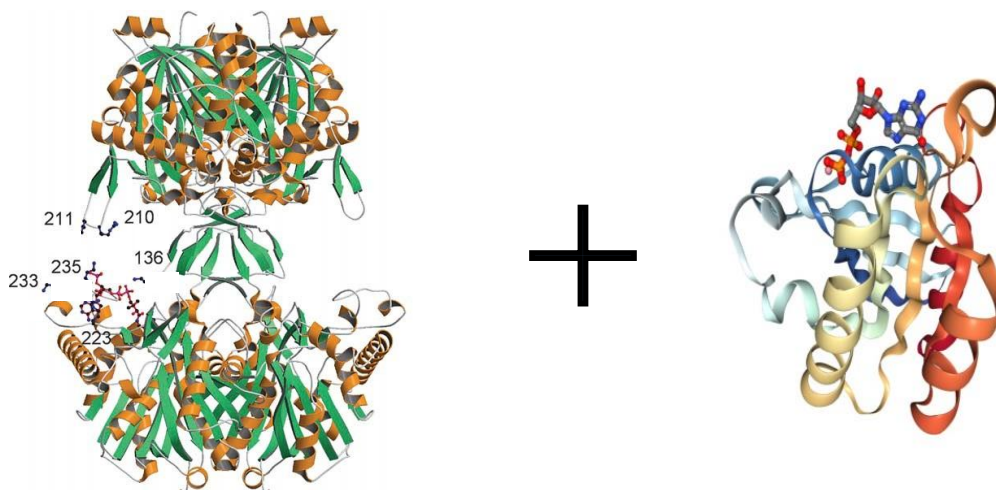


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

**Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής
Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΚΕΤΟΑΚΕΤΥΛΟ CoA
ΘΕΙΟΛΑΣΗΣ (ACAT2) ΚΑΙ ΤΗΣ RAB5**



**ΤΣΑΛΑΓΡΑΔΑΣ ΠΕΤΡΟΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟΥ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

**Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής
Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΚΕΤΟΑΚΕΤΥΛΟ C₆A
ΘΕΙΟΛΑΣΗΣ (ACAT2) ΚΑΙ ΤΗΣ RAB5**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΣΑΛΑΓΡΑΔΑΣ ΠΕΤΡΟΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ ΣΑΒΒΑΣ
Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Αντί προλόγου

Όταν τελειώνει μια διπλωματική εργασία, νοιώθεις ότι ολοκληρώνεις ένα μέρος του επιστημονικού σου έργου. Τότε κάθεσαι και σκέφτεσαι τι σε επηρέασε, τι σε ερέθισε, κάνεις την αποτίμησή σου, ευχαριστείς κάποιους ανθρώπους και αφιερώνεις σε κάποιους άλλους.

Στους δύο ανθρώπους λοιπόν που επηρεάζουν και σημαδεύουν την ζωή μου και την καριέρα μου. Σ' αυτούς που από μικρό παιδί μου μάθαιναν να μη φοβάμαι τους ανέμους και τη βροχή, αργότερα να σκέφτομαι και να ταξιδεύω πάνω από θάλασσες, ποτάμια, βουνά και πεδιάδες και να φθάνω μέχρι τη Σελήνη. Κι όταν εγώ χανόμουν μου άνοιγαν τους χάρτες του μυαλού τους. Ήταν τότε που η εμπειρία τους ηρεμούσε τον δικό μου ενθουσιασμό.

Σ' αυτό το μακρινό ταξίδι της ζωής και της γνώσης, κάποια στιγμή τους προσπέρασα και μετά τους έχασα. Εκεί που βρίσκονται δεν μπορώ να είμαι, γι αυτό έστειλα την αγάπη μου να τους ακολουθεί.

Αφιερώνεται λοιπόν σ' αυτούς που έχασα νωρίς και άδικα. Τον θείο μου Δήμο και τον παππού μου Γιώργο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενδοκυττάρωση αποτελεί μία βασική κυτταρική διεργασία η οποία επιτρέπει στα κύτταρα όχι μόνο να προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά από το εξωτερικό περιβάλλον, αλλά και να μεταβάλλουν την σύσταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των ενδοκυττάρων οργανιδίων, ελέγχοντας έτσι καίριες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και απόπτωση. Τα πρώιμα στάδια της ενδοκυττάρωσης θεωρούνται κρίσιμα, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα πορεία του ενδοκυτταρωμένου φορτίου, καθορίζοντας έτσι τη «μοίρα» του. Στα πρώιμα στάδια της ενδοκυττάρωσης συμμετέχουν τα πρώιμα ενδοσώματα, όπου πραγματοποιείται η διαλογή του φορτίου. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν πλειάδα πρωτεϊνικών μορίων, ανάμεσα στα οποία κυρίαρχο ρόλο κατέχει η μικρή GTPάση Rab5. Οι λειτουργίες της Rab5 καθορίζονται από τον νουκλεοτιδικό της κύκλο καθώς και από την αλληλεπίδρασή της με ένα ευρύ δίκτυο πρωτεϊνών-τελεστών, που περιλαμβάνει πάνω από 30 πρωτεΐνες.

Στην προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών της ενδοκυττάρωσης, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ανιχνεύθηκε με φασματοφωτομετρία μάζας μία άγνωστη μέχρι σήμερα αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Rab5: Η αλληλεπίδρασή της με την κυτταροπλασματική ακετοακετυλο-CoA θειολάση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα ένζυμο του μεταβολισμού των λιπιδίων, και πιο συγκεκριμένα, το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού σύνθεσης του μεβαλονικού οξέος στην οδό βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η κυτταροπλασματική ακετοακετυλο-CoA θειολάση έχει επίσης δράση πρωτεϊνικής ακετυλο-τρανσφεράσης, καθιστώντας την έτσι ένα υποψήφιο ρυθμιστή της δράσης πρωτεϊνικών μορίων. Το γεγονός ότι ένα ένζυμο του μεταβολισμού φαίνεται να αλληλεπιδρά με μία καίρια πρωτεΐνη των πρώιμων γεγονότων της ενδοκυττάρωσης (Rab5), οδηγεί σε σημαντικά ερωτήματα τόσο σχετικά με την εξειδίκευση και τα βιοφυσικά δεδομένα αυτής της αλληλεπίδρασης, όσο και για τη σημασία της στις κυτταρικές λειτουργίες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η απευθείας αλληλεπίδραση της Rab5 με την κυτταροπλασματική ακετοακετυλο-CoA θειολάση, χρησιμοποιώντας καθαρές πρωτεΐνες εκφρασμένες σε βακτήρια. Σε πρώτη φάση, οι δύο πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν συζευγμένες με το πρόσδεμα GST σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος και ακολούθησε ο καθαρισμός τους. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε

το πρόσδεμα GST με ενζυμική πρωτεόλυση, για την παραγωγή καθαρής κυτταροπλασματικής ακετοακετυλο-CoA θειολάσης, ενώ στην Rab5 διατηρήθηκε το πρόσδεμα της GST. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση των δύο πρωτεϊνών και συγκατακρήμισή τους με σφαιρίδια γλουταθειόνης. Ακολούθησαν πλύσεις της στήλης για την απομάκρυνση της αδέσμευτης κυτταροπλασματικής ακετοακετυλο-CoA θειολάσης και, έπειτα, πραγματοποιήθηκε ειδική έκλυση του προσδεμένου ενζύμου με διάλυμα που περιείχε EDTA, το οποίο αφαιρώντας το Mg^{2+}/GDP τροποποιεί την διαμόρφωση της Rab5 και οδηγεί σε εξειδικευμένη έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών. Τα εκλουσμένα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE 12% και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της κυτταροπλασματικής ακετοακετυλο-CoA θειολάσης. Η μεθοδολογία αυτή ανέδειξε ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν ακόμη και σε πλήρως καθαρισμένη μορφή, παρόλο που και οι δύο πρωτεΐνες παρασκευάστηκαν σε εταιρόλογο βακτηριακό σύστημα, αποδεικνύοντας έτσι ότι η αλληλεπίδρασή τους είναι άμεση και δεν απαιτεί άλλη ενδιάμεση πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε ότι η κυτταροπλασματική ακετοακετυλο-CoA θειολάση αλληλεπιδρά με την GST-Rab5a:GDP με δοσοεξαρτώμενη σχέση. Ακόμη, αποδείχθηκε ότι η κυτταροπλασματική ακετοακετυλο-CoA θειολάση αλληλεπιδρά με την GDP (ανενεργή) μορφή της Rab5. Τέλος, έγινε μία προσπάθεια προσδιορισμού των φυσικοχημικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της αλληλεπίδρασης, τα αποτελέσματα της οποίας βρίσκονται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Πρωταρχικά αποτελέσματα υποδηλώνουν μία ασθενή, εξώθερμη αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Μελλοντικά πειράματα θα διαλευκάνουν περαιτέρω τον μηχανισμό της αλληλεπίδρασης οδηγώντας σε βαθύτερη κατανόηση των γεγονότων της ενδοκυττάρωσης καθώς και της βιολογικής σημασίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ της κυτταροπλασματικής ακετοακετυλο-CoA θειολάσης με την Rab5.

ABSTRACT

Endocytosis is a fundamental cellular process which allows cells not only to capture essential nutrients from extracellular space, but also to reorganize the composition of their plasma membrane and intracellular organelles, thus regulating various processes such as: cell proliferation, cell differentiation and apoptosis. The early stages of endocytosis are considered crucial, since they play an important role in defining the “fate” of the internalized “cargo”. Internalised proteins are directed to early endosomes, where a procedure known as “cargo sorting” takes place. While a considerable large number of proteins have been found to participate throughout early stages of endocytosis, the small GTPase Rab5 owns a dominant role. Rab5 assembles on early endosomes and mediates the capture of endocytic vesicles arriving from the plasma membrane. As a small G-protein, Rab5 undergoes two conformational changes depending on its nucleotide state. When GDP is bound on Rab5, the protein acquires its inactive conformation (Rab5-GDP) whereas GTP exchange participates in the transition of Rab5 in its activated form (Rab5-GTP). In order to achieve its multiple functions during the early stages of endocytosis, Rab5 must be activated (Rab5-GTP) and form interactions with a wide protein network, which contains more than 30 proteins, known as Rab5 effectors.

In order to understand the molecular mechanisms of endocytosis, preceding studies identified an unknown interaction between the small GTPase Rab5 and the cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase or acetyl-CoA acetyltransferase 2 (ACAT2, EC 2.3.1.9). The cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase is involved in lipid metabolism and, more specifically, it constitutes the first enzyme of the pathway of mevalonate synthesis, in the cholesterol biosynthesis pathway. A recent study proved that cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase has, also, protein acetyltransferase activity, rendering the enzyme a potent regulator of other proteins' functions. The fact that a principally metabolic enzyme seems to interact with a master regulator of early endocytosis events (Rab5), leads to essential questions about the interaction's specificity and its biophysical properties. Furthermore, the interaction between cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase and Rab5 could imply a significant and even unknown role in many cellular processes.

At the present dissertation, we investigated whether the interaction between cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase and Rab5 is direct (without necessary mediation of another protein). To fulfill that purpose, both proteins were overexpressed and purified in bacteria. At first, both proteins were overexpressed in appropriate bacterial strain and coupled with GST tag, in order to be efficiently purified. Subsequently, the GST moiety was removed with enzymatic proteolysis in order to produce cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase in pure form. On the other hand, Rab5 maintained the GST moiety. Then, both proteins were incubated *in vitro* and pull down assay was conducted using affinity chromatography column with glutathione beads. The procedure was followed by column's washes using appropriate buffer, in order to remove the unbound fraction of cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase. Then, the portion of cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase that remained bound was eluted using a buffer containing EDTA. EDTA is a strong chelating agent, which, by removing the Mg^{2+} /GDP complex from Rab5, modifies its conformation and leads to specific elution of bound proteins. The eluted samples were analyzed, further, using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE 12%) followed by Western blot analysis utilizing specific polyclonal antibodies against cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase epitopes. We observed that Rab5 interacts with cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase when both proteins are produced in pure form in heterologous bacterial strain, which proves that their interaction takes place directly, without intervention of another factor. Also, cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase seems to interact with Rab5 in a dose-dependent manner. Moreover, cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase interacts specifically only with the inactive conformation of Rab5, namely when Rab5 is bound with GDP nucleotide, and not non-specifically with glutathione beads or other homologous Rab proteins. Finally, we conducted a series of experiments in order to determine the interaction's thermodynamic parameters, whose results are in preliminary stage. Nevertheless, primary observations imply a weak, exothermic interaction between cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase and Rab5. Future studies will shed light on defining the exact molecular mechanism of the interaction leading in deeper understanding of endocytosis at molecular level as well as clarifying the biological significance of the interaction between cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase and Rab5.

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 4 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 12 |
| 1.1 Βασικές αρχές μεμβρανικής διακίνησης (membrane trafficking)..... | 12 |
| 1.2 Ενδοκυττάρωση..... | 14 |
| 1.3 Ο ρόλος της Rab5 GTPάσης στην ενδοκυττάρωση | 16 |
| 1.3.1 Πρενυλίωση της Rab5 και ο μεμβρανικός κύκλος της..... | 20 |
| 1.3.2 Ενεργοποίηση και νουκλεοτιδικός κύκλος της Rab5 GTPάσης..... | 22 |
| 1.3.3 Τελεστές της Rab5..... | 25 |
| 1.4 Η κυτταροπλασματική ακετυλο-CoA θειολάση, ή ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράση, ACAT2, αποτελεί το πρώτο ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος..... | 26 |
| 1.5 Η Rab5 αλληλεπιδρά με το μεταβολικό ένζυμο ACAT2..... | 30 |
| 1.5.1 Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή στερεοδιαμόρφωση της Rab5 (Rab5:GDP)..... | 30 |
| 1.5.2 Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την Rab5:GDP σε <i>anéπαφα κύτταρα</i> , αναστέλλοντας τις λειτουργίες της στην ενδοκυττάρωση..... | 31 |
| 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 34 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ..... | 36 |
| 2.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών..... | 36 |
| 2.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-Rab5a:GDP..... | 36 |
| 2.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-ACAT2..... | 39 |
| 2.1.3 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-Rab27a:GDP..... | 40 |
| 2.1.4 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-PreScission..... | 41 |
| 2.1.5 Υπερέκφραση και καθαρισμός της 6xHis-GDI..... | 41 |
| 2.2 Συμπύκνωση πρωτεϊνών..... | 44 |
| 2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης..... | 44 |
| 2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% | 45 |
| 2.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με χρώση νιτρικού αργύρου (Silver stain) | 45 |
| 2.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) | 47 |
| 2.7 Τεχνικές pull down (pull down assays)..... | 47 |
| 2.8 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry)..... | 54 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 60 |

