman. 1978. The sequence of events in the regression of corneal capillaries. *Lab Invest.* 38:284-94.
16. Bächner, D., M. Ahrens, N. Betat, D. Schröder, G. Gross. 1999. Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev.* 84:121-5.

17. Baker, D.L., D.M. Desiderio, D.D. Miller, B. Tolley, G.J. Tigyi. 2001. Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 292:287-95.
18. Baluk, P., C.G. Lee, H. Link, E. Ator, A. Haskell, J.A. Elias, D.M. McDonald. 2004. Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways. *Am J Pathol.* 165:1071-85.
19. Banfi, A., G. von Degenfeld, R. Gianni-Barrera, S. Reginato, M.J. Merchant, D.M. McDonald, H.M. Blau. 2012. Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB J.* 26:2486-97.
20. Benedito, R., S.F. Rocha, M. Woeste, M. Zamykal, F. Radtke, O. Casanovas, A. Duarte, B. Pytowski, R.H. Adams. 2012. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature.* 484:110-4.
21. Benjamin, L.E., D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, E. Keshet E. 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 103:159-65.
22. Benjamin, L.E., I. Hemo, E. Keshet. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.* 125:1591-8.
23. Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T.H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, D. Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2:737-44.
24. Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland, D. Hanahan. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest.* 111:1287-95.
25. Bréart, B., W.D. Ramos-Perez, A. Mendoza, A.K. Salous, M. Gobert, Y. Huang, R.H. Adams, J.J. Lafaille, D. Escalante-Alcalde, A.J. Morris, S.R. Schwab. 2011. Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress. *J Exp Med.* 208:1267-78.
26. Brindley, D.N. 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem.* 92:900-12.
27. Brindley, D.N., C. Pilquill. 2009. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S225-30.
28. Brown, D.M., M. Michels, P.K. Kaiser, J.S. Heier, J.P. Sy, T. Ianchulev; ANCHOR Study Group. 2009. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology.* 116:57-65.e5.
29. Byrd, N., S. Becker, P. Maye, R. Narasimhaiah, B. St-Jacques, X. Zhang, J. McMahon, A. McMahon, L. Grabel. 2002. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development.* 129:361-72.
30. Cao, R., Y. Xue, E.M. Hedlund, Z. Zhong, K. Tritsarlis, B. Tondelli, F. Lucchini, Z. Zhu, S. Dissing, Y. Cao. 2010. VEGFR1-mediated pericyte ablation links VEGF and PlGF to cancer-associated retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:856-61.

31. Cao, Y. 2010. Angiogenesis: What can it offer for future medicine? *Exp Cell Res.* 316:1304-8.
32. Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 438:932-6.
33. Carmeliet, P., R. Jain. 2011a. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 473:298-307.
34. Carmeliet, P., R.K. Jain. 2011b. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 10:417-27.
35. Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, A. Nagy. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996. 380:435-9.
36. Casteels, I., C. Cassiman, J. Van Calster, K. Allegaert. 2012. Retinopathy of prematurity. *Eur J Pediatr.* 171:887-93.
37. Chen, J., K.M. Connor, C.M. Aderman, L.E. Smith. 2008. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest.* 118:526-33.
38. Chen, J., L.E. Smith. 2007. Retinopathy or prematurity. *Angiogenesis.* 10:133-140.
39. Chen, R.J., S.U. Chen, C.H. Chou, M.C. Lin. 2012. Lysophosphatidic acid receptor 2/3-mediated IL-8-dependent angiogenesis in cervical cancer cells. *Int J Cancer.* 40:1133-41.
40. Cheung, N., P. Mitchell, T.Y. Wong. 2010. Diabetic retinopathy. *Lancet.* 376:124-36.
41. Chiu, J.J., S. Chien. 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev.* 91:327-87.
42. Claxton, S., M. Fruttiger. 2003. Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration. *Exp Eye Res.* 77:305-11.
43. Connor, K.M., N.M. Krahe, R.J. Dennison, C.M. Aderman, J. Chen, K.I. Guerin, P. Sapienza, A. Stahl, K.L. Willett, L.E. Smith. 2009. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc.* 4:1565-73.
44. Contos, J.J., N. Fukushima, J.A. Weiner, D. Kaushal, J. Chun. 2000. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13384-9.
45. Cooke, V.G., V.S. LeBleu, D. Keskin, Z. Khan, J.T. O'Connell, Y. Teng, M.B. Duncan, L. Xie, G. Maeda, S. Vong, H. Sugimoto, R.M. Rocha, A. Damascena, R.R. Brentani, R. Kalluri. 2012. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell.* 21:66-81.
46. Corselli, M., C.W. Chen, M. Crisan, L. Lazzari, B. Péault. 2010. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:1104-9.
47. Costa, C., J. Incio, R. Soares. 2007. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis.* 10:149-66.

48. Cox, C.M., T.J. Poole. 2000. Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. *Dev Dyn.* 218:371-82.
49. Daneman, R., L. Zhou, A.A. Kebede, B.A. Barres. 2010. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 468:562-6.
50. Darland, D.C., L.J. Massingham, S.R. Smith, E. Piek, M. Saint-Geniez, P.A. D'Amore. 2003. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol.* 264:275-88.
51. David, M., J. Ribeiro, F. Descotes, C.M. Serre, M. Barbier, M. Murone, P. Clézardin, O. Peyruchaud. 2012. Targeting lysophosphatidic acid receptor type 1 with Debio 0719 inhibits spontaneous metastasis dissemination of breast cancer cells independently of cell proliferation and angiogenesis. *Int J Oncol.* 40:1133-41.
52. de Lange, W.J., C.M. Halabi, A.M. Beyer, C.D. Sigmund. 2008. Germ cell inactivation of the Tie2 and SMMHC promoters causes noncell-specific deletion of floxed alleles. *Physiol Genomics.* 35:1-4.
53. Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, B.M. Weinstein. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell.* 16:209-21.
54. del Toro, R., C. Prahst, T. Mathivet, G. Siegfried, J.S. Kaminker, B. Larrivee, C. Breant, A. Duarte, N. Takakura, A. Fukamizu, J. Penninger, A. Eichmann. 2010. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood.* 116:4025-33.
55. Dela Paz, N.G., T.E. Walshe, L.L. Leach, M. Saint-Geniez, P.A. D'Amore. 2012. Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. *J Cell Sci.* 125:831-43.
56. Díaz-Flores, L., R. Gutiérrez, J.F. Madrid, H. Varela, F. Valladares, E. Acosta, P. Martín-Vasallo, L. Díaz-Flores Jr. 2009. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol.* 24:909-69.
57. Dickson, M.C., J.S. Martin, F.M. Cousins, A.B. Kulkarni, S. Karlsson, R.J. Akhurst. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development.* 121:1845-54.
58. Diez-Roux, G., M. Argilla, H. Makarenkova, K. Ko, R.A. Lang. 1999. Macrophages kill capillary cells in G1 phase of the cell cycle during programmed vascular regression. *Development.* 126:2141-7.
59. Dohi, T., K. Miyauchi, R. Ohkawa, K. Nakamura, T. Kishimoto, T. Miyazaki, A. Nishino, N. Nakajima, K. Yaginuma, H. Tamura, T. Kojima, K. Yokoyama, T. Kurata, K. Shimada, Y. Yatomi, H. Daida. 2012. Increased circulating plasma lysophosphatidic acid in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta.* 413:207-12.
60. Doi, H., T. Iso, H. Sato, M. Yamazaki, H. Matsui, T. Tanaka, I. Manabe, M. Arai, R. Nagai, M. Kurabayashi. 2006. Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway. *J Biol Chem.* 281:28555-64.