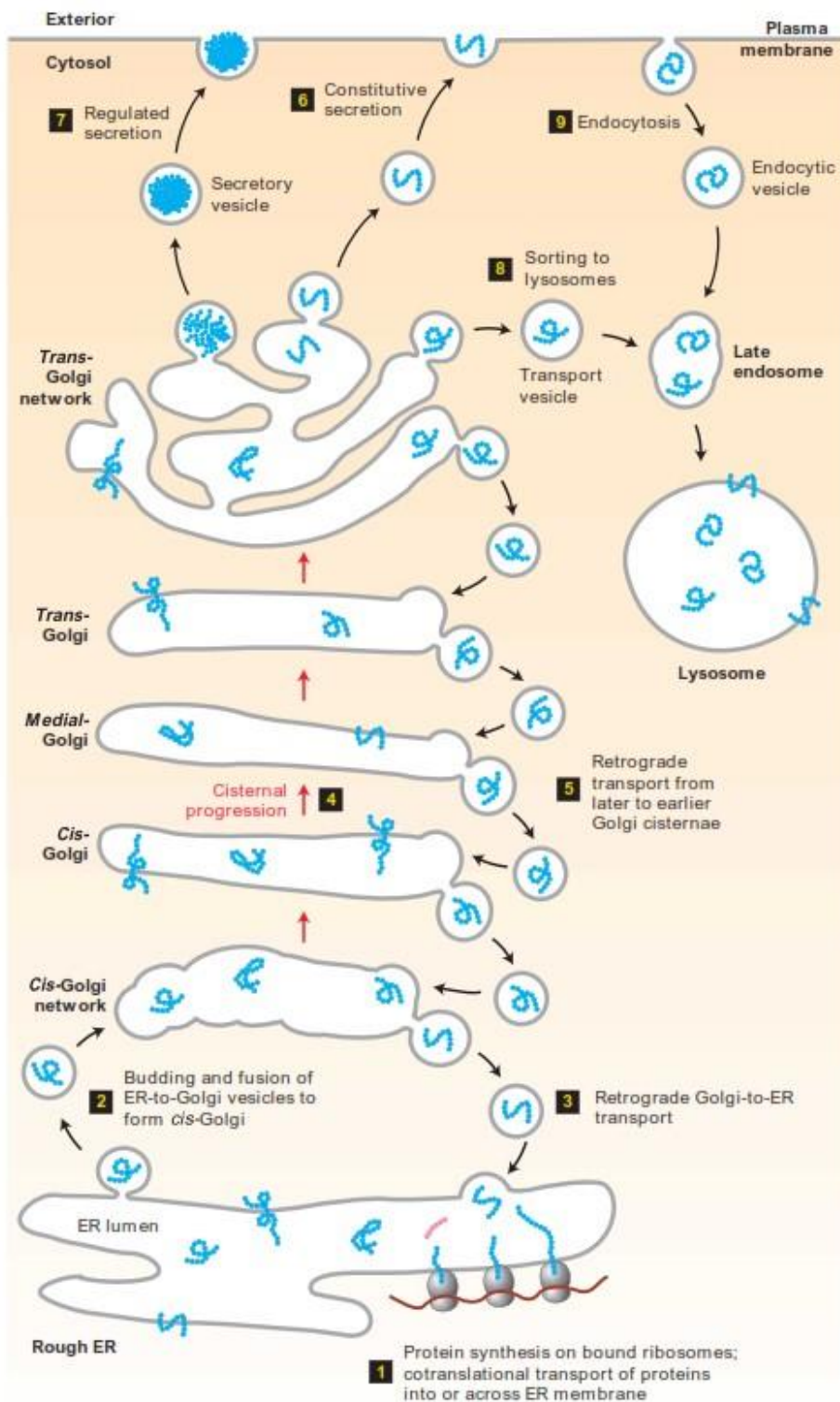
| | |
|--|----|
| 3.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακό στέλεχος <i>E. coli</i> BL21DE3 | 60 |
| 3.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-ACAT2...60 | |
| 3.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-Rab5a:GDP.....62 | |
| 3.1.3 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-Rab27a:GDP.....64 | |
| 3.1.4 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης 6xHis- GDI.....66 | |
| 3.1.5 Υπερέκφραση και καθαρισμός της πρωτεάσης GST-PreScission.....67 | |
| 3.2 Μελέτη της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της GST-Rab5a:GDP και της ACAT2 | 69 |
| 3.2.1 Η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την GST-Rab5a:GDP, με δοσοεξαρτώμενη σχέση.....69 | |
| 3.2.2 Μετά την έκλυση με EDTA, εν συνεχεία έκλυση της στήλης με γλουταθειόνη καταδεικνύει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της ACAT2 συνδέεται στην Rab5 με δεσμούς που εξαρτώνται από το νουκλεοτίδιο GDP.....72 | |
| 3.2.3 Περαιτέρω έκλυση της στήλης με SDS καταδεικνύει ότι η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την GST-Rab5a:GDP και όχι μη ειδικά με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης.....73 | |
| 3.2.4 Η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα μόνο με το πρωτεϊνικό τμήμα της GST-Rab5a:GDP και όχι με το GDP νουκλεοτίδιο.....75 | |
| 3.2.5 Η 6xHis-GDI δεν αλληλεπιδρά με την GST-Rab5a:GDP όταν εκφράζονται σε βακτηριακό σύστημα.....76 | |
| 3.3 Η αλληλεπίδραση μεταξύ της Rab5a:GDP και της ACAT2 είναι ασθενής και εξώθερμη | 79 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 82 |
| 4.1 Πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 στα πρώιμα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης..... | 84 |
| 4.2 Πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 στον μεταβολισμό, ή σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες..... | 86 |
| 4.3 Μελλοντικές προοπτικές | 88 |
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 89 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βασικές αρχές μεμβρανικής διακίνησης (membrane trafficking)

Τα κύτταρα όλων των οργανισμών, από τους απλούστερους μονοκύτταρους μέχρι τους σύνθετους πολυκύτταρους, έχουν την ανάγκη να τραφούν, να επικοινωνήσουν με το γύρω περιβάλλον τους καθώς και να ανταποκριθούν άμεσα σε οποιοσδήποτε μεταβολές του. Για να πετύχουν συντονισμένα τις παραπάνω διαδικασίες, τα κύτταρα οφείλουν να τροποποιούν την εσωτερική τους διαμόρφωση. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να αναδιοργανώνουν συνεχώς τόσο την σύσταση των πλασματικών τους μεμβρανών όσο και των εσωτερικών τους διαμερισμάτων για τη δημιουργία μιας άμεσης απόκρισης στα εξωτερικά ερεθίσματα.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi και από το τελευταίο σε άλλα διαμερίσματα του ενδομεμβρανικού συστήματος διεκπεραιώνεται μέσω της συνεχούς εκβλάστησης και σύντηξης κυστιδίων μεταφοράς (transport vesicles). Τα κυστίδια μεταφοράς περιέχουν τις πρωτεΐνες-φορτία (cargo proteins), εκβλαστάνουν από την μεμβράνη ενός διαμερίσματος και, έπειτα, μεταφέρουν τις πρωτεΐνες-φορτία στη μεμβράνη του επόμενου διαμερίσματος. Η μεταφορά ολοκληρώνεται με την σύντηξη των δύο μεμβρανών. Γίνεται άμεσα κατανοητό πως η επιλεκτικότητα της κυστιδιακής μεταφοράς είναι κρίσιμη και παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής οργάνωσης του κυττάρου. Η εξειδίκευση της μεταφοράς βασίζεται στην επιλεκτική «συσκευασία» των πρωτεϊνών σε κυστίδια που αναγνωρίζουν και συντήκονται αποκλειστικά και μόνο με την κατάλληλη μεμβράνη-στόχο. Συνοπτικά, η διαδικασία κατά την οποία οι πρωτεΐνες κατανέμονται σε όλη την έκταση του κυττάρου ή εκκρίνονται από αυτό (εξωκυττάρωση) ή προσλαμβάνονται από τον εξωκυττάριο χώρο (ενδοκυττάρωση) ορίζεται ως μεμβρανική διακίνηση (membrane trafficking) (Εικ. 1.1). Εξαιτίας αυτού του φαινομένου, δημιουργούνται οδοί επικοινωνίας ανάμεσα στο εσωτερικό του κυττάρου και το εξωτερικό του περιβάλλον.



Εικ. 1.1: Ανασκόπηση της μεμβρανικής διακίνησης και των μονοπατιών διαλογής πρωτεϊνών. **Εκκριτικό μονοπάτι:** Οι πρωτεΐνες συντίθενται σε ριβοσώματα προσδεμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες εισέρχονται στο εσωτερικό του (1). Στη συνέχεια, συσκευάζονται σε κυστίδια μεταφοράς και μεταφέρονται κατά μήκος του συστήματος Golgi (2,4). Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται παράλληλα και μία αντίστροφη κυστιδιακή

μεταφορά τόσο στο σύστημα Golgi (5) όσο και μεταξύ του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου (3) με σκοπό την ανακύκλωση πρωτεϊνών που συμβάλλουν ενεργά στην κυστιδιακή μεταφορά. Κατόπιν, από το σύστημα Golgi οι πρωτεΐνες μπορούν να ακολουθήσουν είτε την εκκριτική οδό (6,7) ή να μεταφερθούν πρώτα στα όψιμα ενδοσώματα και έπειτα στα λυσοσώματα (8). **Μονοπάτι ενδοκυττάρωσης:** Οι πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στην πλασματική μεμβράνη καθώς και διαλυτές εξωκυτταρικές πρωτεΐνες συσκευάζονται σε κυστίδια, τα οποία εκβλαστάνουν από την πλασματική μεμβράνη και κατευθύνονται στα λυσοσώματα διαμέσου των ενδοσωμάτων. *Lodish H. et.al. Molecular Cell Biology 5th Edition, 2003.*

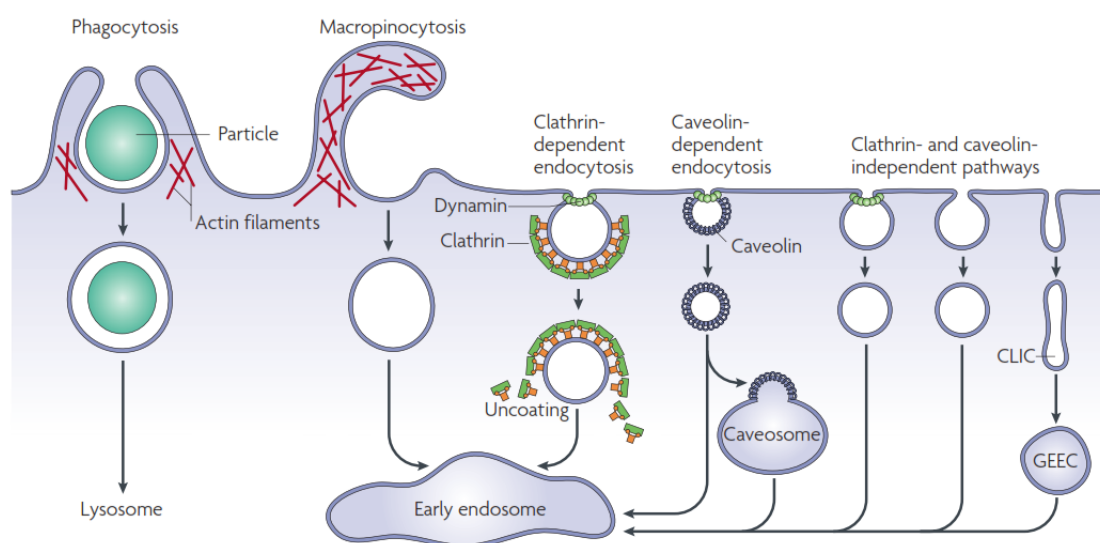
1.2 Ενδοκυττάρωση

Η ενδοκυττάρωση είναι μία θεμελιώδης κυτταρική διεργασία, η οποία ανακαλύφθηκε από τον Christian de Duve το 1963, και αποτελεί αναπόσπαστο μονοπάτι της μεμβρανικής διακίνησης και διαλογής των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται από τα κύτταρα με σκοπό την εισαγωγή ποικίλων μορίων στο εσωτερικό τους (Εικ. 1.2). Εξαιτίας της ποικιλομορφίας των εισαγόμενων μορίων, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ποικίλους τρόπους ενδοκυττάρωσης οι οποίοι διέπονται από πολύπλοκους μηχανισμούς και ρυθμιστικά κυκλώματα για τον συντονισμό τους. Για την πρόσληψη μεγάλων σωματιδίων (π.χ. βακτηρίων) πραγματοποιείται η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Ο συγκεκριμένος τύπος ενδοκυττάρωσης συμβαίνει, ως επί το πλείστον, σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους (π.χ. μακροφάγα). Ύστερα, για την πρόσληψη υγρών ή μακρομορίων σε μικρά κυστίδια πραγματοποιείται πινοκυττάρωση, μία ιδιότητα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Κάθε ενδοκυτταρικό μονοπάτι που μεσολαβεί για τη διακίνηση συγκεκριμένου φορτίου απαιτεί αυστηρούς μηχανισμούς επιλογής του εκάστοτε φορτίου, οι οποίοι λαμβάνουν χώρα κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια, το τμήμα της μεμβράνης που περιέχει το φορτίο μετατρέπεται σε μεμβρανικά κυστίδια τα οποία εκβλαστάνουν προς το εσωτερικό του κυττάρου. Έπειτα, τα κυστίδια συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα, όπου γίνεται διαλογή του περιεχομένου τους είτε για μεταφορά προς τα λυσοσώματα ή για ανακύκλωση και επαναφορά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (π.χ. υποδοχείς). Να σημειωθεί ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την συγκράτηση (tethering) των κυστιδίων στην μεμβράνη του επόμενου προορισμού τους, όσο και για την επικείμενη σύντηξή τους με την μεμβράνη-στόχο (fusion) θεωρούνται αρκετά πολύπλοκοι, δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως και αποτελούν σημαντικό πεδίο έρευνας μέχρι σήμερα (Mayor S. & Pagano R., 2007).

Πολλές μελέτες έχουν αποσαφηνίσει τα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης και την βιολογική σημασία της για το κύτταρο. Αρχικά, η ενδοκυττάρωση έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την κυτταρική σηματοδότηση ελέγχοντας τον αριθμό των διαθέσιμων υποδοχέων προς ενεργοποίηση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Sorkin A. and Von Zastrow M., 2009). Επιπλέον, αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως είτε η ενδοκυττάρωση σαν γεγονός ή οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή εμπλέκονται και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως:

1. Στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (Colaluca I. N. *et.al*, 2008; Rossi D. J. *et.al*, 2008).
2. Στη ρύθμιση της μίτωσης (Royle S. J. *et.al*, 2005; Thompson H. M. *et.al*, 2002; Thompson H. M. *et.al*, 2004).
3. Στη ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας (Cell motility) (Palamidessi A. *et.al*, 2008; Caswell P. T. *et.al*, 2007; Cheng K. W. *et.al*, 2004).
4. Στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης (Cell migration) (Caswell P. *et.al*, 2008; Caswell P. T. *et.al*, 2006; Jones M. C. *et.al*, 2006).

Να σημειωθεί ότι δυσλειτουργίες στα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης πιθανόν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις όπως καρκινογένεση, νόσο του Αλτσχάιμερ (Wu F. & Jao P., 2009), νόσο του Dent (Wang S. S. *et.al*, 2000) και άλλες, επειδή διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων που αναπτύσσονται σε διαφορετικούς ιστούς.



Εικ. 1.2: Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης. Τα μεγάλα σωματίδια προσλαμβάνονται μέσω φαγοκυττάρωσης, ενώ η πρόσληψη υγρών και άλλων μακρομορίων πραγματοποιείται μέσω

πινοκυττάρωσης. Και οι δύο διεργασίες εξαρτώνται άμεσα από την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα περισσότερα φορτία ενδοκυτταρώνονται και μεταφέρονται στο πρώιμο ενδόσωμα μέσω κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη (Clathrin-dependent endocytosis), μέσω κυστιδίων επικαλυμμένων με καβεολίνη (Caveolin-dependent endocytosis) ή μέσω μονοπατιών τα οποία είναι ανεξάρτητα τόσο της κλαθρίνης όσο και της καβεολίνης (Clathrin- and caveolin-independent pathways). Επιπρόσθετα, ορισμένα μονοπάτια μπορεί να εμπεριέχουν ενδιάμεσα διαμερίσματα-προορισμούς, όπως το καβεόσωμα (caveosome). Mayor S. & Pagano R. *Nature Reviews*, 2007.

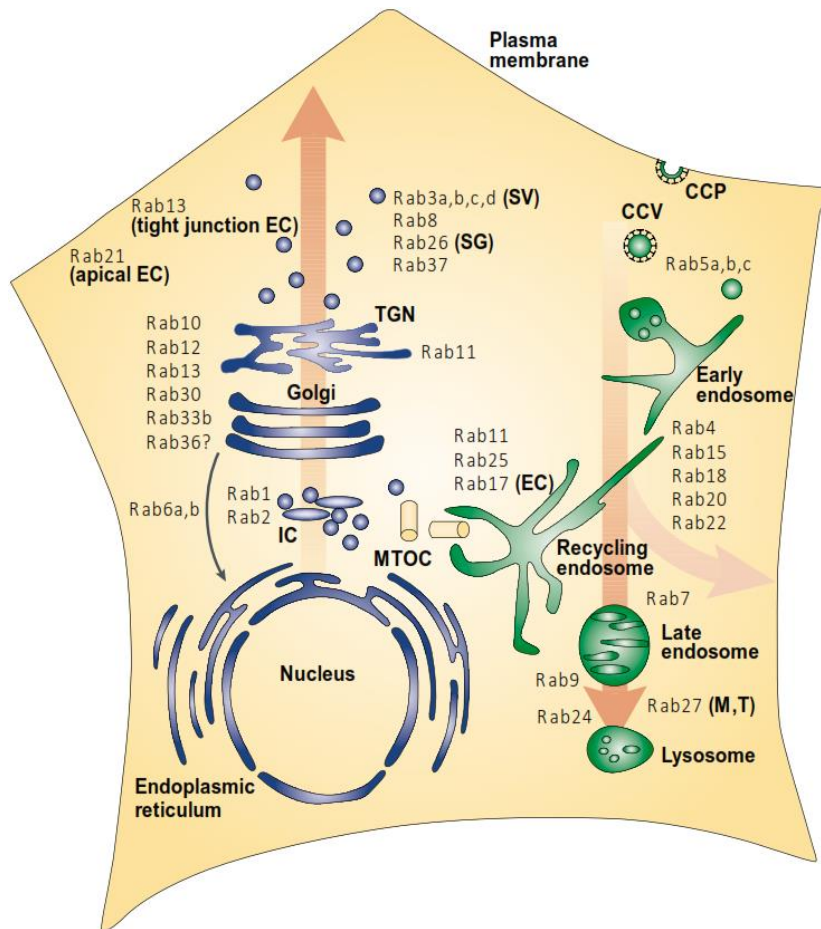
1.3 Ο ρόλος της Rab5 GTPάσης στην ενδοκυττάρωση

Μια τυπική διαδικασία μεμβρανικής διακίνησης μπορεί να περιγραφεί από μία αλληλουχία τεσσάρων σταδίων τα οποία περιλαμβάνουν: (1) τον σχηματισμό των μεμβρανικών κυστιδίων και την εκβλάστησή τους από το οργανίδιο-δότη (budding), (2) την μεταφορά τους προς το διαμέρισμα-στόχο (transport) με την βοήθεια του κυτταροσκελετού της ακτίνης ή/και των μικροσωληνίσκων (Rogers S. L. & Gelfand V. I., 2000; Apodaca G., 2001), (3) την πρόσδεση (tethering) και τον ελλιμενισμό (docking) στην μεμβράνη του οργανιδίου-δέκτη και, τέλος, την σύντηξη (fusion) των δύο λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Η εξειδίκευση των μοριακών μηχανισμών της πρόσδεσης των δύο μεμβρανών καθώς και της σύντηξής τους αποτελούν κρίσιμα γεγονότα, για να διατηρηθεί η ταυτότητα των οργανιδίων και η ορθή ροή του φορτίου μέσα στο κύτταρο, και ρυθμίζονται αυστηρά. Το πρώτο εξειδικευμένο γεγονός στην όλη διαδικασία θεωρείται η εξαρτώμενη από τις Rab πρωτεΐνες πρόσδεση των εισερχομένων κυστιδίων στα σωστά οργανίδια-στόχους. Στη συνέχεια, η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των SNARE πρωτεϊνών που βρίσκονται τόσο στα μεμβρανικά κυστίδια (vSNARES) όσο και στα οργανίδια-στόχους (tSNARES) προάγει με ακρίβεια τη σύντηξή τους. Οι πρωτεΐνες SNARE εντοπίζονται σε συγκεκριμένα οργανίδια, γεγονός που υποβοηθάει την ταυτοποίηση του σωστού οργανιδίου-στόχου και περιορίζει τα μη ειδικά γεγονότα σύντηξης.

Οι πρωτεΐνες Rab παίζουν σημαντικό ρόλο στα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης τόσο σε μηχανιστικό επίπεδο, όσο και σε ρυθμιστικό. Πρόκειται για μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες (~ 25 kDa), οι οποίες ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1989 (Zahraoui A. *et.al*, 1989) και ο ακριβής εντοπισμός τους διαλευκάνθηκε το 1990 (Chavrier P. *et.al*, 1990). Επιπλέον μελέτες απέδειξαν ότι οι Rab πρωτεΐνες εντοπίζονται σε διακριτά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (Εικ. 1.3). Αναλυτικότερα, οι

Rab πρωτεΐνες αποτελούν μέλη της ευρύτερης υπεροικογένειας των μονομερών Ras τριφωσφατασών της γουανοσίνης (GTPases) (Wennerberg K., *et.al*, 2005) και παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και την διφωσφορική γουανοσίνη (GDP). Όπως όλες οι G-πρωτεΐνες, έτσι και οι Rab πρωτεΐνες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες εναλλάσσοντας την νουκλεοτιδική τους κατάσταση μεταξύ μιας ενεργής μορφής (Rab:GTP) και μιας ανενεργής κατάστασης (Rab:GDP). Στην εναλλαγή αυτή συμμετέχουν καταλυτικά και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες δεν αποτελούν αντικείμενο έρευνας της παρούσας εργασίας και δεν θα γίνει περαιτέρω αναφορά (Schmidt A. & Hall A., 2002; Bernardis A. & Settleman J., 2004).

Επιπροσθέτως, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως οι Rab πρωτεΐνες καθορίζουν την ταυτότητα των μεμβρανικών διαμερισμάτων στρατολογώντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες-τελεστές (effectors) και αλληλεπιδρώντας μαζί τους. Συνήθως, η αλληλεπίδραση με τους τελεστές λαμβάνει χώρα όταν οι Rab πρωτεΐνες βρίσκονται στην ενεργοποιημένη GTP μορφή τους (Rab:GTP). Ο συνεντοπισμός αρκετών διαφορετικών Rab πρωτεϊνών στην ίδια μεμβράνη, προϋποθέτει την παρουσία ρυθμιστικών κυκλωμάτων για τον συντονισμό των λειτουργιών τους. Οι περιοχές αυτές θεωρούνται δυναμικές, αλλά δεν παρατηρείται ανάμιξη μεταξύ τους με την πάροδο του χρόνου (Barbero P. *et.al*, 2002; Chavrier P. *et.al*, 1990).



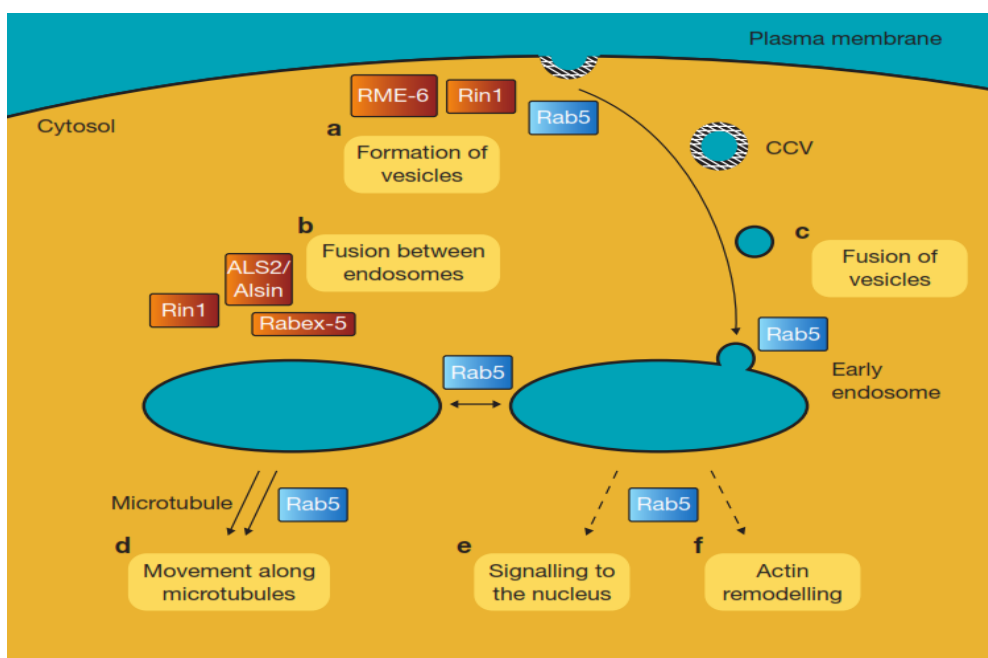
Εικ. 1.3: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των Rab πρωτεϊνών. Η εικόνα περιγράφει συνοπτικά τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των Rab πρωτεϊνών στα κύτταρα των θηλαστικών. Ορισμένες Rab πρωτεΐνες εκφράζονται ιστοειδικά (παραδείγματος χάριν, η Rab17 εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα), άλλες εκφράζονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (η Rab3a εκφράζεται στους νευρώνες) και άλλες εκφράζονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους με τις λειτουργίες τους να επιτελούνται σε εξειδικευμένες, ενδοκυτταρικές τοποθεσίες (η Rab13 εκφράζεται και μεταφέρεται στους στεγανοσυνδέσμους). CCV: Μembranικά κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη, EC: Επιθηλιακά κύτταρα, IC: Ενδιάμεσο διαμέρισμα μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και συστήματος Golgi, MTOC: Κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων, SG: Εκκριτικά κυστίδια, SV: Συναπτικά κυστίδια, M: Μελανοσώματα, T: T-κύτταρα, TGN: Δίκτυο trans-Golgi. Zerial M. and McBride H. *Nature Reviews*, 2001.

Η Rab5 ανακαλύφθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά μαζί με άλλες ευκαρυωτικές GTPάσες στην μελέτη των Chavrier P. *et.al* το 1990. Έως σήμερα αποτελεί την περισσότερο μελετημένη GTPάση και έχουν προσδιοριστεί τρεις ισομορφές της: η Rab5a, Rab5b και Rab5c (Bucci C. *et.al*, 1995). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους (~ 25 kDa) και αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τα πρώιμα στάδια της ενδοκυττάρωσης. Πιο συγκεκριμένα, η Rab5 ρυθμίζει την μεταφορά των καλυμμένων με κλαθρίνη

κυστιδίων (clathrin-coated vesicles) από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα πρώιμα ενδοσώματα, την ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων καθώς και την κινητικότητά τους με την βοήθεια του κυτταροσκελετού (Zerial M. & McBride H., 2001; Gorvel J. *et.al*, 1991; Bucci C. *et.al*, 1992). Συνοπτικά, η Rab5 αποτελεί κρίσιμο ρυθμοκαθοριστή (rate-limiting) της διαλογής του ενδοσωματικού φορτίου είτε προς το μονοπάτι της αποικοδόμησης ή προς το μονοπάτι της ανακύκλωσης (Feliciano W. D. *et.al*, 2011; Zeigerer A. *et.al*, 2012). Ο ρόλος της Rab5 στα πρώιμα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης συνοψίζεται στην εικόνα 1.4.

Λειτουργικές μελέτες με κυρίαρχα αρνητικές (dominant-negative) μεταλλάξεις της Rab5 παρουσίασαν αναστολή της διαμεσολαβούμενης από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης, ενώ κυρίαρχα ενεργοποιητικές (dominant-activating) μεταλλάξεις επιτάχυναν τα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης, υποδεικνύοντας ότι η δραστηριότητα της Rab5 μπορεί να καταστεί ρυθμοκαθοριστική στα πρώιμα στάδια της διαδικασίας (Bucci C. *et.al*, 1992). Επιπλέον, πρωτεομικές μελέτες απέδειξαν πως οι τρεις ισομορφές της Rab5 μπορούν να ουβικιτινωθούν σε πολλαπλές θέσεις. Πιο συγκεκριμένα, η μονο-ουβικιτινίωση της Rab5 λειτουργεί ως ανασταλτικό σήμα του ρυθμιστικού της κύκλου (Shin D. *et.al*, 2017). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι οι λειτουργίες της Rab5 συσχετίζονται άμεσα με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και η νόσος Πάρκινσον. Σε μοριακό επίπεδο, η Rab5 ρυθμίζει τη διακίνηση του NGF (αυξητικός παράγοντας των νευρώνων) καθώς και υποδοχέων των νευροτροφινών στους νευρώνες (Falk J. *et.al*, 2014; Deinhardt K. *et.al*, 2006). Απορρύθμιση των λειτουργιών της Rab5 μπορεί να προκαλέσει πληθώρα νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως προαναφέρθηκε, οδηγώντας σε διόγκωση των ενδοσωμάτων στο εσωτερικό των νευρώνων, γεγονός που επιφέρει κυτταρικό θάνατο (Lainfeld D. *et.al*, 2007; Kim S. *et.al*, 2016). Πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η συνεχής ενεργοποίηση της Rab5 διαταράσσει τα υπόλοιπα ενδοκυτταρικά μονοπάτια, όπως αυτά που οδηγούν τα φορτία στα όψιμα ενδοσώματα, στα λυσοσώματα και σε γεγονότα αυτοφαγίας. Οι παραπάνω διαταραχές οδηγούν στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου Αλτσχάιμερ (Xu W. *et.al*, 2018). Επιπρόσθετα, στη νόσο του Πάρκινσον παρατηρείται αυξορύθμιση της ενδοσωματικής κυστιδιακής διακίνησης, καθώς βρέθηκαν αυξημένες ποσότητες της Rab5 στους νευρώνες του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνο για τον συντονισμό των κινήσεων του σώματος και άλλων λειτουργιών (Mingazon E. R. and Ugrumov M. V., 2016). Τέλος, οι

λειτουργίες της Rab5, όπως και άλλων πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται και από τον ιό HSV-1 για την ενδοκυττάρωση των ιικών γλυκοπρωτεϊνών οι οποίες, με τη σειρά τους, αλληλεπιδρούν με τα ιικά καψίδια και συμμετέχουν στη διαδικασία της ιικής ωρίμανσης (Raza S. *et.al*, 2018).



Εικ. 1.4: Διαφορετικές λειτουργίες της Rab5 στην πλασματική μεμβράνη και στα πρώιμα ενδοσώματα. Η Rab5 εμπλέκεται στον σχηματισμό των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων (clathrin-coated vesicles ή CCV) (a), ελέγχει την ομοτυπική σύντηξη μεταξύ των πρώιμων ενδοσωμάτων (b), ελέγχει την σύντηξη των κυστιδίων που προέρχονται από την πλασματική μεμβράνη με τα πρώιμα ενδοσώματα (c), ελέγχει την κινητικότητα των πρώιμων ενδοσωμάτων με τη βοήθεια των μικροσωληνίσκων (d), και εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στον πυρήνα του κυττάρου και τροποποιείται η γονιδιακή τους έκφραση (e). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει μία συσχέτιση μεταξύ της Rab5 και της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης (f). *Van der Bliek A. M. Nature Cell Biology, 2005.*

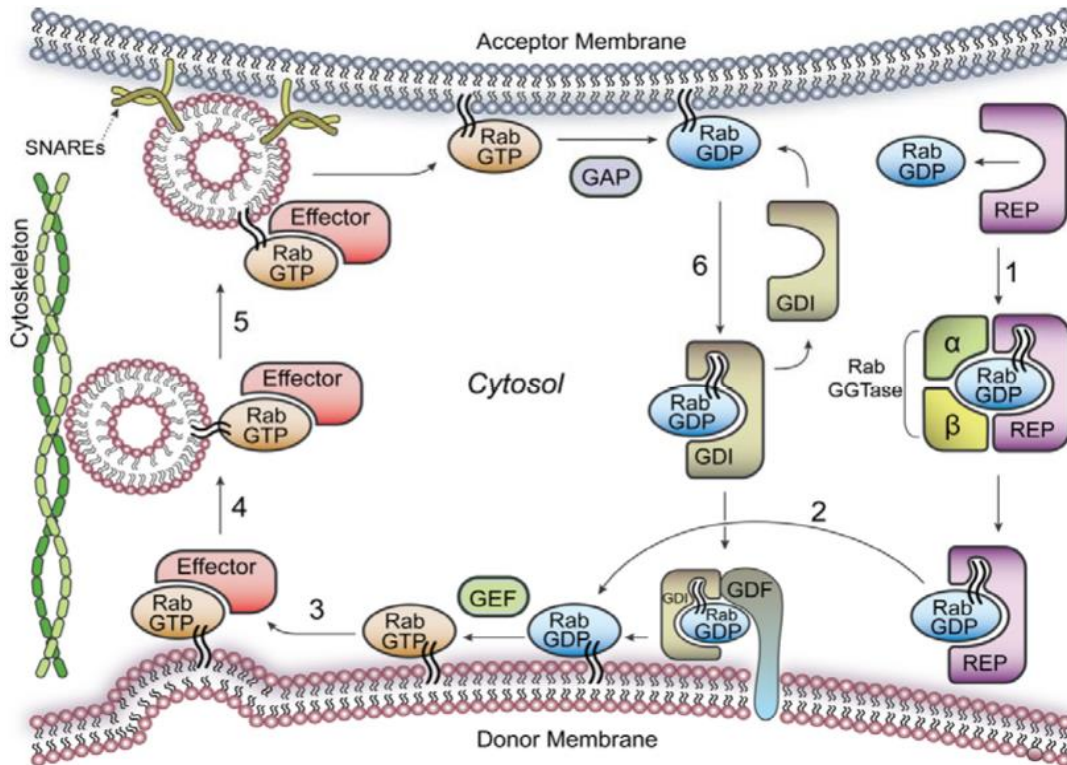
1.3.1 Πρενυλίωση της Rab5 και ο μεμβρανικός κύκλος της

Οι Rab πρωτεΐνες εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στις μεμβράνες των εκάστοτε διαμερισμάτων με σκοπό την ρύθμιση της διακίνησης του φορτίου. Είναι γνωστό ότι οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες δεν έχουν την ενδογενή ιδιότητα να προσδένονται στις μεμβράνες, καθώς δεν διαθέτουν τις κατάλληλες διαμεμβρανικές επικράτειες (transmembrane domains). Γι' αυτό το λόγο είναι επιτακτική η ανάγκη οι Rab πρωτεΐνες να τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά, έτσι ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεσή τους και σε φωσφολιπιδικές μεμβράνες όπου στην συνέχεια θα

ενεργοποιηθούν και θα επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Πιο συγκεκριμένα, οι Rab πρωτεΐνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά στο καρβοξυτελικό άκρο τους (C-terminal) με την πρόσδεση υδρόφοβων ομάδων πρενυλίου, οι οποίες βοηθούν στην αγκυροβόλησή τους στις μεμβράνες. Η πρενυλίωση περιλαμβάνει την ομοιοπολική πρόσδεση του γερανυλ-γερανυλίου, μιας λιπιδικής υδρόφοβης ουράς που αποτελείται από είκοσι ομάδες ισοπρενυλίου, σε ένα ή δύο κατάλοιπα κυστεΐνης διαμέσου ενός σταθερού θειοαιθερικού δεσμού (Casey P. J. and Seabra M. C., 1996; Li F. *et.al*, 2014). Συνήθως, οι Rab πρωτεΐνες πρενυλιώνονται με την προσθήκη δύο ομάδων γερανυλ-γερανυλίου στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η διαδικασία της γερανυλίωσης των Rab πρωτεϊνών καταλύεται από το ένζυμο Rab τρανσφεράση του γερανυλ-γερανυλίου (Rab geranylgeranyl transferase ή RGGT) (Seabra M. C., 2000).