61. Domenga, V., P. Fardoux, P. Lacombe, M. Monet, J. Maciazek, L.T. Krebs, B. Klonek, E. Berrou, M Mericskay, Z. Li, E. Tournier-Lasserre, T. Gridley, A. Joutel. 2004. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 18:2730-5.
62. Dusaulcy, R., C. Rancoule, S. Grès, E. Wanecq, A. Colom, C. Guigné, L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache. 2011. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res.* 52:1247-55.
63. Dyer, M.A., S.M. Farrington, D. Mohn, J.R. Munday, M.H. Baron. 2001. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development.* 128:1717-30.
64. Eberth, C.J. 1871. Handbuch der Lehre von der Gewegen des Menschen und der Tiere, Bd. 1. Leipzig.
65. Enge, M., M. Bjarnegård, H. Gerhardt, E. Gustafsson, M. Kalén, N. Asker, H.P. Hammes, M. Shani, R. Fässler, C. Betsholtz. 2002. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J.* 21:4307-16.
66. Escalante-Alcalde, D., L. Hernandez, H. Le Stunff, R. Maeda, H.S. Lee, Jr-Gang-Cheng, V.A. Sciorra, I. Daar, S. Spiegel, A.J. Morris, C.L. Stewart. 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development.* 130:4623-37.
67. Evensen, L., D.R. Micklem, A. Blois, S.V. Berge, N. Aarsaether, A. Littlewood-Evans, J. Wood, J.B. Lorens. 2009. Mural cell associated VEGF is required for organotypic vessel formation. *PLoS One.* 4:e5798.
68. Fabian, S.L., R.R. Penchev, B. St-Jacques, A.N. Rao, P. Sipilä, K.A. West, A.P. McMahon, B.D. Humphreys. 2012. Hedgehog-Gli pathway activation during kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 180:1441-53.
69. Falcón, B.L., H. Hashizume, P. Koumoutsakos, J. Chou, J.V. Bready, A. Coxon, J.D. Oliner, D.M. McDonald. 2009. Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am J Pathol.* 175:2159-70.
70. Fang, S., P. Salven. 2011. Stem cells in tumor angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 50:290-5.
71. Federico, L., H. Ren, P.A. Mueller, T. Wu, S. Liu, J. Popovic, E.M. Blalock, M. Sunkara, H. Ovaa, H.M. Albers, G.B. Mills, A.J. Morris, S.S. Smyth. 2012. Autotaxin and Its Product Lysophosphatidic Acid Suppress Brown Adipose Differentiation and Promote Diet-Induced Obesity in Mice. *Mol Endocrinol.* 26:786-97.
72. Feng, Y., F. vom Hagen, F. Pfister, S. Djokic, S. Hoffmann, W. Back, P. Wagner, J. Lin, U. Deutsch, H.P. Hammes. 2007. Impaired pericyte recruitment and abnormal retinal angiogenesis as a result of angiopoietin-2 overexpression. *Thromb Haemost.* 97:99-108.
73. Ferrara, N. 2009. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 20:158-63.

74. Ferry, G., E. Tellier, A. Try, S. Grés, I. Naime, M.F. Simon, M. Rodriguez, J. Boucher, I. Tack, S. Gesta, P. Chomarat, M. Dieu, M. Raes, J.P. Galizzi, P. Valet, J.A. Boutin, J.S. Saulnier-Blache. 2003. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem.* 278:18162-9.
75. Fiedler, U., H.G. Augustin. 2006. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol.* 27:552-8.
76. Finck, B.N., D.P. Kelly. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 116:615-22.
77. Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 281:1182-6.
78. Fong, G.H. 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med (Berl).* 87:549-60.
79. Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, M.L. Breitman. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 376:66-70.
80. Fong, G.H., L. Zhang, D.M. Bryce, J. Peng. 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 126:3015-25.
81. Fourcade, O., M.F. Simon, C. Viodé, N. Rugani, F. Leballe, A. Ragab, B. Fournié, L. Sarda, H. Chap. 1995. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* 80:919-27.
82. Fraisl, P., M. Mazzone, T. Schmidt, P. Carmeliet. 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell.* 16:167-79.
83. Franco, M., P. Roswall, E. Cortez, D. Hanahan, K. Pietras. 2011. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood.* 118:2906-17.
84. Frank, R.N. 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 350:48-58.
85. Frontini, M.J., Z. Nong, R. Gros, M. Drangova, C. O'Neil, M.N. Rahman, O. Akawi, H. Yin, C.G. Ellis, J.G. Pickering. 2011. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells. *Nat Biotechnol.* 29:421-7.
86. Fruttiger, M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis.* 10:77-88.
87. Fulkerson, Z., T. Wu, M. Sunkara, C.V. Kooi, A.J. Morris, S.S. Smyth. 2011. Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *J Biol Chem.* 286:34654-63.
88. Furuta, D., M. Yamane, T. Tsujiuchi, R. Moriyama, N. Fukushima. 2012. Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA(3). *Mol Cell Neurosci.* 50:21-34.
89. Gaengel, K., G. Genové, A. Armulik, C. Betsholtz. 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:630-8.

90. Gale, N.W., G. Thurston, S.F. Hackett, R. Renard, Q. Wang, J. McClain, C. Martin, C. Witte, M.H. Witte, D. Jackson, C. Suri, P.A. Campochiaro, S.J. Wiegand, G.D. Yancopoulos. 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell.* 3:411-23.
91. Gavard, J., V. Patel, J.S. Gutkind. 2008. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell.* 14:25-36.
92. Gerhardt, H., C. Betsholtz. 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314:15-23.
93. Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, C. Betsholtz. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 161:1163-77.
94. Geudens, I., H. Gerhardt. 2011. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development.* 138:4569-83.
95. Giganti, A., M. Rodriguez, B. Fould, N. Moulharat, F. Cogé, P. Chomarat, J.P. Galizzi, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, J.A. Boutin, G. Ferry. 2008. Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem.* 283:7776-89.
96. Goede, V., T. Schmidt, S. Kimmina, D. Kozian, H.G. Augustin. 1998. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest.* 78:1385-94.
97. Goel, S., D.G. Duda, L. Xu, L.L. Munn, Y. Boucher, D. Fukumura, R.K. Jain. 2011. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 91:1071-121.
98. Gotoh, M., Y. Fujiwara, J. Yue, J. Liu, S. Lee, J. Fells, A. Uchiyama, K. Murakami-Murofushi, S. Kennel, J. Wall, R. Patil, R. Gupte, L. Balazs, D.D. Miller, G.J. Tigyi. 2012. Controlling cancer through the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis. *Biochem Soc Trans.* 40:31-6.
99. Greenberg, J.I., D.J. Shields, S.G. Barillas, L.M. Acevedo, E. Murphy, J. Huang, L. Scheppeke, C. Stockmann, R.S. Johnson, N. Angle, D.A. Cheresh. 2008. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 456:809-13.
100. Gupte, R., R. Patil, J. Liu, Y. Wang, S.C. Lee, Y. Fujiwara, J. Fells, A.L. Bolen, K. Emmons-Thompson, C.R. Yates, A. Siddam, N. Panupinthu, T.C. Pham, D.L. Baker, A.L. Parrill, G.B. Mills, G. Tigyi, D.D. Miller. 2011. Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity. *ChemMedChem.* 6:922-35.
101. Hackett, S.F., S. Wiegand, G. Yancopoulos, P.A. Campochiaro. 2002. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J Cell Physiol.* 192:182-7.
102. Hainsworth, J.D., D.R. Spigel, J.A. Sosman, H.A. Burris 3rd, C. Farley, H. Cucullu, K. Yost, L.L. Hart, L. Sylvester, D.M. Waterhouse, F.A. Greco. 2007. Treatment of advanced renal cell carcinoma with the combination bevacizumab/erlotinib/imatinib: a phase I/II trial. *Clin Genitourin Cancer.* 5:427-32.