Ο μεμβρανικός κύκλος της Rab5 (Εικ. 1.5), όπως όλων των Rab πρωτεϊνών, επιτρέπει χωρο-χρονικό έλεγχο της δραστικότητάς της και ρυθμίζεται από αρκετούς παράγοντες. Αρχικά, οι νεοπρενυλιωμένες Rab πρωτεΐνες μεταφέρονται στις μεμβράνες-στόχους είτε με την βοήθεια της πρωτεΐνης REP ή με αυτήν της Rab-GDI (Rab GDP Dissociation Inhibitor), όπου ενεργοποιούνται από εξειδικευμένους πρωτεϊνικούς παράγοντες (Guanine nucleotide Exchange Factors ή GEFs) πραγματοποιώντας την ανταλλαγή του GDP με GTP. Η Rab-GDI, με τη σειρά της, έχει την ιδιότητα να απενεργοποιεί και να αποσπάει τις Rab πρωτεΐνες από τις μεμβράνες, προστατεύοντας, ταυτόχρονα, στο εσωτερικό της την υδρόφοβη λιπιδική ομάδα του γερανυλ-γερανυλίου από το υδατικό κυτταροπλασματικό περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται σταθερά κυτταροπλασματικά σύμπλοκα των Rab πρωτεϊνών, οι οποίες ανακυκλώνονται και καθίστανται έτοιμες για νέο μεμβρανικό κύκλο. Να σημειωθεί ότι οι Rab πρωτεΐνες υφίστανται πολλαπλούς μεμβρανικούς κύκλους όσο βρίσκονται σε λειτουργική μορφή. Οι ενεργοποιημένες Rab:GTP πρωτεΐνες στρατολογούν μία μεγάλη ποικιλία καθοδικών μορίων-τελεστών στις μεμβράνες. Έπειτα, ακολουθεί η υδρόλυση του GTP νουκλεοτιδίου, μία αντίδραση που καταλύεται από μία άλλη πρωτεΐνη, την GAP (GTPase Activating Protein), και μετατρέπει τις Rab πρωτεΐνες στην ανενεργή τους μορφή (Rab:GDP). Τέλος, οι απενεργοποιημένες Rab πρωτεΐνες γίνονται επιρρεπείς στην απόσπασή τους από τις μεμβράνες από την Rab-GDI, μεταφέρονται και σταθεροποιούνται εκ νέου σε νέα μεμβράνη – δότη με τη βοήθεια ενός άλλου παράγοντα που εκτοπίζει την Rab – GDI

(GDI – Displacement Factor ή GDF) και ο κύκλος ολοκληρώνεται (Seabra M. C. & Wasmeier C., 2004; Seixas E. *et.al*, 2013).

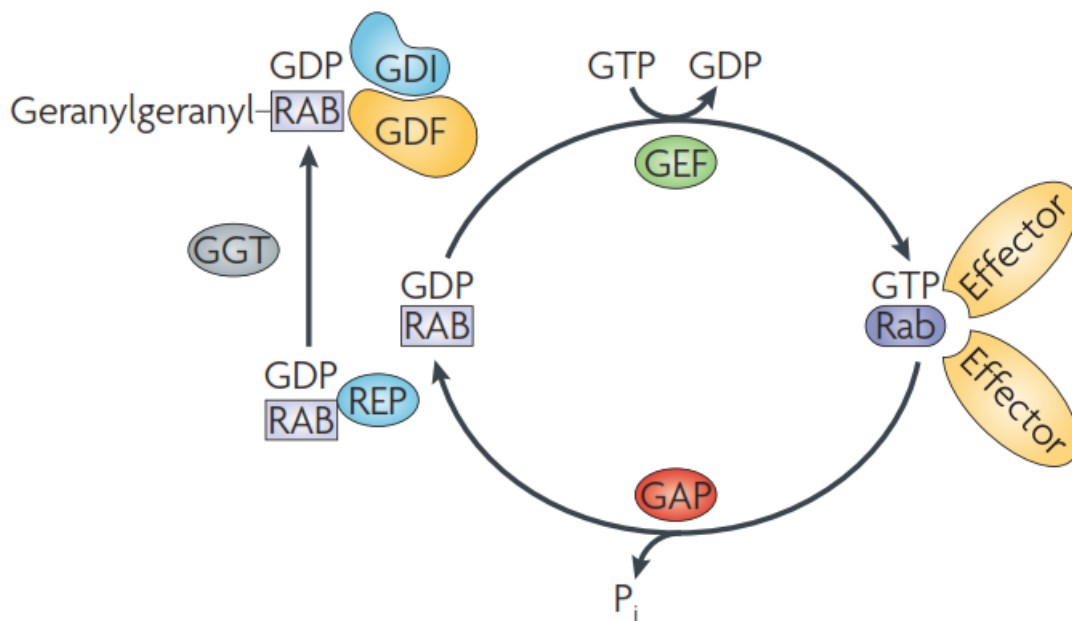


Εικ. 1.5: Μεμβρανικός κύκλος των Rab πρωτεϊνών. Μετά την σύνθεσή τους, οι Rab πρωτεΐνες προσδένονται στην REP στην ανενεργή GDP-μορφή τους. Έπειτα, η REP τις οδηγεί στο ένζυμο RGGT το οποίο καταλύει την αντίδραση πρενυλίωσης (βήμα 1) και ακολουθεί η μεταφορά τους στις μεμβράνες των διαμερισμάτων-δοτών (donor membranes) (βήμα 2). Κατόπιν, λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή του GDP με GTP και η επακόλουθη ενεργοποίησή τους με την βοήθεια των GEFs. Οι ενεργοποιημένες Rab πρωτεΐνες στρατολογούν άλλα μόρια-τελεστές (effectors) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εκβλάστηση (βήμα 3), την μεταφορά (βήμα 4) και την συγκράτηση/αγκυροβόληση του κυστιδίου μεταφοράς με την μεμβράνη-δέκτη (acceptor membrane) (βήμα 5). Κατά την διάρκεια ή μετά το πέρας των γεγονότων σύντηξης του κυστιδίου με την μεμβράνη-στόχο, μία διαδικασία που διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες SNAREs, οι Rab πρωτεΐνες απενεργοποιούνται με την παρουσία των GAPs, καθώς υδρολύουν το GTP σε GDP. Τέλος, η Rab-GDI στρατολογείται στη μεμβράνη, συνδέεται με την Rab:GDP, την αποσπάει στο κυτταρόπλασμα (βήμα 6) και τη μεταφέρει σε νέα μεμβράνη-δότη με την βοήθεια του παράγοντα GDF (GDI-displacement factor), ο οποίος αποσταθεροποιεί το σύμπλοκο Rab:GDP-GDI, έτσι ώστε να ξεκινήσει καινούργιος μεμβρανικός κύκλος. Seixas E. *et.al*, *Traffic*, Wiley Online Library, 2013.

1.3.2 Ενεργοποίηση και νουκλεοτιδικός κύκλος της Rab5 GTPάσης

Όλες οι πρωτεΐνες Rab, συνεπώς και η Rab5, επιτελούν και έναν νουκλεοτιδικό κύκλο παράλληλα με τον μεμβρανικό τους κύκλο, όπως προαναφέρθηκε (Εικ. 1.6). Ο

νουκλεοτιδικός κύκλος της Rab5 περιλαμβάνει δύο μορφές, την ενεργή και την ανενεργή. Η Rab5 μεταβαίνει ανάμεσα στην ενεργή κατάσταση προσδένοντας GTP (Rab5:GTP) και στην ανενεργή κατάσταση υδρολύοντας το GTP σε GDP (Rab5:GDP). Όταν είναι ενεργοποιημένη, η Rab5 είναι προσδεμένη μόνο επάνω στις μεμβράνες, ενώ στην ανενεργή κατάσταση μπορεί να βρίσκεται είτε στο κυτταρόπλασμα ή επάνω στις μεμβράνες (Stenmark H. *et.al*, 1994; Seabra M. C. & Wasmeier C., 2004).



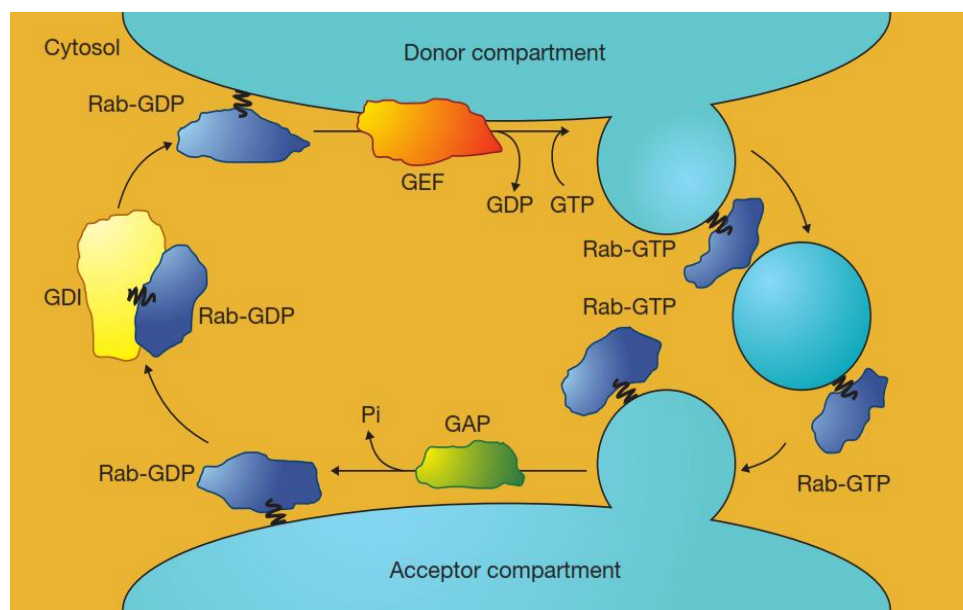
Εικ. 1.6: Ενεργοποίηση και νουκλεοτιδικός κύκλος των Rab GTPασών. Οι Rab GTPάσες μεταβαίνουν ανάμεσα σε μία ενεργή νουκλεοτιδική κατάσταση προσδεμένες με GTP και σε μία ανενεργή νουκλεοτιδική κατάσταση προσδένοντας GDP. Η μετατροπή των ανενεργών Rab (Rab:GDP) στην ενεργή μορφή τους (Rab:GTP) συμβαίνει μέσω ανταλλαγής του GDP με GTP, γεγονός που καταλύεται από τις πρωτεΐνες GEFs προκαλώντας μία αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση των Rab πρωτεϊνών. Η ενεργοποιημένη GTP-μορφή των Rab πρωτεϊνών αναγνωρίζεται από μία πληθώρα μορίων-τελεστών (effectors), οι οποίοι δρουν καθοδικά. Τέλος, οι Rab πρωτεΐνες μετατρέπονται στην GDP ανενεργή μορφή τους με την υδρόλυση του GTP και την απελευθέρωση μιας ανόργανης φωσφορικής ομάδας (P_i), μιας διαδικασίας που διεγείρεται από τις GAPs. Στην εικόνα παρουσιάζεται συνοπτικά και ο μεμβρανικός κύκλος παράλληλα με τον νουκλεοτιδικό, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για δύο αλληλένδετα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα και ρυθμίζονται ταυτόχρονα. *Stenmark H. Nature Reviews, 2009.*

Η μετατροπή ανάμεσα στην GTP και GDP κατάσταση των Rab GTPασών περιλαμβάνει σημαντικές αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωσή τους σε δύο μεταβλητές περιοχές ονόματι περιοχή I (switch I) και περιοχή II (switch II) (Pfeffer S. R., 2005). Η ανταλλαγή του GDP με GTP καταλύεται από τις πρωτεΐνες GEFs και η υψηλή

ενδοκυτταρική συγκέντρωση του GTP (~ 1 mM) εξασφαλίζει ότι το GTP θα προσδεθεί στις Rab πρωτεΐνες αμέσως μετά την απελευθέρωση του GDP. Αρκετά μόρια–τελεστές στρατολογούνται και ενεργοποιούνται από τις ενεργοποιημένες Rab πρωτεΐνες (Rab:GTP) διαμέσου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι τελεστές μπορεί να περιλαμβάνουν παράγοντες πρόσδεσης των κυστιδίων (tethering factors), φωσφατάσες, κινάσες, πρωτεΐνες μεταφορείς (motor proteins) και άλλους (βλ. ενότητα 1.3.3 Τελεστές της Rab5). Έως σήμερα, οι τελεστές της Rab5 είναι καλύτερα χαρακτηρισμένοι συγκριτικά με τις υπόλοιπες Rab πρωτεΐνες (Zerial M. and McBride H., 2001). Επιπρόσθετα, η μετατροπή του GTP σε GDP θεωρείται ενδογενής δραστηριότητα όλων των G–πρωτεϊνών, η οποία ενισχύεται επιπλέον με την συμμετοχή των GAPs (Stenmark H., 2009; Schmidt A. & Hall A., 2002). Συνοπτικά, οι πρωτεΐνες GEFs προκαλούν αντικατάσταση του GDP με GTP στις Rab πρωτεΐνες και τις ενεργοποιούν (On–switch), ενώ η υδρόλυση του GTP σε GDP καταλύεται τόσο ενδογενώς όσο και από τις GAPs και καθιστά τις Rab πρωτεΐνες ανενεργές (Off–switch). Εξαιτίας του νουκλεοτιδικού τους κύκλου, οι Rab πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί ως «μοριακοί διακόπτες» που παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση των γεγονότων της κυστιδιακής μεταφοράς. Επιπλέον, η δυναμική φύση και η αυστηρή χρονική ρύθμιση του νουκλεοτιδικού κύκλου της Rab5 είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της κινητικής των γεγονότων ελλιμενισμού των μεμβρανών (membrane docking) και σύντηξής τους (Rybin V. *et.al*, 1996).

Στην εργασία των Li G. and Stahl P. D., 1993 για τον προσδιορισμό του ρόλου της δραστηριότητας GTPάσης της Rab5 στην λειτουργία της, χρησιμοποιήθηκαν δύο μεταλλαγές: η Rab5:S34N και η Rab5:Q79L. Υπερέκφραση της Rab5:S34N οδήγησε στην παραγωγή δυσλειτουργικής πρωτεΐνης, η οποία παρουσίαζε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης νουκλεοτιδίου, αναστέλλοντας πλήρως την ενδογενή λειτουργία της. Από την άλλη πλευρά, υπερέκφραση της Rab5:Q79L οδήγησε στην παραγωγή μίας πρωτεΐνης με μειωμένη δραστηριότητα GTPάσης, «κλειδώνοντας» την Rab5 στην GTP–ενεργή μορφή της. Αυτή η μεταλλαγή κέρδους λειτουργίας (gain of function) δεν επηρέασε λειτουργικά την Rab5:Q79L συγκριτικά με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι η Rab5:Q79L προάγει την σύντηξη των ενδοσωμάτων *in vitro*, ενώ η Rab5:S34N μεταλλαγή αναστέλλει την σύντηξή τους (Li G. *et.al*, 1994; Barbieri M. A. *et.al*, 1996). Να τονιστεί πως η Rab5:Q79L διεγείρει την σύντηξη μόνο μεταξύ των πρώιμων ενδοσωμάτων (Barbieri

M. A., *et.al*, 1998). Οι αντίθετες δράσεις των δύο μεταλλαγών υποδεικνύουν πως η ενεργή Rab5:GTP απαιτείται για την σύντηξη των μεμβρανών, ενώ η υδρόλυση του GTP σε GDP απενεργοποιεί την Rab5 και λαμβάνει χώρα μετά την σύντηξη των μεμβρανών με σκοπό την ολοκλήρωση του νουκλεοτιδικού κύκλου. Η εικόνα 1.7 παρουσιάζει συνοπτικά τους δύο κύκλους που προαναφέρθηκαν.



Εικ. 1.7: Σύνοψη του μεμβρανικού και νουκλεοτιδικού κύκλου των Rab πρωτεϊνών. Οι Rab πρωτεΐνες είναι αγκυροβολημένες στις μεμβράνες με την βοήθεια μιας υδρόφοβης λιπιδικής ομάδας (κυματιστή γραμμή). Οι πρωτεΐνες GEF στις μεμβράνες-δότες ενεργοποιούν τις Rab πρωτεΐνες καταλύοντας την ανταλλαγή του GDP με GTP. Στη συνέχεια, αρχίζουν να εκβλαστάνουν κυστίδια και κατευθύνονται προς την μεμβράνη-δέκτη. Οι ενεργοποιημένες Rab:GTP πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της σύντηξης του κυστιδίου μεταφοράς με την κατάλληλη μεμβράνη-δέκτη. Μετά το πέρας των γεγονότων σύντηξης, οι Rab:GTP απενεργοποιούνται από τις GAPs υδrolώντας το GTP σε GDP και αποσπώνται από την μεμβράνη-δέκτη με την βοήθεια της Rab-GDI, η οποία μεταφέρει τις Rab πρωτεΐνες στις μεμβράνες-δότες διαμέσου του κυτταροπλάσματος και οι κύκλοι ολοκληρώνονται. *Van der Bliek A. M. Nature Cell Biology, 2005.*

1.3.3 Τελεστές της Rab5

Η πολυπλοκότητα και το πλήθος των λειτουργιών που ελέγχονται από την Rab5 (τα γεγονότα σχηματισμού κυστιδίων μεταφοράς, κινητικότητας, προσάραξης στις κατάλληλες μεμβράνες-δέκτες και σύντηξης) οφείλονται κατά κύριο λόγο σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της ενεργής GTP-μορφής της Rab5 με άλλα μόρια-τελεστές (effectors) (Zerial M. & McBride H., 2001). Όπως προαναφέρθηκε, οι τελεστές της Rab5 είναι καλύτερα χαρακτηρισμένοι έως σήμερα, συγκριτικά με τους

τελεστές άλλων Rab πρωτεϊνών, και ο αριθμός τους προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στην μελέτη των Christoforidis S., *et al.*, 1999 και Christoforidis S. & Zerial M., 2000. Με την χρήση μόνο μιας χρωματογραφίας συγγένειας ταυτοποιήθηκαν πάνω από 30 μόρια–τελεστές σε κυτταρόπλασμα εγκεφάλου βωός, που αλληλεπιδρούσαν με την ενεργή GTP μορφή της Rab5, οι οποίοι απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, σε λειτουργικές μελέτες (Εικ. 1.10). Η μελέτη αυτή άνοιξε τον δρόμο για την περαιτέρω ανάλυση των πρωτεϊνών–τελεστών της Rab5 αναφορικά με τον βιολογικό τους ρόλο στα ευκαρυωτικά συστήματα.

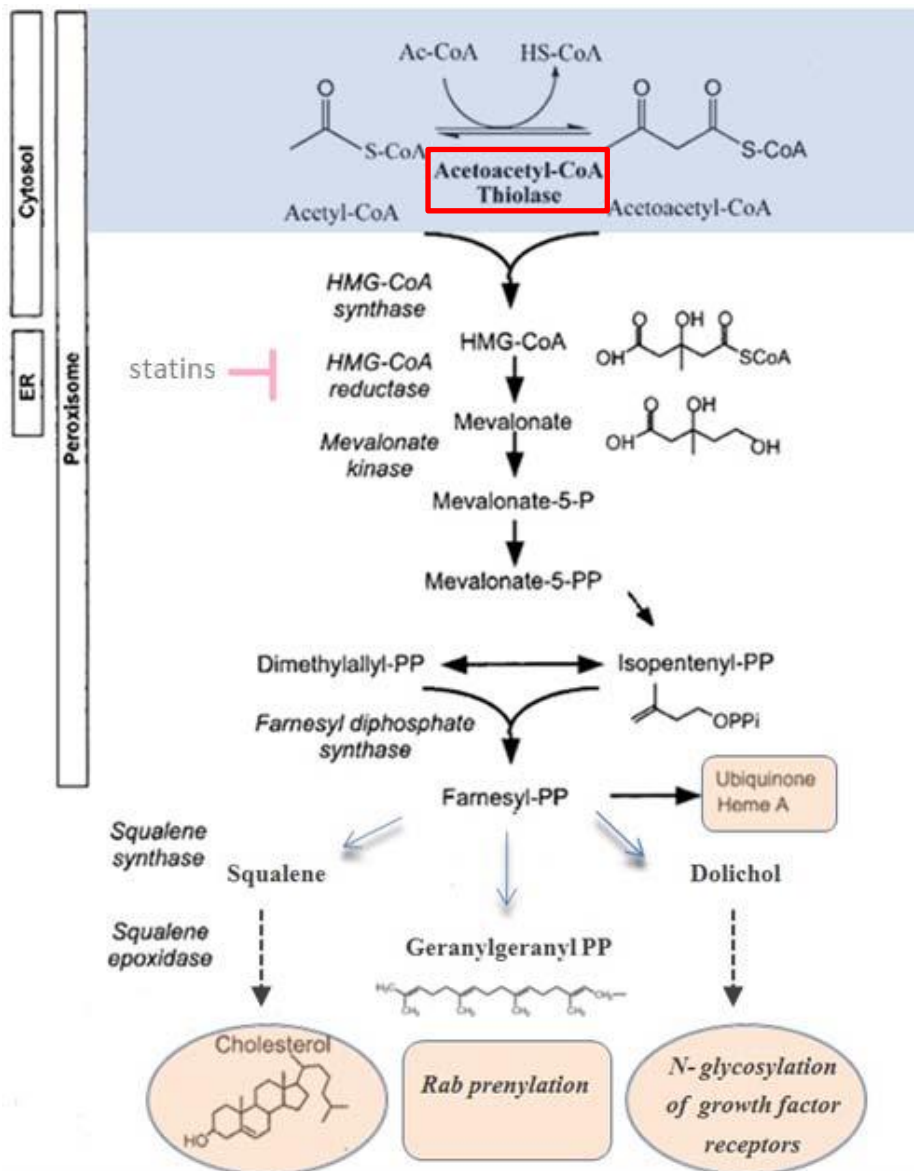
1.4 Η κυτταροπλασματική ακετυλο–CoA θειολάση, ή ακετυλο–CoA ακετυλοτρανσφεράση, ACAT2, αποτελεί το πρώτο ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος

Οι ευκαρυωτικές θειολάσες (ACATs) αποτελούν σημαντικά ένζυμα του μεταβολισμού. Έχουν ανιχνευθεί τουλάχιστον έξι ισοένζυμα θειολασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Antonenkov V. *et.al*, 2000) τα οποία χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: (i) η θειολάση I (ACAT1) ή ακυλ–CoA: ακετυλ–CoA C–ακετυλτρανσφεράση (EC 2.3.1.16) και (ii) η ακετοακετυλ–CoA θειολάση ή θειολάση II (ACAT2) (EC 2.3.1.9). Η πρώτη κατηγορία θειολασών εμπλέκεται σε καταβολικές διεργασίες, ενώ η δεύτερη κυρίως σε αναβολικές, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Οι δύο κατηγορίες θειολασών εμφανίζουν ομολογία στην πρωτεϊνική τους αλληλουχία, αλλά διαφέρουν στις καταλυτικές τους ιδιότητες, όπως απέδειξαν κρυσταλλογραφικές μελέτες (Igual J. C. *et.al*, 1992; Modis Y. & Wierenga R. K., 2000). Για να αποφευχθεί πιθανή ονοματολογική σύγχυση, στο υπόλοιπο κείμενο ο όρος ACAT2 θα αναφέρεται στην κυτταροπλασματική ακετοακετυλ–CoA θειολάση, η οποία αποτέλεσε κύριο αντικείμενο της μελέτης, και όχι στο διαμεμβρανικό ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου (Sterol O-acyltransferase 2 ή σε συντομογραφία SOAT2) που έχει εντελώς διαφορετική λειτουργία από την κυτταροπλασματική ακετοακετυλ–CoA θειολάση.

Στα θηλαστικά υπάρχουν δύο ACAT γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων, ονόματι ACAT1 και ACAT2. Το ACAT1 γονίδιο κωδικοποιεί σε όλους τους ιστούς (ιδιοστατική έκφραση) μία μιτοχονδριακή θειολάση που συμμετέχει στην αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων, όπως προαναφέρθηκε. Από την άλλη, το ACAT2 γονίδιο (που είναι αντικείμενο της παρούσας μελέτης), που κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική θειολάση (CT),

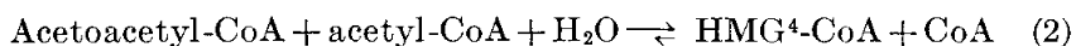
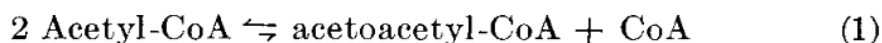
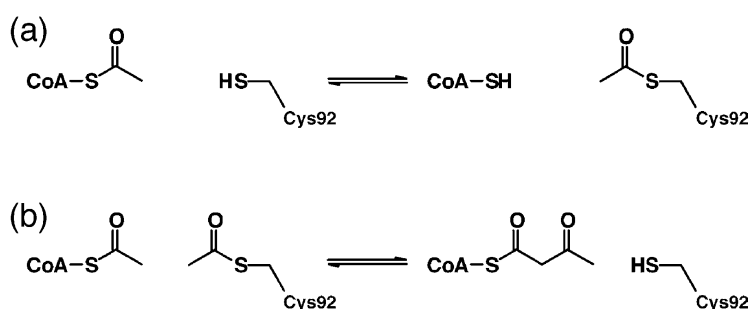
εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή 6q25–27 (Masuno M. *et.al*, 1996; Song X. Q. *et.al*, 1994) και συμμετέχει στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης (Fukao T. *et.al*, 2002). Τα δύο ισοένζυμα είναι ομοτετραμερή με την κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος ~ 44 kDa.

Η κυτταροπλασματική ακετυλο–CoA ακετυλοτρανσφεράση (ACAT2) καταλύει την πρώτη αντίδραση του μονοπατιού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέος, αναπόσπαστο κομμάτι της μετέπειτα σύνθεσης χοληστερόλης και άλλων λιπιδικών παραγώγων με σημαντικές βιολογικές δράσεις (Εικ. 1.8). Η πρώτη απομόνωση του ενζύμου ACAT2 από ήπαρ όρνιθας χρονολογείται το 1973 από τους Clinkenbeard K. D. *et.al*. Στη συνέχεια, η μέθοδος κρυσταλλογραφίας ακτινών X αποκάλυψε την τριτοταγή δομή του ενζύμου (ανάλυση 1.6 Ångstrom) και άνοιξε νέους ερευνητικούς ορίζοντες στη μελέτη της δράσης του ενζύμου (Kursula P. *et.al*, 2005). Η έκφραση της ACAT2 περιορίζεται κυρίως στον εντερικό ιστό και στα ηπατοκύτταρα. Ωστόσο, εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την ACAT1, η οποία εκφράζεται ιδιοστατικά (Chang T. Y. *et.al*, 2009).



Εικ. 1.8: Η ACAT2 καταλύει την πρώτη αντίδραση στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού. Η βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών λαμβάνει χώρα διαμέσου του μονοπατιού του μεβαλονικού. Η ACAT2 καταλύει την πρώτη αντίδραση στο κυτταρόπλασμα, μετατρέποντας δύο μόρια ακετύλο-CoA σε ακετοακέτυλο-CoA. Στη συνέχεια, παράγεται το 3-υδροξυ-3 μεθυλογλουτάρυλο-CoA από την συνθάση του HMG-CoA και, κατόπιν, ανάγεται μη αντιστρεπτά σε μεβαλονικό από την αναγωγή του HMG-CoA. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται ενσωματωμένο στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και υφίσταται αυστηρή ρύθμιση σε πολλαπλά επίπεδα. Αξιοσημείωτο είναι πως οι στατίνες αποτελούν φαρμακολογικοί αναστολείς της αναγωγής του HMG-CoA με σκοπό τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης σε παθολογικές καταστάσεις. Το μεβαλονικό, μετά από μια σειρά χημικών αντιδράσεων, μετατρέπεται σε πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (Farnesyl-PP), το οποίο χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο για την βιοσύνθεση χοληστερόλης, της αίμης A και της ουβικινόνης (απαραίτητα στοιχεία για την μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την διαδικασία παραγωγής ενέργειας), για την πρενυλίωση πρωτεϊνών και την αγκυροβόλησή τους στις μεμβράνες καθώς και για την N-γλυκοζυλίωση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.

Η κυτταροπλασματική ACAT2 καταλύει τον σχηματισμό δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C) μέσω συμπύκνωσης κατά Claisen δύο μορίων ακετυλ-CoA προς παραγωγή ακετοακετυλ-CoA και CoA και αντιστρόφως (Εικ. 1.9, επάνω). Ωστόσο, η θερμοδυναμική ισορροπία της αντίδρασης ευνοεί περισσότερο την διάσπαση του ακετοακετυλ-CoA σε δύο μόρια ακετυλ-CoA (Clinkenbeard K. D. *et.al*, 1973). Γι' αυτό το λόγο η μη ευνοϊκή αντίδραση συμπύκνωσης κατά Claisen συνδέεται με την θερμοδυναμικά ευνοϊκή σύνθεση του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA (HMG-CoA) από ένα μόριο ακετοακετυλ-CoA και ενός μορίου ακετυλ-CoA (Εικ. 1.9, κάτω). Ο σχηματισμός του ακετοακετυλ-CoA από την κυτταροπλασματική ACAT2 αποτελεί την πρώτη αντίδραση του μονοπατιού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέος, ενδιάμεσο των στερολών και ισοπρενοειδών (Goldstein J. L. & Brown M., 1990).



Εικ. 1.9: Η ACAT2 καταλύει τον σχηματισμό του ακετοακετυλ-CoA στο κυτταρόπλασμα. (επάνω): (a) Η μεταφορά της ακετυλομάδας από το ακετυλ-CoA στην καταλυτική κυστεΐνη (Cys92) της ACAT2. (b) Συμπύκνωση κατά Claisen μεταξύ ακετυλ-CoA και του παροδικά ακετυλιωμένου ενζύμου προς σχηματισμό ακετοακετυλ-CoA, με τελικό αποτέλεσμα την αναγέννηση του ενζύμου και την απελευθέρωση του ακετοακετυλ-CoA στο κυτταρόπλασμα. (κάτω): Η σύνδεση της θερμοδυναμικά μη ευνοϊκής αντίδρασης συμπύκνωσης κατά Claisen (1) με την θερμοδυναμικά ευνοϊκή αντίδραση σύνθεσης του HMG-CoA που λαμβάνει χώρα στο επόμενο στάδιο της βιοσύνθεσης του μεβαλονικού (2) υποβοηθάει την ολοκλήρωση της πρώτης (1). (επάνω): Kursula P. *et.al*, *J. Mol. Biol.*, 2005. (κάτω): Clinkenbeard K. D. *et.al*, *J. Biol. Chem.*, 1973.

Μειωμένη δραστηριότητα της κυτταροπλασματικής ACAT2 παρατηρήθηκε στο παρελθόν σε δύο περιπτώσεις ασθενών, οι οποίοι παρουσίαζαν μεταβολικές

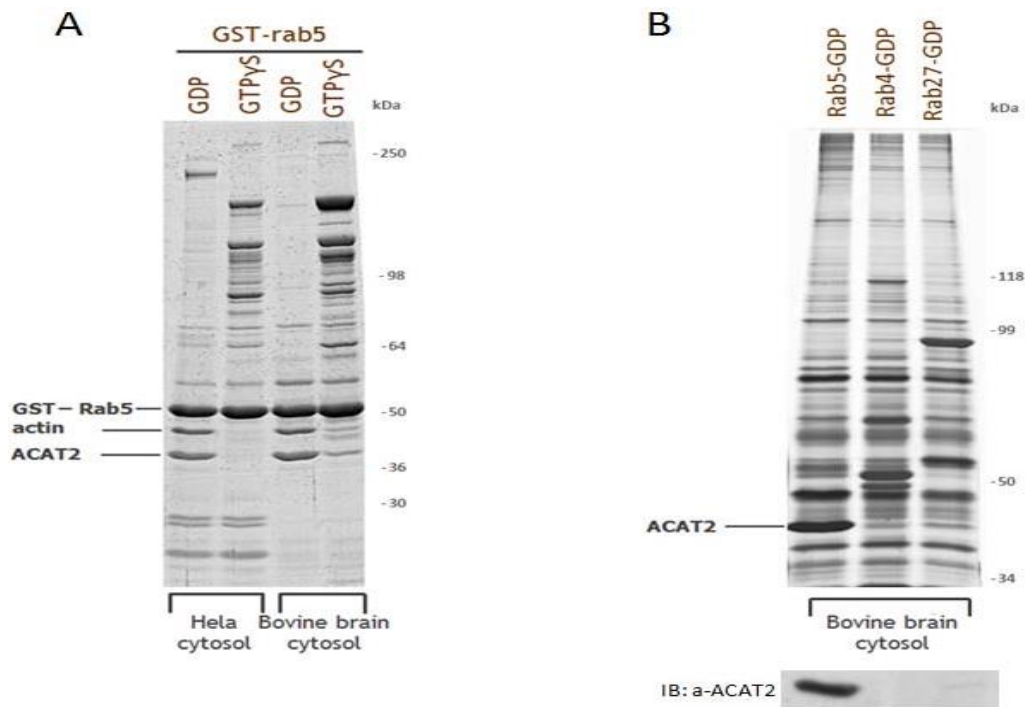
ανωμαλίες, νευρολογικές διαταραχές, διανοητική καθυστέρηση και ηπατικές ανωμαλίες (Bennett M. J. *et.al*, 1984; De Groot C. J. *et.al*, 1977). Η δραστικότητα της κυτταροπλασματικής ACAT2 εκτιμήθηκε σε απομονωμένα κύτταρα ινοβλαστών του ασθενούς ως 50% ενεργή συγκριτικά με την ενεργότητά της σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές (Bennett M. J. *et.al*, 1984). Άμεσο αποτέλεσμα της μειωμένης δραστικότητας του ενζύμου ήταν η μειωμένη σύνθεση στερολών, δεδομένου ότι η ACAT2 καταλύει το πρώτο βήμα του μονοπατιού της *de novo* σύνθεσης της χοληστερόλης στο κυτταρόπλασμα.