103. Hallmann, R., N. Horn, M. Selg, O. Wendler, F. Pausch, L.M. Sorokin. 2005. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 85:979-1000.
104. Hama, K., J. Aoki. 2010. LPA(3), a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res.* 49:335-42.
105. Hammes, H.P., J. Lin, P. Wagner, Y. Feng, F. Vom Hagen, T. Krzizok, O. Renner, G. Breier, M. Brownlee, U. Deutsch. 2004. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes.* 53:1104-10.
106. Hamzah, J., M. Jugold, F. Kiessling, P. Rigby, M. Manzur, H.H. Marti, T. Rabie, S. Kaden, H.J. Gröne, G.J. Hämmerling, B. Arnold, R. Ganss. 2008. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature.* 453:410-4.
107. Hashimoto, T., S. Okudaira, K. Igarashi, K. Hama, Y. Yatomi, J. Aoki. 2012. Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATX δ , with a four-amino acid deletion. *J Biochem.* 151:89-97.
108. Hausmann, J., S. Kamtekar, E. Christodoulou, J.E. Day, T. Wu, Z. Fulkerson, H.M. Albers, L.A. van Meeteren, A.J. Houben, L. van Zeijl, S. Jansen, M. Andries, T. Hall, L.E. Pegg, T.E. Benson, M. Kasiem, K. Harlos, C.W. Kooi, S.S. Smyth, H. Ovaa, M. Bollen, A.J. Morris, W.H. Moolenaar, A. Perrakis. 2011. Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol.* 18:198-204.
109. Helfrich, I., I. Scheffrahn, S. Bartling, J. Weis, V. von Felbert, M. Middleton, M. Kato, S. Ergün, D. Schadendorf. 2010. Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation of malignant melanoma. *J Exp Med.* 207:491-503.
110. Hellström, A., E. Engström, A.L. Hård, K. Albertsson-Wikland, B. Carlsson, A. Niklasson, C. Löfqvist, E. Svensson, S. Holm, U. Ewald, G. Holmström, L.E. Smith. 2003. Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. *Pediatrics.* 112:1016-20.
111. Hellström, M., H. Gerhardt, M. Kalen, X. Li, U. Eriksson, H. Wolburg, C. Betsholtz. 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 153:543-53.
112. Hellström, M., L.K. Phng, J.J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A.K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M.L. Iruela-Arispe, M. Kalén, H. Gerhardt, C. Betsholtz. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature.* 445:776-80.
113. Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, P.A. D'Amore. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol.* 141:805-14.
114. Hla, T., V. Brinkmann. 2011. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology.* 76:S3-8.
115. Houben, A.J., W.H. Moolenaar. 2011. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30:557-65.

116. Huang, H., S. Van de Veire, M. Dalal, R. Parlier, R.D. Semba, P. Carmeliet, S.A. Vinorel. 2011. Reduced retinal neovascularization, vascular permeability, and apoptosis in ischemic retinopathy in the absence of prolyl hydroxylase-1 due to the prevention of hyperoxia-induced vascular obliteration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52:7565-73.
117. Humtsoe, J.O., M. Liu, A.B. Malik, K.K. Wary. 2010. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol Cell Biol.* 30:1593-606.
118. Im, E., A. Kazlauskas. 2006a. New insights regarding vessel regression. *Cell Cycle.* 5:2057-9.
119. Im, E., A. Kazlauskas. 2006b. Regulating angiogenesis at the level of PtdIns-4,5-P2. *EMBO J.* 25:2075-82.
120. Im, E., A. Kazlauskas. 2007. Src family kinases promote vessel stability by antagonizing the Rho/ROCK pathway. *J Biol Chem.* 282:29122-9.
121. Im, E., R. Motiejūnaitė, J. Aranda, E.Y. Park, L. Federico, T.I. Kim, T. Clair, M.L. Stracke, S. Smyth, A. Kazlauskas. 2010. Phospholipase Cgamma activation drives increased production of autotaxin in endothelial cells and lysophosphatidic acid-dependent regression. *Mol Cell Biol.* 30:2401-10.
122. Inai, T., M. Mancuso, H. Hashizume, F. Baffert, A. Haskell, P. Baluk, D.D. Hu-Lowe, D.R. Shalinsky, G. Thurston, G.D. Yancopoulos, D.M. McDonald. 2004. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol.* 165:35-52.
123. Inoue, A., N. Arima, J. Ishiguro, G.D. Prestwich, H. Arai, J. Aoki. 2011. LPA-producing enzyme PA-PLA1 α regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J.* 30:4248-60.
124. Ito, M., M. Yoshioka. 1999. Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anat Embryol.* 200:403-11.
125. Jack, R.L. 1972. Regression of the hyaloid vascular system. An ultrastructural analysis. *Am J Ophthalmol.* 74:261-72.
126. Jain, R.K. 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 7:987-9.
127. Jakobsson, L., C.A. Franco, K. Bentley, R.T. Collins, B. Ponsioen, I.M. Aspalter, I. Rosewell, M. Busse, G. Thurston, A. Medvinsky, S. Schulte-Merker, H. Gerhardt. 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* 12:943-53.
128. Jansen, S., C. Stefan, J.W. Creemers, E. Waelkens, A. Van Eynde, W. Stalmans, M. Bollen. 2005. Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *J Cell Sci.* 118:3081-9.
129. Jansen, S., N. Callewaert, I. Dewerte, M. Andries, H. Ceulemans, M. Bollen. 2007. An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-D. *J Biol Chem.* 282:11084-91.
130. Jasinska, R., Q.X. Zhang, C. Pilquil, I. Singh, J. Xu, J. Dewald, D.A. Dillon, L.G. Berthiaume, G.M. Carman, D.W. Waggoner, D.N. Brindley. 1999. Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *Biochem J.* 340 (Pt 3):677-86.

131. Jeansson, M., A. Gawlik, G. Anderson, C. Li, D. Kerjaschki, M. Henkelman, S.E. Quaggin. 2011. Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J Clin Invest.* 121:2278-89.
132. Jeon, B.H., F. Khanday, S. Deshpande, A. Haile, M. Ozaki, K. Irani. 2003. Tying the antiinflammatory effect of angiopoietin-1 to inhibition of NF-kappaB. *Circ Res.* 92:586-8.
133. Jin, S., E.M. Hansson, S. Tikka, F. Lanner, C. Sahlgren, F. Farnebo, M. Baumann, H. Kalimo, U. Lendahl. 2008. Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 102:1483-91.
134. Johnson, C., H.-J. Sung, S.M. Lessner, M. E. Fini, Z.S. Galis. 2004. Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Adequate Angiogenic Revascularization of Ischemic Tissues: Potential Role in Capillary Branching. *Circ Res.* 94:262-68.
135. Jurasz, P., D. Alonso, S. Castro-Blanco, F. Murad, M.W. Radomski. 2003. Generation and role of angiostatin in human platelets. *Blood.* 102:3217-23.
136. Kale, S., J. Hanai, B. Chan, A. Karihaloo, G. Grotendorst, L. Cantley, V.P. Sukhatme. 2005. Microarray analysis of in vitro pericyte differentiation reveals an angiogenic program of gene expression. *FASEB J.* 19:270-1.
137. Kanda, H., R. Newton, R. Klein, Y. Morita, M.D. Gunn, S.D. Rosen. 2008. Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol.* 9:415-23.
138. Kashiwagi, S., K. Tsukada, L. Xu, J. Miyazaki, S.V. Kozin, J.A. Tyrrell, W.C. Sessa, L.E. Gerweck, R.K. Jain, D. Fukumura. 2008. Perivascular nitric oxide gradients normalize tumor vasculature. *Nat Med.* 14:255-7.
139. Katare, R., F. Riu, K. Mitchell, M. Gubernator, P. Campagnolo, Y. Cui, O. Fortunato, E. Avolio, D. Cesselli, A. P. Beltrami, G. Angelini, C. Emanuelli, P. Madeddu. 2011. Transplantation of Human Pericyte Progenitor Cells Improves the Repair of Infarcted Heart Through Activation of an Angiogenic Program Involving Micro-RNA-132. *Circ Res.* 109:894-906.
140. Kato, M., M.S. Patel, R. Levasseur, I. Lobov, B.H. Chang, D.A. Glass 2nd, C. Hartmann, L. Li, T.H. Hwang, C.F. Brayton, R.A. Lang, G. Karsenty, L. Chan. 2002. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* 157:303-14.
141. Kerbel, R.S. 2008. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 358:2039-49.
142. Kida, Y., J.S. Duffield. 2011. Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 38:417-23.
143. Kisanuki, Y.Y., R.E. Hammer, J. Miyazaki, S.C. Williams, J.A. Richardson, M. Yanagisawa. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol.* 230:230-42.
144. Koike, S., Y. Yutoh, K. Keino-Masu, S. Noji, M. Masu, H. Ohuchi. 2011. Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Dev Dyn.* 240:413-21.
145. Kume, K., T. Shimizu. 1997. cDNA cloning and expression of murine 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 237:663-6.

146. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:690-85.
147. Lang, R., M. Lustig, F. Francois, M. Sellinger, H. Plesken. 1994. Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling. *Development*. 120:3395-403.
148. Lang, R.A., J.M. Bishop. 1993. Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell*. 74:453-62.
149. Lange, C., C. Ehlken, A. Stahl, G. Martin, L. Hansen, H.T. Agostini. 2009. Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 247:1205-11.
150. Lassaletta, A.D., L.M. Chu, F.W. Sellke. 2011. Therapeutic neovascularization for coronary disease: current state and future prospects. *Basic Res Cardiol*. 106:897-909.
151. Leveen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, C. Betsholtz. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev*. 8:1875-87.
152. Li Calzi, S., M.B. Neu, L.C. Shaw, J.L. Kielczewski, N.I. Moldovan, M.B. Grant. 2010. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res*. 79:207-16.
153. Li, F., Y. Lan, Y. Wang, J. Wang, G. Yang, F. Meng, H. Han, A. Meng, Y. Wang, X. Yang. 2011. Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch. *Dev Cell*. 20:291-302.
154. Li, Z., M. Mericskay, O. Agbulut, G. Butler-Browne, L. Carlsson, L.E. Thornell, C. Babinet, D. Paulin. 1997. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol*. 139:129-144.
155. Lin, M.E., D.R. Herr, J. Chun. 2010. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 91:130-8.
156. Lin, S., D. Wang, S. Iyer, A.M. Ghaleb, H. Shim, V.W. Yang, J. Chun, C.C. Yun. 2009. The absence of LPA2 attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer. *Gastroenterology*. 136:1711-20.
157. Lin, S.L., F.C. Chang, C. Schrimpf, Y.T. Chen, C.F. Wu, V.C. Wu, W.C. Chiang, F. Kuhnert, C.J. Kuo, Y.M. Chen, K.D. Wu, T.J. Tsai, J.S. Duffield. 2011. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol*. 178:911-23.
158. Lin, S.L., T. Kisseleva, D.A. Brenner, J.S. Duffield. 2008. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*. 173:1617-27.
159. Lindahl, P., B.R. Johansson, P. Leveen, C. Betsholtz. 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 277:242-45.
160. Lindblom, P., H. Gerhardt, S. Liebner, A. Abramsson, M. Enge, M. Hellstrom, G. Backstrom, S. Fredriksson, U. Landegren, H.C. Nystrom, G. Bergstrom, E. Dejana, A. Ostman, P. Lindahl, C. Betsholtz. 2003. Endothelial PDGF-B

- retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.* 17:1835-40.
161. Liu, H., S. Kennard, B. Lilly. 2009. NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circ Res.* 104:466-75.
 162. Liu, S., M. Umezu-Goto, M. Murph, Y. Lu, W. Liu, F. Zhang, S. Yu, L.C. Stephens, X. Cui, G. Murrow, K. Coombes, W. Muller, M.C. Hung, C.M. Perou, A.V. Lee, X. Fang, G.B. Mills. 2009. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell.* 15:539-50.
 163. Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C.X. Deng, J.P. Hobson, H.M. Rosenfeldt, V.E. Nava, S.S. Chae, M.J. Lee, C.H. Liu, T. Hla, S. Spiegel, R.L. Proia. 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 106:951-61.
 164. Lobov, I.B., E. Cheung, R. Wudali, J. Cao, G. Halasz, Y. Wei, A. Economides, H.C. Lin, N. Papadopoulos, G.D. Yancopoulos, S.J. Wiegand. 2011. The Dll4/Notch pathway controls postangiogenic blood vessel remodeling and regression by modulating vasoconstriction and blood flow. *Blood.* 117:6728-37.
 165. Lobov, I.B., P.C. Brooks, R.A. Lang. 2002. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11205-10.
 166. Lobov, I.B., R.A. Renard, N. Papadopoulos, N.W. Gale, G. Thurston, G.D. Yancopoulos, S.J. Wiegand. 2007. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3219-24.
 167. Lobov, I.B., S. Rao, T.J. Carroll, J.E. Vallance, M. Ito, J.K. Ondr, S. Kurup, D.A. Glass, M.S. Patel, W. Shu, E.E. Morrisey, A.P. McMahon, G. Karsenty, R.A. Lang. 2005. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature.* 437:417-21.
 168. London, N.R., K.J. Whitehead, D.Y. Li. 2009. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis.* 12:149-58.
 169. López-Juárez, A., S. Morales-Lázaro, R. Sánchez-Sánchez, M. Sunkara, H. Lomelí, I. Velasco, A.J. Morris, D. Escalante-Alcalde. 2011. Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. *Glia.* 59:577-89.
 170. Lu, Y., W. Lemon, P.Y. Liu, Y. Yi, C. Morrison, P. Yang, Z. Sun, J. Szoke, W.L. Gerald, M. Watson, R. Govindan, M. You. 2006. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med.* 3:e467.
 171. Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 277:55-60.
 172. Makanya, A.N., R. Hlushchuk, V.G. Djonov. 2009. Intussusceptive angiogenesis and its role in vacular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis.* 12:113-23.