Γενικότερα, οι δυσλειτουργίες των θειολασών εμφανίζουν μεταβολικά σύνδρομα και καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως η αθηροσκλήρωση. Για παράδειγμα, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τόσο η ACAT1 όσο και η ACAT2 αποτελούν θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου που συσχετίζεται με την υπερχοληστερολαιμία (Lawrence L. *et.al*, 2005). Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι καρδιαγγειακές παθήσεις θεωρούνται ως η κύρια αιτία θανάτων παγκοσμίως, μεγάλο ποσοστό της έρευνας έχει στραφεί στην ανακάλυψη χημικών αναστολέων των θειολασών για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης (Salam W. H. & Bloxham D. P., 1987; Greenspan M. D. *et.al*, 1989; Ohshiro T. & Tomoda H., 2011; Ohshiro T. & Tomoda H., 2015), καθώς η συσσώρευσή της στους ιστούς και στο αίμα οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις.

1.5 Η Rab5 αλληλεπιδρά με το μεταβολικό ένζυμο ACAT2

1.5.1 Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή στερεοδιαμόρφωση της Rab5 (Rab5:GDP)

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου αποκάλυψαν μια νέα αλληλεπίδραση της Rab5: Τη σύνδεσή της με το μεταβολικό ένζυμο ACAT2 (Εικ. 1.10A, αδημοσίευτα αποτελέσματα από Christoforidis Savvas). Η ACAT2 φαίνεται να αλληλεπιδρά μόνο με την ανενεργή GDP-μορφή της Rab5, καθώς εκλούεται μόνο από την GST-Rab5:GDP στήλη. Δεδομένου ότι η ACAT2 δεν συνδέεται τόσο με την ενεργοποιημένη Rab5:GTPγS όσο και με άλλες Rab πρωτεΐνες (Εικ. 1.10B, αδημοσίευτα αποτελέσματα), υποδηλώνεται πως η αλληλεπίδραση της ACAT2 είναι ειδική μόνο με την ανενεργή GDP διαμόρφωση της Rab5.

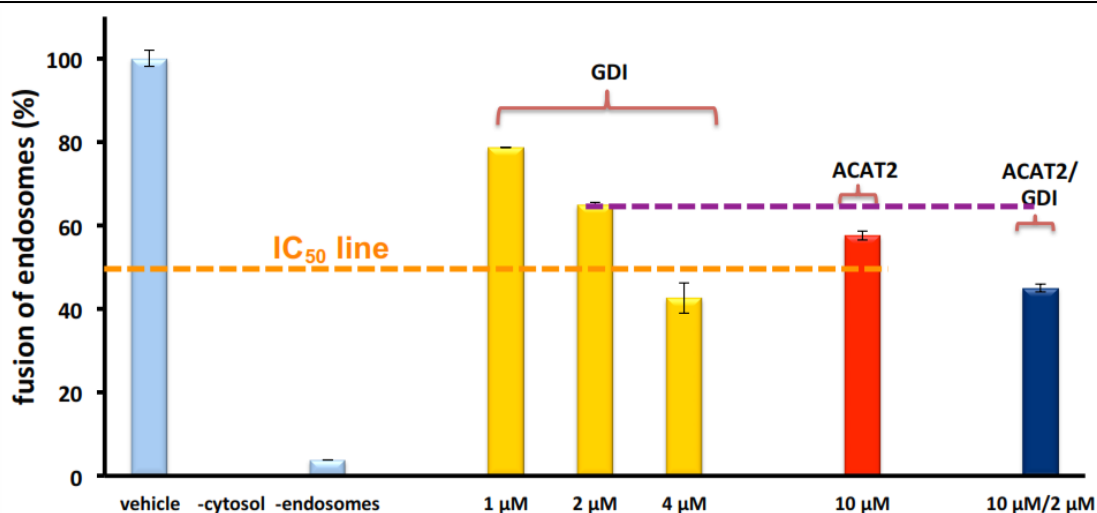


Εικ. 1.10: Η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα μόνο με την ανενεργή GDP μορφή της Rab5. (A) Η GST-Rab5 εκφράστηκε σε βακτηριακό στέλεχος DH5a και ακολούθησε η πρόσδεσή της σε ειδικά σφαιρίδια σεφαρόζης-S-γλουταθειόνης. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια πλύθηκαν με κατάλληλο διάλυμα, πραγματοποιήθηκε ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου και οι δύο στήλες χωρίστηκαν στα δύο (GDP και GTPγS μορφές της Rab5) Τέλος, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με κυτταρόπλασμα από κυτταρική σειρά HeLa καθώς και από κυτταρόπλασμα εγκεφάλου βωός. Οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν μετά από επίδραση των σφαιριδίων με διάλυμα που περιείχε SDS, τα δείγματα φορτώθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE και πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών με νιτρικό άργυρο (Silver staining). (B) Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με τις πρωτεΐνες Rab4:GDP και Rab27:GDP, όπου έγινε επώαση μόνο με κυτταρόπλασμα εγκεφάλου βωός και τα δείγματα ελέγχθηκαν, αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της Rab5:GDP, με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot analysis) χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της κυτταροπλασματικής ACAT2. *Christoforidis S., αδημοσίευτα αποτελέσματα.*

1.5.2 Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την Rab5:GDP σε ανέπαφα κύτταρα, αναστέλλοντας τις λειτουργίες της στην ενδοκυττάρωση

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (αδημοσίευτα αποτελέσματα από Christoforidis Sannas) παρατηρήθηκε ότι η κυτταροπλασματική ACAT2 αλληλεπιδρά με την ενδογενή Rab5 σε άθικτα κύτταρα HUVEC. Η στόχευση της μεταλλαγμένης Rab5 στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Flag-Rab5ΔC4-ActA) προσέελκυσε μόρια της ACAT2 στο ίδιο διαμέρισμα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy, τα αποτελέσματα δεν

παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία). Επιπλέον, για να διαλευκανθεί ο ρόλος της ACAT2 στις λειτουργικές ιδιότητες της Rab5, πραγματοποιήθηκε μία *in vitro* τεχνική ομοτυπικής σύντηξης πρώιμων ενδοσωμάτων. Για την διεξαγωγή του πειράματος εκφράστηκαν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Rab5 και ACAT2 και προστέθηκαν σε ένα μείγμα πρώιμων ενδοσωμάτων μαζί με τα απαραίτητα κυτταροπλασματικά συστατικά της σύντηξης. Σε φυσιολογικές καταστάσεις η προσθήκη της Rab5 επάγει σε μεγάλο βαθμό την σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Ωστόσο, η προσθήκη της ACAT2 προκάλεσε μία σημαντική αναστολή της σύντηξης (50% αναστολή με προσθήκη 10 μ M ACAT2) υποδηλώνοντας πως η ACAT2 αλληλεπιδρά με την Rab5 αναστέλλοντας την λειτουργία της στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Τέλος, προστέθηκε και η πρωτεΐνη GDI (φυσιολογικός αναστολέας της Rab5) στο παραπάνω μείγμα και παρατηρήθηκε ότι το ανασταλτικό αποτέλεσμα που προκαλούσαν οι δύο πρωτεΐνες στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων ήταν προσθετικό (> 50% αναστολή, Εικ. 1.11). Η προσθετική ανασταλτική δράση της ACAT2 και της GDI υποδηλώνει πως ανεξάρτητα μόρια ACAT2 και GDI προσδέονται σε ανεξάρτητα μόρια Rab5. Συμπερασματικά, η ACAT2 και η GDI φαίνεται να ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στα μόρια της Rab5.



Εικ. 1.11: Το ανασταλτικό αποτέλεσμα της ACAT2 και της GDI στην ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων είναι προσθετικό. Τα πρώιμα ενδοσώματα σημάνθηκαν και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σύντηξης παρουσία κυτταροπλάσματος, Rab5 καθώς και των Rab5–αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (ACAT2, GDI). Στο τέλος της επώασης, τα ενδοσώματα λύθηκαν και η σύντηξη ποσοτικοποιήθηκε βάσει μετρήσεων χημειοφωταύγειας. Κατασκευάστηκαν τρία δείγματα μαρτύρων για την ερμηνεία των τελικών αποτελεσμάτων. Η πρώτη ράβδος (vehicle, θετικός μάρτυρας) περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την σύντηξη (ενδοσώματα, ATP, κυτταρόπλασμα), ενώ η δεύτερη (-cytosol, αρνητικός μάρτυρας)

στερείται κυτταροπλάσματος και η τρίτη (-endosomes, αρνητικός μάρτυρας) στερείται ενέργειας (ATP) και ενδοσωμάτων. Οι υπόλοιπες ράβδοι περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την σύντηξη μαζί με τις ποσότητες των υπό μελέτη πρωτεϊνών. *Christoforidis S., αδημοσίευτα αποτελέσματα.*

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Συνοψίζοντας τα παραπάνω:

- Η Rab5 αποτελεί καθοριστικό μόριο στα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης και πιο συγκεκριμένα στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων.
- Οι λειτουργίες της είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια – τελεστές.
- Η κυτταροπλασματική ACAT2 αποτελεί πρωταρχικό ένζυμο της βιοσύνθεσης των λιπιδίων και φαίνεται να αλληλεπιδρά με την ανενεργή GDP μορφή της Rab5 (Rab5:GDP), όταν χρησιμοποιείται εκχύλισμα κυττάρων καλλιέργειας ή ιστού. Παραμένει όμως αδιευκρίνιστο αν η αλληλεπίδραση είναι άμεση ή έμμεση, αν δηλαδή απαιτείται ενδιάμεση πρωτεΐνη για το σχηματισμό του συμπλόκου
- Είναι πιθανό η ACAT2 να ανταγωνίζεται άλλα μόρια, όπως η GDI για πρόσδεση στην ανενεργή μορφή της Rab5, ρυθμίζοντας αρνητικά τις λειτουργίες της στο μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης. Για να κατανοηθεί ο πιθανός ανταγωνισμός μεταξύ ACAT2 και GDI (ή άλλων πρωτεϊνών) για σύνδεση με την Rab5, είναι σημαντικό να μελετηθούν οι κινητικές σταθερές αλληλεπίδρασης των επιμέρους πρωτεϊνών.

Έτσι, για να κατανοήσουμε περαιτέρω την φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2, θέσαμε δύο επιμέρους στόχους.

- Διερεύνηση της εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης μεταξύ ACAT2 και Rab5:GDP *in vitro* με χρήση ανασυνδυασμένων, καθαρισμένων πρωτεϊνών από βακτηριακά στελέχη (στέλεχος *E. coli* BL21DE3), ώστε να ελεγχθεί αν η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών συμβαίνει απευθείας (άμεση).
- Παραγωγή ικανών ποσοτήτων των δύο πρωτεϊνών (Rab5 και ACAT2) και προκαταρκτικός προσδιορισμός των πειραματικών συνθηκών για την μελέτη της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης με την μέθοδο της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry, ITC), με απώτερο (μελλοντικό) στόχο τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών και θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών της αλληλεπίδρασης τους (εντροπία, ενθαλπία, ελεύθερη ενέργεια Gibbs, στοιχειομετρία αντίδρασης) καθώς και

των σταθερών σχηματισμού (K_a) και αποδέσμευσης (K_d) του συμπλόκου τους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

2.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST–Rab5a:GDP

Για την παρασκευή 1L υγρού θρεπτικού μέσου LB, η σύσταση ήταν η εξής:

- 10 gr NaCl
- 10 gr τρυπτόνης (tryptone)
- 5 gr εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract)

Τα μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pGEX–6P1–Rab5a βακτήρια *E. coli* BL21DE3 καλλιεργήθηκαν, αρχικά, σε προ – καλλιέργεια που περιείχε 100 ml θρεπτικού μέσου Luria Broth (LB) μαζί με αμπικιλίνη (100 µg/ml), υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm), για 16 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C. Την επόμενη μέρα, ποσότητα της προ–καλλιέργειας προστέθηκε σε συνολικά 4L LB (12 ml προ–καλλιέργειας/Lt LB) μαζί με αμπικιλίνη (100 µg/ml) και η καλλιέργεια συνεχίστηκε, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C, μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm φτάσει την τιμή 0,2. Στο σημείο αυτό, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C και η καλλιέργεια συνεχίστηκε έως ότου η οπτική πυκνότητα των βακτηρίων, μετρημένη στα 600 nm (OD₆₀₀), φτάσει την τιμή 0,6. Έπειτα, ακολούθησε προσθήκη 100 µM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ανά λίτρο καλλιέργειας, για την επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης GST–Rab5a, και η καλλιέργεια συνεχίστηκε υπό ανάδευση, για 16 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C). Κατόπιν, τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν σε 6000 rpm, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C (Φυγόκεντρος Sorvall, Rotor: SLA – 3000) και επαναιωρήθηκαν σε 48 ml παγωμένου διαλύματος λύσης (lysis buffer), η σύσταση του οποίου ήταν η εξής: 50 mM Tris–HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 µg/ml DNAase, 5 µg/ml RNAase, 100 µM GDP και αναστολείς πρωτεασών δίχως EDTA (1 χάπι Complete EDTA Free της εταιρείας Roche/50 ml διαλύματος). Στη συνέχεια, ακολούθησε λύση των βακτηρίων με μηχανική πίεση (French pressure, SIM – MINCO, 1000 PSI) και το εκχύλισμα συλλέχθηκε και υπερφυγοκεντρίθηκε στις 37000 rpm (100000 g) (Υπερφυγόκεντρος Beckmann, Rotor: 70Ti), για μιάμιση ώρα, στους 4°C. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επώαστηκε με 800 µl σφαιριδίων γλουταθειόνης (Sephacrose 4B beads, GE Healthcare) σε σωληνάρια των

50 ml για 2 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Να σημειωθεί ότι προηγήθηκαν πλύσεις των σφαιριδίων γλουταθειόνης με συνολικά 12 ml PBS 1x (6 ml PBS 1x/πλύση) επάνω σε κατάλληλη χρωματογραφική στήλη (BioRad), για να απομακρυνθεί η ποσότητα της αιθανόλης που περιέχεται, εξ' αρχής, στα σφαιρίδια. Ύστερα, τα σφαιρίδια, τα οποία είχαν προσδέσει την GST-Rab5a:GDP, φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν και τοποθετήθηκαν ξανά στην χρωματογραφική στήλη. Στη συνέχεια, η στήλη πλύθηκε 5 φορές με διάλυμα πλύσης (50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10 μM GDP) με συνολικό όγκο 10 ml (2 ml/πλύση). Ακολούθησε η έκλυση της GST-Rab5a:GDP από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση διαλύματος έκλυσης (50 mM Tris - HCl, pH: 8.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 μM GDP, 15 mM ανηγμένη γλουταθειόνη), όπου η ανηγμένη γλουταθειόνη ανταγωνίζεται, λόγω μεγαλύτερης συγγένειας, τις θέσεις δέσμευσης της GST-Rab5a:GDP, απελευθερώνοντάς την στην υγρή φάση της στήλης. Συνολικά, συλλέχθηκαν 8 κλάσματα, όπου το καθένα περιείχε 200 μl καθαρής GST - Rab5a:GDP. Έπειτα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε κλάσμα με τη χρήση της μεθόδου Bradford και αναμίχθηκαν εκείνα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Ακολούθησε διαπίδυση της GST - Rab5a:GDP έναντι 500 ml διαλύματος διαπίδυσης (50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) για 16 ώρες, υπό μαγνητική ανάδευση, στους 4°C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με 500 ml διαλύματος ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίστηκε για 6 ώρες, υπό μαγνητική ανάδευση, στους 4°C. Κατόπιν, η GST-Rab5a:GDP φυγοκεντρήθηκε σε 14000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C και απομακρύνθηκε τυχόν ίζημα, το οποίο περιείχε κατακρημνισμένες πρωτεΐνες υπό μορφή συσσωματωμάτων (protein aggregates). Ποσότητα από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της τελικής συγκέντρωσης της καθαρής GST-Rab5a:GDP με τη χρήση της μεθόδου Bradford (βλ. ενότητα 2.3). Η πρωτεϊνική συγκέντρωση της καθαρής GST-Rab5a:GDP υπολογίστηκε στα 17,34 μg/μl. Επιπλέον, προστέθηκαν 100 μM GDP και 1 mM DTT στην καθαρή GST-Rab5a:GDP. Τέλος, η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης διαμοιράστηκε σε 40 ίσα μέρη (aliquots) με το καθένα να περιέχει 20 μl καθαρής πρωτεΐνης και ακολούθησε πάγωμα σε υγρό άζωτο (liquid N₂) και αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία της υπερέκφρασης και του καθαρισμού της GST-Rab5a:GDP παρουσίαζε ορισμένες διαφορές και προσαρμογές ανάλογα με την πειραματική τεχνική στην οποία θα χρησιμοποιούνταν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Παραδείγματος χάριν, το παραπάνω εργαστηριακό πρωτόκολλο αναφέρεται στην υπερέκφραση και απομόνωση της GST-Rab5a:GDP, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί, στη συνέχεια, στις τεχνικές pull down για την μελέτη της αλληλεπίδρασής της με την ACAT2 (βλ. ενότητα 3.2). Από την άλλη, στα πειράματα της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) χρησιμοποιήθηκε Rab5a:GDP αφού προηγουμένως της είχε αφαιρεθεί το πρόσδεμα GST. Για την απομάκρυνση της GST, μετά το στάδιο των πλύσεων της στήλης με διάλυμα πλύσης, ακολούθησαν 5 πλύσεις με διάλυμα σχάσης (3 ml διαλύματος/πλύση) με την εξής σύσταση: 20 mM HEPES, pH: 7.5, 130 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 200 μM GDP. Στη συνέχεια, λήφθηκε μια μικρή ποσότητα σφαιριδίων γλουταθειόνης για έλεγχο της συνολικής προσδεμένης πρωτεΐνης ως εξής: Τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Έπειτα, προστέθηκαν 40 μl διαλύματος έκλουσης με ανηγμένη γλουταθειόνη, για να αποδεσμευτούν τα μόρια της GST-Rab5a:GDP από τα σφαιρίδια. Η διαδικασία της έκλουσης διήρκεσε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με συνεχείς αναδεύσεις. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 10000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο με τις εκλουσμένες πρωτεΐνες. Ύστερα, η συγκέντρωση της GST-Rab5a:GDP εκτιμήθηκε με την μέθοδο Bradford και με απλές αναγωγικές μεθόδους υπολογίστηκε η ποσότητα της GST-Rab5a:GDP στο σύνολο των σφαιριδίων. Το ένζυμο/πρωτεάση GST-PreScission έχει την ιδιότητα να διασπάει ενζυματικά τις χιμαιρικές GST πρωτεΐνες ανάμεσα στην GST και την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος (εδώ την Rab5a:GDP) αναγνωρίζοντας μία εξειδικευμένη ενδιάμεση αλληλουχία. Για την διάσπαση, απαιτούνται 2 Units του ενζύμου PreScission ανά 100 μg χιμαιρικής GST πρωτεΐνης. Επομένως, γνωρίζοντας την συγκέντρωση του ενζύμου (16,83 μg/μl ή 16,83 Units/μl) καθώς και την ποσότητα της GST-Rab5a:GDP επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, υπολογίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που έπρεπε να προστεθεί για την διάσπαση της χιμαιρικής πρωτεΐνης και την παραγωγή καθαρής Rab5a:GDP (βλ. ενότητα 3.1.2. Μετά την προσθήκη του ενζύμου στη στήλη, το σύστημα αφέθηκε για 16 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Την επόμενη μέρα, η υγρή φάση που περιείχε την Rab5a:GDP συλλέχθηκε σε σωληνάριο τύπου eppendorf. Για την απομάκρυνση τυχόν ποσοτήτων GST-Rab5a:GDP καθώς και ενζύμου GST-PreScission που πιθανά