173. Mandarino, L.J., N. Sundarraj, J. Finlayson, H.R. Hassell. 1993. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res.* 57:609-21.
174. Mataftsi, A., S.A. Dimitrakos, G.G. Adams. 2011. Mediators involved in retinopathy of prematurity and emerging therapeutic targets. *Early Hum Dev.* 87:683-90.
175. Mathiisen, T.M., K.P. Lehre, N.C. Danbolt, O.P. Ottersen. 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* 58:1094-103.
176. Mazzone, M., D. Dettori, R. Leite de Oliveira, S. Loges, T. Schmidt, B. Jonckx, Y.M. Tian, A.A. Lanahan, P. Pollard, C. Ruiz de Almodovar, F. De Smet, S. Vinckier, J. Aragonés, K. Debackere, A. Lutun, S. Wyns, B. Jordan, A. Pisacane, B. Gallez, M.G. Lampugnani, E. Dejana, M. Simons, P. Ratcliffe, P. Maxwell, P. Carmeliet. 2009. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell.* 136:839-51.
177. McLeod, D.S., R. Brownstein, G.A. Luty. 1996. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:300-11.
178. McDermott, M.I., Y.J. Sigal, J.S. Crump, A.J. Morris. 2006. Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases. *Methods.* 39:169-79.
179. Meeson, A., M. Palmer, M. Calton, R. Lang. 1996. A relationship between apoptosis and flow during programmed capillary regression is revealed by vital analysis. *Development.* 122: 3929-38.
180. Mizugishi, K., T. Yamashita, A. Olivera, G.F. Miller, S. Spiegel, R.L. Proia. 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* 25:11113-21.
181. Monés, J. 2011. A review of ranibizumab clinical trial data in exudative age-related macular degeneration and how to translate it into daily practice. *Ophthalmologica.* 225:112-9.
182. Moolenaar, W.H., A. Perrakis. 2011. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:674-9.
183. Moolenaar, W.H., T. Hla. 2012. SnapShot: Bioactive lysophospholipids. *Cell.* 148:378-378.e2.
184. Moransard, M., A. Dann, O. Staszewski, A. Fontana, M. Prinz, T. Suter. 2011. NG2 expressed by macrophages and oligodendrocyte precursor cells is dispensable in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 134:1315-30.
185. Morris, A.J., S. Selim, A. Salous, S.S. Smyth. 2009. Blood relatives: dynamic regulation of bioactive lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate metabolism in the circulation. *Trends Cardiovasc Med.* 19:135-40.
186. Morris, K.E., L.M. Schang, D.N. Brindley. 2006. Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *J Biol Chem.* 281:9297-306.
187. Murakami, M. 2012. Signaling required for blood vessel maintenance: molecular basis and pathological manifestations. *Int J Vasc Med.* 2012:293641.
188. Murata, J., H.Y. Lee, T. Clair, H.C. Krutzsch, A.A. Arestad, M.E. Sobel, L.A. Liotta, M.L. Stracke. 1994. cDNA cloning of the human tumor motility-

- stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem.* 269:30479-84.
189. Murfee, W.L., M.R. Rehorn, S.N. Peirce, T.C. Skalak. 2006. Perivascular cells along venules upregulate NG2 expression during microvascular remodeling. *Microcirculation.* 13:261-73.
 190. Murfee, W.L., T.C. Skalak, S.M. Peirce. 2005. Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation.* 12:151-60.
 191. Nagy, J.A., A.M. Dvorak, H.F. Dvorak. 2007. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2:251-75.
 192. Nakanaga, K., K. Hama, J. Aoki. 2010. Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem.* 148:13-24.
 193. Nakasaki, T., T. Tanaka, S. Okudaira, M. Hirosawa, E. Umemoto, K. Otani, S. Jin, Z. Bai, H. Hayasaka, Y. Fukui, K. Aozasa, N. Fujita, T. Tsuruo, K. Ozono, J. Aoki, M. Miyasaka. 2008. Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am J Pathol.* 173:1566-76.
 194. Nam, S.W., T. Clair, C.K. Campo, H.Y. Lee, L.A. Liotta, M.L. Stracke. 2000. Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene.* 19:241-7.
 195. Nam, S.W., T. Clair, Y.S. Kim, A. McMarlin, E. Schiffmann, L.A. Liotta, M.L. Stracke. 2001. Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res.* 61:6938-44.
 196. Nasarre, P., M. Thomas, K. Kruse, I. Helfrich, V. Wolter, C. Deppermann, D. Schadendorf, G. Thurston, U. Fiedler, H.G. Augustin. 2009. Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. *Cancer Res.* 69:1324-33.
 197. Nayak, R.C., A.B. Berman, K.L. George, G.S. Eisenbarth, and G.L. King. 1988. A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes. *J Exp Med.* 167:1003-15.
 198. Nielsen, C.M., S.M. Dymecki. 2010. Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus. *Dev Biol.* 340:430-7.
 199. Nikitopoulou, I., N. Oikonomou, E. Karouzakis, I. Sevastou, N. Nikolaidou-Katsaridou, Z. Zhao, V. Mersinias, M. Armaka, Y. Xu, M. Masu, G.B. Mills, S. Gay, G. Kollias, V. Aidinis. 2012. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med.* 209:925-33.
 200. Nisancioglu, M.H., C. Betsholtz, G. Genové. 2010. The absence of pericytes does not increase the sensitivity of tumor vasculature to vascular endothelial growth factor-A blockade. *Cancer Res.* 70:5109-15.
 201. Nishimasu, H., R. Ishitani, J. Aoki, O. Nureki. 2012. A 3D view of autotaxin. *Trends Pharmacol Sci.* 33:138-45.
 202. Nishimasu, H., S. Okudaira, K. Hama, E. Mihara, N. Dohmae, A. Inoue, R. Ishitani, J. Takagi, J. Aoki, O. Nureki. 2011. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol.* 18:205-12.
 203. Nombela-Arrieta, C., J. Ritz, L.E. Silberstein. 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:126-31.

204. Offermanns, S., V. Mancino, J.P. Revel, M.I. Simon. 1997. Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science*. 275:533-6.
205. Olsson, A.K., A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:359-71.
206. Oshima, M., H. Oshima, M.M. Taketo. 1996. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*. 179:297-302.
207. Oshima, Y., S. Oshima, H. Nambu, S. Kachi, K. Takahashi, N. Umeda, J. Shen, A. Dong, R.S. Apte, E. Duh, S.F. Hackett, G. Okoye, K. Ishibashi, J. Handa, M. Melia, S. Wiegand, G. Yancopoulos, D.J. Zack, P.A. Campochiaro. 2005. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB J*. 19:963-5.
208. Paik, J.H., A. Skoura, S.S. Chae, A.E. Cowan, D.K. Han, R.L. Proia, T. Hla. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev*. 18:2392-403.
209. Pamuklar, Z., L. Federico, S. Liu, M. Umez-Goto, A. Dong, M. Panchatcharam, Z. Fulkerson, E. Berdyshev, V. Natarajan, X. Fang, L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, G.B. Mills, A.J. Morris, S.S. Smyth. 2009. Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem*. 284:7385-94.
210. Panetti, T.S., J. Nowlen, D.F. Mosher. 2000. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:1013-19.
211. Parmar, K.M., H.B. Larman, G. Dai, Y. Zhang, E.T. Wang, S.N. Moorthy, J.R. Kratz, Z. Lin, M.K. Jain, M.A. Gimbrone Jr, G. García-Cardeña. 2006. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest*. 116:49-58.
212. Patel-Hett, S., P.A. D'Amore. 2011. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 55:353-63.
213. Paulsson, M. 1992. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 27:93-127.
214. Pearson, J.D. 2000. Normal endothelial cell function. *Lupus*. 2000:183-8.
215. Phng, L.K., M. Potente, J.D. Leslie, J. Babbage, D. Nyqvist, I. Lobov, J.K. Ondr, S. Rao, R.A. Lang, G. Thurston, H. Gerhardt. 2009. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell*. 16:70-82.
216. Pierce, E.A., E.D. Foley, L.E. Smith. 1996. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*. 114:1219-28.
217. Potente, M., H. Gerhardt, P. Carmeliet. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 146:873-87.
218. Pyne, S., K.C. Kong, P.I. Darroch. 2004. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol*. 15:491-501.

219. Rajappa, M., P. Saxena, J. Kaur. 2010. Ocular angiogenesis: mechanisms and recent advances in therapy. *Adv Clin Chem.* 50:103-21.
220. Rao, S., I.B. Lobov, J.E. Vallance, K. Tsujikawa, I. Shiojima, S. Akunuru, K. Walsh, L.E. Benjamin, R.A. Lang. 2007. Obligatory participation of macrophages in an angiopoietin 2-mediated cell death switch. *Development.* 134:4449-58.
221. Reginato, S., R. Gianni-Barrera, A. Banfi. 2011. Taming of the wild vessel: promoting vessel stabilization for safe therapeutic angiogenesis. *Biochem Soc Trans.* 39:1654-8.
222. Resnikoff, S., D. Pascolini, D. Etya'ale, I. Kocur, R. Pararajasegaram, G.P. Pokharel, S.P. Mariotti. 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 82:844-51.
223. Ribatti, D., B. Nico, E. Crivellato. 2009. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis.* 12:101-11.
224. Ribatti, D., B. Nico, E. Crivellato. 2011. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 55:261-8.
225. Rizza, C., N. Leitinger, J. Yue, D.J. Fischer, D.A. Wang, P.T. Shih, H. Lee, G. Tigyi, J.A. Berliner. 1999. Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest.* 79:1227-35.
226. Roberts, R., V.A. Sciorra, A.J. Morris. 1998. Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem.* 273:22059-67.
227. Rock, J.R., C.E. Barkauskas, M.J. Cronce, Y. Xue, J.R. Harris, J. Liang, P.W. Noble, B.L. Hogan. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:E1475-83.
228. Rouget, C. 1873. Memoire sur le developpement, la structures et les proprietes des capillaires sanguins et lymphatiques. *Archs Physiol Norm Pathol.* 5:603-33.
229. Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz, D.T. Shima. 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 16:2684-98.
230. Saint-Geniez, M., P.A. D'Amore. 2004. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol.* 48:1045-58.
231. Samadi, N., R. Bekele, D. Capatos, G. Venkatraman, M. Sariahmetoglu, D.N. Brindley. 2011. Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie.* 93:61-70.
232. Sato, Y., D.B. Rifkin. 1989. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol.* 109:309-15.
233. Saulnier-Blache, J.S., A. Girard, M.F. Simon, M. Lafontan, P. Valet. 2000. A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J Lipid Res.* 41:1947-51.
234. Saunders, W.B., B.L. Bohnsack, J.B. Faske, N.J. Anthis, K.J. Bayless, K.K. Hirschi, G.E. Davis. 2006. Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J Cell Biol.* 175:179-91.

235. Scheppke, L., E.A. Murphy, A. Zarpellon, J.J. Hofmann, A. Merkulova, D.J. Shields, S.M. Weis, T.V. Byzova, Z.M. Ruggeri, M.L. Iruela-Arispe, D.A. Cheresh. 2012. Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane. *Blood*. 119:2149-58.
236. Schrimpf, C., C. Xin, G. Campanholle, S.E. Gill, W. Stallcup, S.L. Lin, G.E. Davis, S.A. Gharib, B.D. Humphreys, J.S. Duffield. 2012. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 Modulate Vascular Stability after Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*. 23:868-83.
237. Sears, J.E., G. Hoppe, Q. Ebrahim, B. Anand-Apte. 2008. Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:19898-903.
238. Sennino, B., B.L. Falcón, D. McCauley, T. Le, T. McCauley, J.C. Kurz, A. Haskell, D.M. Epstein, D.M. McDonald. 2007. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Res*. 67:7358-67.
239. Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, A.C. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62-6.
240. Shalaby, F., J. Ho, W.L. Stanford, K.D. Fischer, A.C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein, J. Rossant. 1997. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. 89:981-90.
241. Shan, L., K. Jaffe, S. Li, L. Davis. 2008. Quantitative determination of lysophosphatidic acid by LC/ESI/MS/MS employing a reversed phase HPLC column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 864:22-8.
242. Shastry, B.S. 2009. Persistent hyperplastic primary vitreous: congenital malformation of the eye. *Clin Experiment Ophthalmol*. 37:884-90.
243. Shih, S.C., M. Ju, N. Liu, J.R. Mo, J.J. Ney, L.E. Smith. 2003. Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15859-64.
244. Shui, Y.B., X. Wang, J.S. Hu, S.P. Wang, C.M. Garcia, J.D. Potts, Y. Sharma, D.C. Beebe. 2003. Vascular endothelial growth factor expression and signaling in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:3911-9.
245. Siekmann, A.F., N.D. Lawson. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 445:781-4.
246. Siemerink, M.J., A.J. Augustin, R.O. Schlingemann. 2010. Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators. *Dev Ophthalmol*. 46:4-20.
247. Siess, W., K.J. Zangl, M. Essler, M. Bauer, R. Brandl, C. Corrinth, R. Bittman, G. Tigyi, M. Aepfelbacher. 1999. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:6931-6.
248. Simon, M.F., A. Rey, I. Castan-Laurel, S. Grés, D. Sibrac, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache. 2002. Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in

- 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem.* 277:23131-6.
249. Sims, D.E. 1986. The pericyte – a review. *Tissue Cell.* 18:153-74.
250. Singh, H., T.A. Tahir, D.O. Alawo, E. Issa, N.P. Brindle. 2011. Molecular control of angiopoietin signalling. *Biochem Soc Trans.* 39:1592-6.
251. Skalli, O., P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillessen, G. Gabbiani. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 103:2787-96.
252. Smith, L.E., E. Wesolowski, A. McLellan, S.K. Kostyk, R. D'Amato, R. Sullivan, P.A. D'Amore. 1994. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:101-11.
253. Smyth, S.S., H.Y. Cheng, S. Miriyala, M. Panchatcharam, A.J. Morris. 2008. Roles of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1781:563-70.
254. Smyth, S.S., V.A. Sciorra, Y.J. Sigal, Z. Pamuklar, Z. Wang, Y. Xu, G.D. Prestwich, A.J. Morris. 2003. Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity. *J Biol Chem.* 278:43214-23.
255. Song, N., Y. Huang, H. Shi, S. Yuan, Y. Ding, X. Song, Y. Fu, Y. Luo. 2009. Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1alpha/CXCR4 axis. *Cancer Res.* 69:6057-64.
256. Soriano, P. 1994. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8:1888-96.
257. Stahl, A., K.M. Connor, P. Sapienza, J. Chen, R.J. Dennison, N.M. Krah, M.R. Seaward, K.L. Willett, C.K. Aderman, K.I. Guerin, J. Hua, C. Löfqvist, A. Hellström, L.E. Smith. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:2813-26.
258. Stewart, K.S., Z. Zhou, P. Zweidler-McKay, E.S. Kleinerman. 2011. Delta-like ligand 4-Notch signaling regulates bone marrow-derived pericyte/vascular smooth muscle cell formation. *Blood.* 117:719-26.
259. Stewart, M.W. 2012. The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. *Mayo Clin Proc.* 87:77-88.
260. Stone, J., A. Itin, T. Alon, J. Pe'er, H. Gnessin, T. Chan-Ling, E. Keshet. 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 15:4738-47.
261. Stracke, M.L., H.C. Krutzsch, E.J. Unsworth, A. Arestad, V. Cioce, E. Schiffmann, L.A. Liotta. 1992. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem.* 267:2524-9.
262. Strasser, G.A., J.S. Kaminker, M. Tessier-Lavigne. 2010. Microarray analysis of retinal endothelial tip cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood.* 115:5102-10.