διαρρέουν από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (λόγω κορεσμού), 50 μl φρέσκων σφαιριδίων γλουταθειόνης προστέθηκαν στο σωληνάριο με την καθαρή Rab5a:GDP και πραγματοποιήθηκε επώαση για μιάμιση ώρα, υπό ανάδευση, στους 4°C. Κατά τη διάρκεια της επώασης, μόρια της GST-Rab5a:GDP που είχαν διαρρεύσει από τα σφαιρίδια όπως και μόρια του ενζύμου GST-PreScission προσκολλήθηκαν στα φρέσκα σφαιρίδια γλουταθειόνης και απομακρύνθηκαν από το διάλυμα της καθαρής Rab5a:GDP. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος της καθαρής Rab5a:GDP σε 10000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C με σκοπό την συλλογή των σφαιριδίων υπό μορφή ιζήματος. Ύστερα, τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν, το μίγμα τοποθετήθηκε επάνω σε χρωματογραφική στήλη και συλλέχθηκε μόνο η υγρή φάση με την καθαρή Rab5a:GDP. Τέλος, ακολούθησε η ίδια διαδικασία παγώματος της καθαρής πρωτεΐνης, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Τέλος, μικρές ποσότητες από όλα τα στάδια του καθαρισμού τόσο της GST-Rab5a:GDP όσο και της Rab5a:GDP φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R – 250 (Εικ. 3.2, Εικ. 3.3).

2.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-ACAT2

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, ο όρος ACAT2 αναφέρεται στην κυτταροπλασματική ακετοακετυλο-CoA θειολάση. Τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pGEX-6P1-ACAT2 βακτήρια *E. coli* BL21DE3 καλλιιεργήθηκαν, αρχικά, σε προ-καλλιέργεια 100 ml θρεπτικού μέσου LB, στο οποίο προστέθηκε αμπικιλίνη (100 μg/ml). Η καλλιέργεια αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση, για 16 ώρες, σε 210 rpm, στους 37°C. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 48 ml της προ-καλλιέργειας σε σύνολο 4L θρεπτικού (12 ml εμβολιασμός/Lt καλλιέργειας) συμπληρωμένο με 100 μg/ml αμπικιλίνης. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αφέθηκε σε θερμοκρασία 37°C, έως ότου η οπτική πυκνότητα των βακτηρίων στα 600 nm φτάσει την τιμή 0,2. Έπειτα, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C και η καλλιέργεια συνεχίστηκε μέχρι η οπτική πυκνότητα των βακτηρίων να φτάσει την τιμή 0,6. Ακολούθησε η προσθήκη 10 μM IPTG σε κάθε λίτρο καλλιέργειας και η υπερέκφραση της GST-ACAT2 πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 25°C (RT), για 16 ώρες. Την επόμενη μέρα, ακολούθησε ακριβώς η ίδια διαδικασία καθαρισμού της GST-ACAT2 με αυτή της GST-Rab5a:GDP, που περιγράφηκε πιο πάνω (βλ. ενότητα 2.1.1). Οι μόνες διαφορές αφορούν στην σύσταση των διαλυμάτων λύσης και πλύσεων, τα οποία δεν περιείχαν καθόλου GDP νουκλεοτίδιο. Πιο αναλυτικά, το

διάλυμα λύσης στον καθαρισμό της GST-ACAT2 είχε την εξής σύσταση: 50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 µg/ml DNAase, 5 µg/ml RNAase και αναστολείς πρωτεασών, ενώ το διάλυμα για τις πλύσεις της χρωματογραφικής στήλης είχε την εξής σύσταση: 50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε πρωτεολυτική διάσπαση της GST-ACAT2 με τη δράση του ενζύμου GST-PreScission προς παραγωγή καθαρής ACAT2 (βλ. ενότητα 3.1.1). Ο υπολογισμός της ποσότητας GST-ACAT2 επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης καθώς και όλη η διαδικασία της επώασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το ένζυμο πραγματοποιήθηκε με την ίδια λογική όπως και στην GST-Rab5a:GDP (βλ. ενότητα 2.1.1). Μετά την απομόνωση της καθαρής ACAT2, ακολούθησε διαπίδυση έναντι 500 ml διαλύματος σύστασης: 50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, υπό ανάδευση, για 16 ώρες, στους 4°C. Ακολούθησε μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με 500 ml διαλύματος ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίστηκε για 6 ώρες. Όταν ολοκληρώθηκε η διαπίδυση, προστέθηκε επιπλέον 1 mM DTT στο διάλυμα της πρωτεΐνης, η οποία χωρίστηκε σε 15 ίσα μέρη (30 µl ACAT2/μερίδιο) και υπέστη πάγωμα σε υγρό άζωτο και αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C. Η συγκεκριμένη ποσότητα της ACAT2 χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις τεχνικές κατακρήμνισης (pull down) που έλαβαν χώρα στη συνέχεια. Η συγκέντρωσή της υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford και εκτιμήθηκε στα 1,51 µg/µl. Παράλληλα, ποσότητες από τα στάδια του καθαρισμού της GST-ACAT2 φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% με επακόλουθη χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R – 250 (Εικ. 3.1)

2.1.3 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-Rab27a:GDP

Για την υπερέκφραση και τον καθαρισμό της GST-Rab27a:GDP διεξήχθη ακριβώς το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο με αυτό της GST-Rab5a:GDP που αναλύθηκε στην ενότητα 2.1.1. Να σημειωθεί ότι η GST-Rab27a:GDP δεν επωάστηκε με την πρωτεάση GST-PreScission, και εκλούστηκε από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με την προσθήκη διαλύματος έκλουσης με ανηγμένη γλουταθειόνη. Ακολούθησε διαπίδυση της καθαρής πρωτεΐνης έναντι διαλύματος που περιείχε: 50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 µM GDP. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, η συγκέντρωση της καθαρής GST-Rab27a:GDP εκτιμήθηκε με την χρήση της μεθόδου Bradford στα 11,5 µg/µl. Στο τέλος, ποσότητες από τα στάδια του καθαρισμού της

GST-Rab27a:GDP φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% με επακόλουθη χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R – 250 (Εικ. 3.4).

2.1.4 Υπερέκφραση και καθαρισμός της GST-PreScission

Για την υπερέκφραση και τον καθαρισμό της πρωτεΐσης GST-PreScission υλοποιήθηκε ακριβώς το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο με αυτό της GST-ACAT2 που αναλύθηκε στην ενότητα 2.1.2. Η μοναδική διαφορά ανάμεσα στα δύο πρωτόκολλα ήταν το γεγονός ότι για την υπερέκφραση της GST-ACAT2 χρησιμοποιήθηκαν 10 μ M IPTG, ενώ για το ένζυμο GST-PreScission χρησιμοποιήθηκαν 100 μ M IPTG. Επιπλέον, η διαπίδυση του καθαρού ενζύμου πραγματοποιήθηκε έναντι διαλύματος με την εξής σύσταση: 50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, η συγκέντρωση του ενζύμου εκτιμήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Bradford και βρέθηκε ίση με 16,83 μ g/ml ή 16,83 Units/ml. Στο τέλος, ποσότητες από τα στάδια του καθαρισμού της GST-PreScission φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS – PAGE 12% με επακόλουθη χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R – 250 (Εικ. 3.6).

2.1.5 Υπερέκφραση και καθαρισμός της 6xHis-GDI

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των βακτηρίων *E. coli* BL21DE3 με το πλασμίδιο pRSET His-GDI. Η αρχική συγκέντρωση του πλασμιδίου ήταν 100 ng/ml και η διαδικασία του μετασχηματισμού απαιτούσε 100 ng πλασμιδίου. Επομένως, 1 μ l πλασμιδίου προστέθηκε σε 250 μ l βακτηρίων *E. coli* BL21DE3, τα οποία επώασησαν για 20 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, ακολούθησε θερμικό σοκ των βακτηρίων στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα. Το θερμικό σοκ προκαλεί οπές στο κυτταρικό τοίχωμα και στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, με αποτέλεσμα την εισαγωγή του πλασμιδίου στο εσωτερικό τους. Έπειτα, τα βακτήρια αφέθηκαν στον πάγο για περίπου 5 λεπτά και, κατόπιν, προστέθηκαν 500 μ l φρέσκου θρεπτικού LB υπό φλόγα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση των βακτηρίων στους 37°C, υπό ανάδευση, για 1 ώρα. Μετά το πέρας της επώασης, περίπου το 1/10 της συνολικής ποσότητας των βακτηρίων επιστρώθηκε σε τρυβλίο Petri, στο οποίο είχαν προστεθεί δύο ειδών αντιβιοτικά αμέσως μετά την παρασκευή του: αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη, σε τελικές συγκεντρώσεις 100 μ g/ml και 30 μ g/ml, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν σε 6000 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου (RT: ~ 25°C) και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μ l

θρεπτικού. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη ποσότητα των βακτηρίων επιστρώθηκε και αυτή σε τρυβλίο Petri με αμικικιλίνη και χλωραμφενικόλη, με επακόλουθη επώασή τους σε θερμοκρασία 37°C, γυρισμένα ανάποδα. Την επόμενη μέρα επιλέχθηκε μια αποικία, η οποία αποτελούνταν από μετασχηματισμένους βακτηριακούς κλώνους *E. coli* BL21DE3 με το πλασμίδιο της 6x-His GDI, και αναπτύχθηκε, περαιτέρω, σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB συμπληρωμένο με 100 µg/ml αμικικιλίνη και 30 µg/ml χλωραμφενικόλη για 6 ώρες, στους 37°C, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, η προ-καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε 100 ml LB συμπληρωμένο με ίδιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και συνεχίστηκε για 16 ώρες, στους 37°C, υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα εμβολιάστηκαν 4L LB με ποσότητα της προ-καλλιέργειας των 100 ml (10 ml εμβολίου/Lt θρεπτικού μέσου) και προστέθηκαν τα δύο αντιβιοτικά, αμικικιλίνη και χλωραμφενικόλη, με τις ίδιες συγκεντρώσεις. Η καλλιέργεια συνεχίστηκε στους 30°C και η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης 6x-His GDI πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη IPTG, για 16 ώρες, υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα ακολούθησε φυγοκέντρηση των βακτηρίων σε 6000 rpm, στους 4°C, για 10 λεπτά και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε με 48 ml διαλύματος λύσης: 50 mM NaH₂PO₄, pH: 8.0, 500 mM NaCl, 5 µg/ml RNAase, 5 µg/ml DNAase, 10 mM ιμιδαζόλιο (imidazole) καθώς και αναστολείς πρωτεασών. Η διαδικασία συνεχίστηκε με την μηχανική λύση των βακτηρίων (French pressure, SIM – MINCO, 1000 PSI) και ακολούθησε φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος σε 18000 rpm, για μιάμιση ώρα, στους 4°C. Παράλληλα, 600 µl σφαιριδίων νικελίου (nickel beads ή Ni²⁺ beads) τοποθετήθηκαν επάνω στην στήλη και ακολούθησαν πλύσεις με συνολικά 10 ml διαλύματος PBS 1x. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, τα 600 µl σφαιριδίων νικελίου επώαστηκαν με το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης (το ίζημα απορρίφθηκε) για 2 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Η χημική πρωτεΐνη 6x-His GDI έχει την ιδιότητα να προσδένεται επάνω σε σφαιρίδια νικελίου εξαιτίας των έξι καταλοίπων ιστιδίνης (6x-His tag). Το νικέλιο (Ni) είναι ένα χημικό στοιχείο που ανήκει στα μέταλλα και έχει την ιδιότητα να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα, με αποτέλεσμα να ακινητοποιείται επάνω σε κατάλληλες επιφάνειες (π.χ. υπόστρωμα αγαρόζης). Στην παραπάνω διαδικασία στηρίζονται οι αρχές της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένων μετάλλων (Immobilized Metal Affinity Chromatography ή IMAC) όπου ένας ακινητοποιημένος προσδέτης (ligand) δημιουργεί δεσμούς με την ετικέτα πολυ-ιστιδίνης των μακρομορίων (His-tag) συντελώντας στην απομόνωση και στον καθαρισμό τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο προσδέτης είναι το

ακίνητοποιημένο νικέλιο επάνω σε υπόστρωμα αγαρόζης και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είναι η 6x-His GDI, η οποία προσδέεται με χημική συγγένεια στα σφαιρίδια νικελίου. Μετά την επώαση των σφαιριδίων ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 3000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C, το υπερκείμενο με τις αδέσμευτες πρωτεΐνες απορρίφθηκε και τα σφαιρίδια νικελίου επαναιωρήθηκαν και τοποθετήθηκαν επάνω στη στήλη. Ακολούθησαν 10 πλύσεις της στήλης με 5 ml κατάλληλου διαλύματος ανά πλύση (50 mM NaH₂PO₄, pH: 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο). Το ιμιδαζόλιο σε υψηλή συγκέντρωση (> 200 mM) δημιουργεί δεσμούς μεγάλης συγγένειας με τα σφαιρίδια νικελίου, με αποτέλεσμα να προσδέεται ισχυρά με επακόλουθη έκλυση των προσδεμένων μακρομορίων. Ωστόσο, οι χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (10 – 25 mM) αποτρέπουν τη δημιουργία μη ειδικών αλληλεπιδράσεων των καταλοίπων ιστιδίνης των ενδογενών πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια νικελίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε ειδική έκλυση της 6x-His GDI από τα σφαιρίδια νικελίου με την προσθήκη 2 – 3 ml διαλύματος έκλυσης με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (50 mM NaH₂PO₄, pH: 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο). Για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από το πρωτεϊνικό διάλυμα, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση έναντι 1 L διαλύματος με σύσταση: 50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl για 16 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Την επόμενη μέρα το διάλυμα της διαπίδυσης αντικαταστάθηκε με 500 ml διαλύματος ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίστηκε για ακόμη 6 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις του πρωτεϊνικού διαλύματος σε 14000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C και απορρίφθηκαν τυχόν σχηματισμένα ιζήματα. Το υπερκείμενο της υδατοδιαλυτής 6x-His GDI συλλέχθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου eppendorf. Η παραπάνω διαδικασία συνεχίστηκε έως ότου δεν εμφανίζονταν καθόλου πρωτεϊνικά συσσωματώματα υπό μορφή ιζήματος. Ύστερα, μια μικρή ποσότητα της 6x-His GDI αποθηκεύτηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής της με τη χρήση της μεθόδου Bradford. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος βρέθηκε ίση με 1,62 μg/μl. Ποσότητες από όλα τα στάδια του καθαρισμού της 6x-His GDI φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R – 250 (Εικ. 3.5). Η 6x-His GDI διαμοιράστηκε σε 18 ίσα μέρη (aliquots) με το καθένα να περιέχει 30 μl πρωτεΐνης. Τέλος, ακολούθησε πάγωμα σε υγρό άζωτο και αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C.