263. Stratman, A.N., K.M. Malotte, R.D. Mahan, M.J. Davis, G.E. Davis. 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*. 114:5091-101.
264. Stratman, A.N., A.E. Schwindt, K.M. Malotte, G.E. Davis. 2010. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood*. 116:4720-30.
265. Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Benedito, C. Bréant, A. Duarte, A. Eichmann. 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:3225-30.
266. Sumida, H., K. Noguchi, Y. Kihara, M. Abe, K. Yanagida, F. Hamano, S. Sato, K. Tamaki, Y. Morishita, M.R. Kano, C. Iwata, K. Miyazono, K. Sakimura, T. Shimizu, S. Ishii. 2010. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*. 116:5060-70.
267. Suri, C., J. McClain, G. Thurston, D.M. McDonald, H. Zhou, E.H. Oldmixon, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos. 1998. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 282:468-71.
268. Suri, C., P.F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P.C. Maisonpierre, S. Davis, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 87:1171-80.
269. Swift, M.R., B.M. Weinstein. 2009. Arterial-venous specification during development. *Circ Res*. 104:576-88.
270. Tager, A.M., P. LaCamera, B.S. Shea, G.S. Campanella, M. Selman, Z. Zhao, V. Polosukhin, J. Wain, B.A. Karimi-Shah, N.D. Kim, W.K. Hart, A. Pardo, T.S. Blackwell, Y. Xu, J. Chun, A.D. Luster. 2008. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*. 14:45-54.
271. Takashima, S., M. Kitakaze, M. Asakura, H. Asanuma, S. Sanada, F. Tashiro, H. Niwa, J. Miyazaki Ji, S. Hirota, Y. Kitamura, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Klagsbrun, M. Hori. 2002. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3657-62.
272. Tanaka, M., S. Okudaira, Y. Kishi, R. Ohkawa, S. Iseki, M. Ota, S. Noji, Y. Yatomi, J. Aoki, H. Arai. 2006. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 281:25822-30.
273. Tanaka, M., Y. Kishi, Y. Takanezawa, Y. Kakehi, J. Aoki, H. Arai. 2004. Prostatic acid phosphatase degrades lysophosphatidic acid in seminal plasma. *FEBS Lett*. 571:197-204.
274. Tanyi, J.L., A.J. Morris, J.K. Wolf, X. Fang, Y. Hasegawa, R. Lapushin, N. Auersperg, Y.J. Sigal, R.A. Newman, E.A. Felix, E.N. Atkinson, G.B. Mills. 2003. The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res*. 63:1073-82.

275. Thurston, G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos, D.M. McDonald. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 286:2511-4.
276. Tokumura, A. 2002. Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim Biophys Acta*. 1582:18-25.
277. Tokumura, A., E. Majima, Y. Kariya, K. Tominaga, K. Kogure, K. Yasuda, K. Fukuzawa. 2002. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 277:39436-42.
278. Tokumura, A., K. Harada, K. Fukuzawa, H. Tsukatani. 1986. Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim Biophys Acta*. 875:31-8.
279. Tomsig, J.L., A.H. Snyder, E.V. Berdyshev, A. Skobeleva, C. Mataya, V. Natarajan, D.N. Brindley, K.R. Lynch. 2009. Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochem J*. 419:611-8.
280. Tronche, F., E. Casanova, M. Turiault, I. Sahly, C. Kellendonk. 2002. When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett*. 529:116-21.
281. Ueda, H. 2011. Lysophosphatidic acid as the initiator of neuropathic pain. *Biol Pharm Bull*. 34:1154-8.
282. Uemura, A., M. Ogawa, M. Hirashima, T. Fujiwara, S. Koyama, H. Takagi, Y. Honda, S.J. Wiegand, G.D. Yancopoulos, S. Nishikawa. 2002. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest*. 110:1619-28.
283. Umezu-Goto, M., Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, T. Yamori, G.B. Mills, K. Inoue, J. Aoki, H. Arai. 2002. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*. 158:227-33.
284. van Meeteren, L.A., W.H. Moolenaar. 2007. Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res*. 46:145-60.
285. van Meeteren, L.A., P. Ruurs, C. Stortelers, P. Bouwman, M.A. van Rooijen, J.P. Pradère, T.R. Pettit, M.J. Wakelam, J.S. Saulnier-Blache, C.L. Mummery, W.H. Moolenaar, J. Jonkers. 2006. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*. 26:5015-22.
286. van Meeteren, L.A., P. Ruurs, E. Christodoulou, J.W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano, W.H. Moolenaar. 2005. Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*. 280:21155-61.
287. Visconti, R.P., C.D. Richardson, T.N. Sato. 2002. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:8219-24.
288. von Tell, D., A. Armulik, C. Betsholtz. 2006. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res*. 312:623-9.

289. Wacker, A., H. Gerhardt. 2011. Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol.* 23:676-85.
290. Walshe, T.E., M. Saint-Geniez, A.S. Maharaj, E. Sekiyama, A.E. Maldonado, P.A. D'Amore. 2009. TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS One.* 4:e5149.
291. Wietecha, M.S., L. Chen, M.J. Ranzer, K. Anderson, C. Ying, T.B. Patel, L.A. DiPietro. 2011. Sprouty2 downregulates angiogenesis during mouse skin wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300:H459-67.
292. Willard, A.L., I.M. Herman. 2012. Vascular complications and diabetes: current therapies and future challenges. *J Ophthalmol.* 2012:209538.
293. Wynn, T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 214:199-210.
294. Xian, X., J. Håkansson, A. Ståhlberg, P. Lindblom, C. Betsholtz, H. Gerhardt, H. Semb. 2006. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest.* 116:642-51.
295. Yana, I., H. Sagara, S. Takaki, K. Takatsu, K. Nakamura, K. Nakao, M. Katsuki, S. Taniguchi, T. Aoki, H. Sato, S.J. Weiss, M. Seiki. 2007. Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci.* 120:1607-14.
296. Yanagida, K., K. Masago, H. Nakanishi, Y. Kihara, F. Hamano, Y. Tajima, R. Taguchi, T. Shimizu, S. Ishii. 2009. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem.* 284:17731-41.
297. Yanagida, K., S. Ishii. 2011. Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. *J Biochem.* 150:223-32.
298. Yonenaga, Y., A. Mori, H. Onodera, S. Yasuda, H. Oe, A. Fujimoto, T. Tachibana, M. Imamura. 2005. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology.* 69:159-66.
299. Yue, J., K. Yokoyama, L. Balazs, D.L. Baker, D. Smalley, C. Pilquill, D.N. Brindley, G. Tigyi. 2004. Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell Signal.* 16:385-99.
300. Yukiura, H., K. Hama, K. Nakanaga, M. Tanaka, Y. Asaoka, S. Okudaira, N. Arima, A. Inoue, T. Hashimoto, H. Arai, A. Kawahara, H. Nishina, J. Aoki. 2011. Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J Biol Chem.* 286:43972-83.
301. Yung, Y.C., T. Mutoh, M.E. Lin, K. Noguchi, R.R. Rivera, J.W. Choi, M.A. Kingsbury, J. Chun. 2011. Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Sci Transl Med.* 3:99ra87.
302. Zhang, L., N. Yang, J.W. Park, D. Katsaros, S. Fracchioli, G. Cao, A. O'Brien-Jenkins, T.C. Randall, S.C. Rubin, G. Coukos. 2003. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res.* 63:3403-12.

303. Zhang, Q.X., C.S. Pilquill, J. Dewald, L.G. Berthiaume, D.N. Brindley. 2000. Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem J.* 345 Pt 2:181-4.
304. Zhao, J., D. He, E. Berdyshev, M. Zhong, R. Salgia, A.J. Morris, S.S. Smyth, V. Natarajan, Y. Zhao. 2011. Autotaxin induces lung epithelial cell migration through lysoPLD activity-dependent and -independent pathways. *Biochem J.* 439:45-55.
305. Zhao, X., D. Wang, Z. Zhao, Y. Xiao, S. Sengupta, Y. Xiao, R. Zhang, K. Lauber, S. Wesselborg, L. Feng, T.M. Rose, Y. Shen, J. Zhang, G. Prestwich, Y. Xu. 2006. Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 281:29357-68.
306. Zhao, Y., P.V. Usatyuk, R. Cummings, B. Saatian, D. He, T. Watkins, A. Morris, E.W. Spannake, D.N. Brindley, V. Natarajan. 2005. Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidic acid-induced calcium release, NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Biochem J.* 385(Pt 2):493-502.
307. Zhao, Y., S.K. Kalari, P.V. Usatyuk, I. Gorshkova, D. He, T. Watkins, D.N. Brindley, C. Sun, R. Bittman, J.G. Garcia, E.V. Berdyshev, V. Natarajan. 2007. Intracellular generation of sphingosine 1-phosphate in human lung endothelial cells: role of lipid phosphate phosphatase-1 and sphingosine kinase 1. *J Biol Chem.* 282:14165-77.
308. Ziche, M., L. Morbidelli. 2009. The corneal pocket assay. *Methods Mol Biol.* 467:319-29.
309. Zimmerman, K.W. 1923. Der feinere bau der blutcapillares. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 68:3-109.

Publikacijų sąrašas

Publikacijos disertacijos tema

Motiejūnaitė, R., A. Kazlauskas. 2008. Pericytes and ocular diseases. *Exp Eye Res.* 86:171-7. (Apžvalga)

Chen, D., R. Motiejūnaitė, A. Kazlauskas, P. Gudla, J. Collins, S. Lockett. 2010. Automatic image analysis method for quantification of tube formation by endothelial cells *in vitro*. *Proc. SPIE* 7568, 75681G.

Im, E., R. Motiejūnaitė, J. Aranda, E.Y. Park, L. Federico, T.I. Kim, T. Clair, M.L. Stracke, S. Smyth, A. Kazlauskas. 2010. Phospholipase Cgamma activation drives increased production of autotaxin in endothelial cells and lysophosphatidic acid-dependent regression. *Mol Cell Biol.* 30:2401-10.

Auksorius, E., Y. Bromberg, R. Motiejūnaitė, A. Pieretti, L. Liu, E. Coron, J. Aranda, A.M. Goldstein, B.E. Bouma, A. Kazlauskas, G.J. Tearney. 2012. Dual-modality fluorescence and full-field optical coherence microscopy for biomedical imaging applications. *Biomed Opt Express.* 3:661-6.

Aranda, J., R. Motiejūnaitė, E. Im, A. Kazlauskas. 2012. Diabetes Disrupts the Response of Retinal Endothelial Cells to the Angiomodulator Lysophosphatidic Acid. *Diabetes.* 61:1225-33.

Pranešimai konferencijose

Motiejūnaitė, R., J. Aranda, D. Mitchell, A. Kazlauskas. Pericytes stabilize capillary tubes by reducing the concentration of lysophosphatidic acid. NAVBO Workshops in Vascular Biology, 2011 spalio. Stendinis pranešimas (apdovanojimas už išskirtinį doktoranto stendinį pranešimą).

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju žmonėms, be kurių ši transatlantinė doktorantūra nebūtų net prasidėjusi: dr. Andriui Kazlauskui ir dr. Vidai Kirvelienei. Dėkoju dr. Andriui Kazlauskui už suteiktą galimybę dirbti jo laboratorijoje, už tikėjimą ir už palaikymą. Ačiū dr. Vidai Kirvelienei už neįkainojamą pagalbą naviguojant biurokratijos labirintais, o taip pat už lietuviškos terminologijos ir kalbos kultūros patarimus.

Ačiū laboratorijos bendradarbiams dr. Eun Young Park, dr. Magdalena Staniszewska, dr. Hetian Lei, dr. Steven Pennock, dr. Guoxiang Ruan, dr. Maryada Sharma, dr. Sarah Jacobo, dr. Giulio Romeo, dr. Alzbeta Godarova, Thomas Clarke, Kevin Conway ir Daniel Lorenzana už diskusijas, patarimus, protokolus, tirpalus, gerą nuotaiką ir šiltą bendravimą. Už neišsenkamą kantrybę ypač dėkoju dr. Eunok Im, pirmajai darbo su pirminėmis ląstelėmis ir pelėmis mokytojai. Ačiū dr. Jorge Aranda, atlikusiam konfokalinės mikroskopijos darbus ir daug padėjusiam su kitais eksperimentais. Taip pat jam ačiū už laboratorijos ribas peržengusią draugystę, praskaidrinsią tas dienas, kai, atrodė, niekas nesisekė, ir padėjusią pasidžiaugti tomis dienomis, kai viskas pagaliau pajudėjo į priekį.

Dėkoju dr. Magali Saint-Geniez, Stephanie Abend ir Carrie Spencer už pagalbą su *in vivo* eksperimentais ir imunohistochemija. Ačiū Schepens akių tyrimų instituto vivariumo kolektyvui už nepriekaištingą pelių priežiūrą. Ačiū Bianai Fan už audinių pjūvių paruošimą.

Nuoširdžiai dėkoju asmenims, padovanojusiems reagentų, ląstelių, pelių ar pasidalinusiems protokolais ir nespausdintais duomenimis: dr. Laurens van Meeteren, dr. Wouter Moolenaar, dr. Huib Ovaa, dr. Timothy Clair, dr. Junken Aoki, dr. George Davis, dr. Yuko Fujiwara, dr. Kazuhiko Kume, dr. Manikandan Panchatchataram, dr. Lorenzo Federico ir dr. Susan Smyth. Dėkoju Valstybiniam vėžio institutui (JAV) už rekombinantinį VEGF-A.

Už stipendiją dėkoju Valstybiniam mokslo fondui.

Ačiū Neringai, Zitai, Jolitai ir Linai už pagalbą, tarpininkavimą ir linksmus doktorančių savitarpio pagalbos grupės susitikimus.

Ačiū Rohit už neįkainojamą paramą ir pagalbą, už supratimą, o taip pat už kantrų pasakojimą apie pelių akis klausymąsi prie vakarienės stalo.

Galiausiai noriu nuoširdžiai padėkoti Mamai ir Tėčiui, visada mane palaikantiems ir visada manim tikintiems.