2.2 Συμπύκνωση πρωτεϊνών

Τα πειράματα της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) απαιτούσαν οι πρωτεΐνες να βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτή που επιτεύχθηκε κατά τον καθαρισμό τους. Η συμπύκνωση των δύο πρωτεϊνών, Rab5a:GDP και ACAT2, πραγματοποιήθηκε με υπερφιλτράρισμα (ultrafiltration) των πρωτεϊνικών διαλυμάτων με χρήση του συμπυκνωτή Amicon Ultra, 2mL, UFC200324, Merck Millipore, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, αρχικά, πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της μεμβράνης με την προσθήκη 1 ml απιονισμένου νερού (dH₂O) και φυγοκέντρηση του φιαλιδίου σε 4500 g, για 5 λεπτά, στους 4°C. Ύστερα, απορρίφθηκε η ποσότητα του νερού τόσο από το sample reservoir όσο και από το filtrate vial. Έπειτα, προστέθηκαν 2 ml του πρωτεϊνικού δείγματος στο sample reservoir, πραγματοποιήθηκε ισοζύγισμα των συσκευών και ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις του δείγματος σε 7000 g, στους 4°C μέχρι το επιθυμητό στάδιο συμπύκνωσης. Εάν είχε παραμείνει όγκος δείγματος, προστέθηκε μετά από λίγη ώρα στο sample reservoir και η διαδικασία της συμπύκνωσης συνεχίστηκε. Μετά την συμπύκνωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, το filtrate vial αποσυνδέθηκε από την βάση του sample reservoir, τοποθετήθηκε ένα φιαλίδιο ανάκτησης (retentate vial) επάνω από το sample reservoir και το σύστημα αναποδογυρίστηκε με σκοπό την ανάκτηση των πρωτεϊνών από την μεμβράνη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 1000 g, για 5 λεπτά, στους 4°C. Μετά την ανάκτηση των συμπυκνωμένων δειγμάτων, τα φιαλίδια αποσυνδέθηκαν και οι μεμβράνες αποθηκεύτηκαν σε υδατικό διάλυμα συμπληρωμένο με 0,1% NaN₃ σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, οι δύο πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου erpendorf και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 14000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C. Τυχόν κατακρημνισμένες πρωτεΐνες εξαιτίας της διαδικασίας της συμπύκνωσης παρουσιάστηκαν υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απορρίφθηκε και από τα δύο δείγματα. Οι υδατοδιαλυτές συμπυκνωμένες πρωτεΐνες, Rab5a:GDP και ACAT2, μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf, οι τελικές τους συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν με την χρωματομετρική μέθοδο Bradford και χρησιμοποιήθηκαν στα μετέπειτα πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης.

2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Οι συγκεντρώσεις όλων των πρωτεϊνών εκτιμήθηκαν ποσοτικά με τη χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου Bradford (Bio – Rad), σύμφωνα με τις οδηγίες του

κατασκευαστή. Στην μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκε η BSA ως πρωτεΐνη θετικού μάρτυρα για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Το γραμμικό εύρος της πρότυπης καμπύλης κυμαινόταν από 2 – 18 μg πρωτεΐνης.

2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS–PAGE 12%

Η τεχνική αυτή, η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα (Οδηγός για ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου και ανίχνευση της εταιρίας Bio-Rad). χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο της καθαρότητας όλων των απομονωμένων πρωτεϊνών καθώς και ως καθοδική μέθοδος ανάλυσης όλων των εκλουόμενων δειγμάτων από τις τεχνικές pull down, που έλαβαν χώρα στα πλαίσια της μελέτης πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5a:GDP και ACAT2 και Rab5a:GDP με 6x–His GDI. Για ανίχνευση ποσοτήτων μικρότερων από 100 ng, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (βλ. ενότητα 2.6) καθώς και χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου SDS – PAGE 12% με διάλυμα νιτρικού αργύρου (βλ. ενότητα 2.5).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε χρώση της πηκτής με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R – 250 σε διάλυμα που περιείχε: 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ και 40% απιονισμένο νερό (dH₂O), για 10 λεπτά, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν γρήγορες πλύσεις με κατάλληλο διάλυμα (destain buffer) σύστασης: 25% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής. Αρχικά, οι πλύσεις έγιναν με πυκνό destain buffer για περίπου 30 λεπτά με τακτικές αλλαγές του διαλύματος και, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα destain buffer αραιωμένη με dH₂O για ολονύχτια επώαση. Την επόμενη μέρα είχε ελαχιστοποιηθεί η μη ειδική χρώση της πηκτής και οι μπλε πρωτεϊνικές ζώνες ήταν πλέον διακριτές.

2.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με χρώση νιτρικού αργύρου (Silver stain)

Ανάμεσα στις μεθόδους ανίχνευσης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση, η χρώση με νιτρικό άργυρο προσφέρει την μεγαλύτερη ευαισθησία, διότι παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης πρωτεϊνών στην κλίμακα των νανογραμμαρίων (~ 1 ng). Στην παρούσα εργασία, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών GST–Rab5a:GDP και 6x–His GDI μετά την διεξαγωγή τεχνικής κατακρήμνισης (pull down) για την μελέτη της αλληλεπίδρασής τους (βλ. ενότητες 2.7, 3.2.5), εξαιτίας έλλειψης αντισώματος έναντι της GDI. Μετά την

ηλεκτροφόρηση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου SDS – PAGE 12%, ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R – 250 working solution για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η περίσσεια χρωστικής απομακρύνθηκε με τακτικές πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού (destain buffer) που περιείχε: 25% μεθανόλη και 7% οξικό οξύ. Τέλος, προστέθηκε ποσότητα διαλύματος αποχρωματισμού αραιωμένη σε dH₂O και η επώαση συνεχίστηκε ολονύχτια. Την επόμενη μέρα, απορρίφθηκε η παραπάνω ποσότητα και προστέθηκε εκ νέου. Εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν παρατηρήθηκαν ορατές ζώνες στο υπό μελέτη πρωτεϊνικό δείγμα, ακολούθησε το εργαστηριακό πρωτόκολλο χρώσης της πηκτής με διάλυμα νιτρικού αργύρου, με σκοπό να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν λεπτομερείς πλύσεις με dH₂O, ώστε να απομακρυνθεί τελείως η ποσότητα του διαλύματος αποχρωματισμού, καθώς το οξικό οξύ παρεμβάλλεται στη διαδικασία της επακόλουθης χρώσης αλληλεπιδρώντας με το διάλυμα νιτρικού αργύρου (βλ. παρακάτω). Οι παραπάνω πλύσεις πραγματοποιούνταν ανά 20 λεπτά και η διαδικασία διήρκησε συνολικά 2 ώρες. Κατόπιν, έγινε επώαση με διάλυμα που περιείχε 10 μl DTT 1M σε 309 ml dH₂O, για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία συνεχίστηκε με την προσθήκη διαλύματος που περιείχε 0,1% νιτρικό άργυρο, χωρίς τη μεσολάβηση ενδιάμεσων πλύσεων με dH₂O, και η επώαση διήρκησε 30 λεπτά, υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγιναν δύο γρήγορες πλύσεις με dH₂O, όπου στη δεύτερη πλύση δεν απορρίφθηκε ολόκληρη η ποσότητα του νερού. Παράλληλα, παρασκευάστηκαν 500 ml διαλύματος εμφάνισης (developing solution) με σύσταση: 250 μl φορμαλδεΰδης 37%, 15 gr ανθρακικού νατρίου (NaCO₃) διαλυμένα σε dH₂O. Να σημειωθεί ότι η ποσότητα της φορμαλδεΰδης συμπληρώθηκε ακριβώς πριν την προσθήκη του διαλύματος εμφάνισης στην πηκτή. Σε πρώτη φάση προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματος εμφάνισης και απορρίφθηκε αμέσως. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία άλλες δυο φορές με αυξανόμενη χρονική διάρκεια επώασης (10'' και 20'' αντίστοιχα). Τέλος, προστέθηκε μεγαλύτερη ποσότητα διαλύματος εμφάνισης και η επώαση συνεχίστηκε έως ότου βελτιστοποιηθεί το σήμα. Ωστόσο, τη χρονική στιγμή που εμφανίστηκαν οι πρωτεϊνικές ζώνες, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:1 του διαλύματος εμφάνισης με dH₂O, για να περιοριστεί η διασπορά της χρωστικής καθώς και να μειωθεί η μη ειδική χρώση (background). Μόλις ολοκληρώθηκε η χρώση με το επιθυμητό σήμα, απορρίφθηκε το διάλυμα εμφάνισης και προστέθηκε dH₂O. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από προσθήκη πυκνού διαλύματος κιτρικού οξέος 2,3 M ή

διαλύματος αποχρωματισμού. Η πηκτή αποθηκεύτηκε σε dH₂O σε σκοτεινό σημείο για 2 – 3 εβδομάδες.

2.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Η τεχνική της μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα (Οδηγός για ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου και ανίχνευση της εταιρίας Bio-Rad).

Για την ανίχνευση της ACAT2 χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ACAT2, το οποίο αναπτύχθηκε σε κουνέλια (πτυχιακή εργασία μεταπτυχιακής εξειδίκευσης Αθανάσιου Ζιώγα), σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS, Tween 0,1% + 2% ζελατίνη, για 1 ώρα, υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 4 πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα PBS Tween 0,1% και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς αντισώματος (2nd antibody anti – rabbit HRP) σε αραιώση 1:5000. Ακολούθησαν 4 πλύσεις της μεμβράνης, επώαση με αντιδραστήριο ECL (Roche) και εμφάνιση του σήματος της μεμβράνης επάνω σε φωτογραφικό φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο.

2.7 Τεχνικές pull down (pull down assays)

Η τεχνική pull down χρησιμοποιήθηκε σε κύριο βαθμό για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Rab5a:GDP και της ACAT2. Ωστόσο, τα εργαστηριακά πρωτόκολλα παρουσίασαν διαφοροποιήσεις μεταξύ τους ανάλογα με το είδος της εκάστοτε αλληλεπίδρασης. Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της ανενεργής μορφής της Rab5a (Rab5a:GDP) και της κυτταροπλασματικής ACAT2 *in vitro*, η πρώτη βρισκόταν στη χιμαιρική GST–μορφή της (GST–Rab5a:GDP) ενώ στη δεύτερη (ACAT2) είχε αφαιρεθεί το πρόσδεμα GST. Μετά την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν δύο διαδικασίες ειδικής έκλυσης:

- I. Ειδική έκλυση με διάλυμα που περιείχε EDTA (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ ή Ethylenediaminetetraacetic acid).
- II. Ειδική έκλυση με διάλυμα που περιείχε ανηγμένη γλουταθειόνη.

Η πρώτη έκλυση συνέβαλλε στη δημιουργία χηλικού συμπλόκου μεταξύ των μορίων EDTA και των ιόντων μαγνησίου (Mg²⁺), με αποτέλεσμα την αποδέσμευση του μαγνησίου από τα μόρια της Rab5a, την επακόλουθη αποσταθεροποίηση του νουκλεοτιδίου (GDP) στην περιοχή πρόσδεσης του επάνω στην Rab5a και, τέλος, την

αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της Rab5a και την αποδέσμευση της προσδεμένης ACAT2. Η εκλούμενη ποσότητα της προσδεμένης ACAT2 αναλύθηκε, περαιτέρω, είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% με συνεπακόλουθη ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της ACAT2 ή με άμεσο προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης της εκλούμενης ACAT2 με τη χρήση της μεθόδου Bradford. Επιπρόσθετα, η δεύτερη έκλυση με τη χρήση διαλύματος γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε, εν συνεχεία, στα ίδια σφαιρίδια γλουταθειόνης με τα προσδεμένα μόρια GST-Rab5a:GDP, στα οποία είχε γίνει η πρώτη έκλυση με διάλυμα που περιείχε EDTA. Η περαιτέρω ανάλυση των εκλούμενων δειγμάτων με διάλυμα γλουταθειόνης ήταν παρόμοια με εκείνων των εκλούμενων δειγμάτων με EDTA. Ωστόσο, η δεύτερη έκλυση αποσκοπούσε στη διερεύνηση τόσο τυχόν ποσοτήτων της ACAT2 που μπορεί να αλληλεπιδρούσαν μη ειδικά με τα μόρια της GST-Rab5a:GDP, όσο και στην επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της πρώτης έκλυσης.

Για να ελεγχθεί η δόσοεξαρτώμενη σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ GST-Rab5a:GDP και ACAT2 διεξήχθη το παρακάτω πρωτόκολλο. Προστέθηκαν 200 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης σε σωληνάριο τύπου erpendorf και πραγματοποιήθηκε μία πλύση με 1 ml διαλύματος PBS 1x. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των σφαιριδίων σε 12000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4 °C με επακόλουθη απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέχεια, έγινε επώαση των σφαιριδίων με 500 μl blocking buffer (50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 10 mg/ml BSA) για 1 ώρα, στους 4 °C, υπό ανάδευση. Η BSA προστέθηκε με σκοπό να καλύψει τις μη ειδικές θέσεις επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης για την μείωση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Ύστερα, μεταφέρθηκαν 30 μl σφαιριδίων σε κάθε σωληνάριο τύπου erpendorf (σύνολο 6) και αποθηκεύτηκαν στον πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Παράλληλα, σε διαφορετικά σωληνάρια τύπου erpendorf προστέθηκαν οι δύο πρωτεΐνες, GST-Rab5a:GDP και ACAT2, για να αλληλεπιδράσουν. Πιο αναλυτικά, 10 μg της ACAT2 αλληλεπιδράσαν με αυξανόμενες ποσότητες της GST-Rab5a:GDP (12, 30, 90, 270 μg):

- **Eppendorf 1:** 12 μg GST-Rab5a:GDP + 10 μg ACAT2 (Ισομοριακές ποσότητες)
- **Eppendorf 2:** 30 μg GST-Rab5a:GDP + 10 μg ACAT2

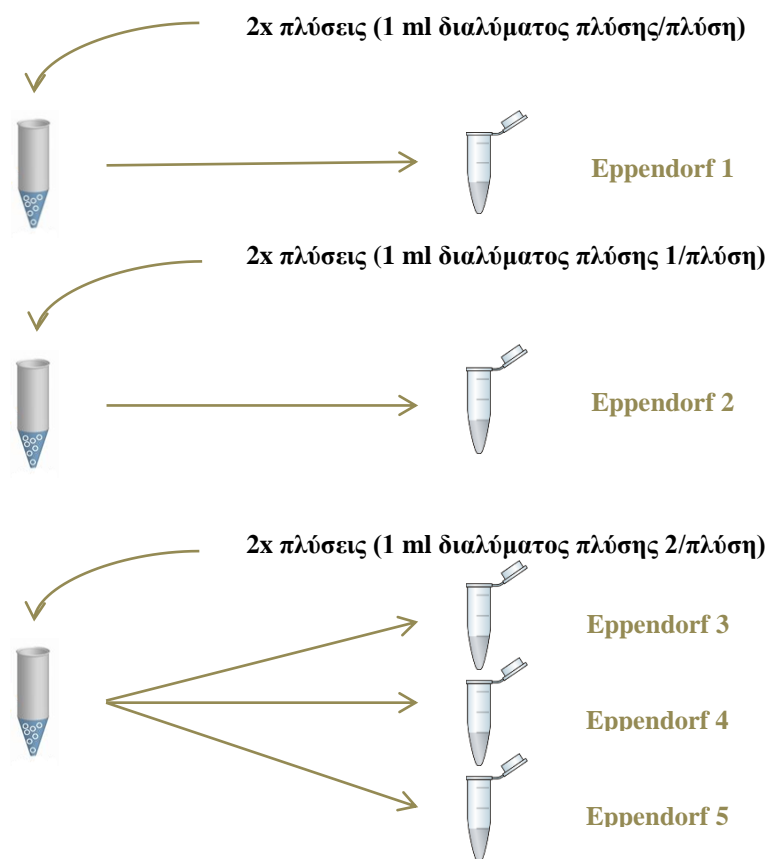
- **Eppendorf 3:** 90 μg GST–Rab5a:GDP + 10 μg ACAT2
- **Eppendorf 4:** 270 μg GST–Rab5a:GDP + 10 μg ACAT2
- **Eppendorf 5:** 270 μg GST–Rab27a:GDP + 10 μg ACAT2 (Αρνητικός μάρτυρας 1)
- **Eppendorf 6:** Κενά σφαιρίδια γλουταθειόνης + 10 μg ACAT2 (Αρνητικός μάρτυρας 2)

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις εξής συνθήκες διαλύματος: 50 mM Tris–HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 μM GDP. Η επώαση των 6 σωληναρίων τύπου eppendorf πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C με σκοπό τη δημιουργία του συμπλόκου GST–Rab5a:GDP/ACAT2. Μετά το τέλος της επώασης, οι ποσότητες από τα 6 σωληνάρια προστέθηκαν στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, αφού προηγουμένως είχε αφαιρεθεί η ποσότητα του blocking buffer από τα σφαιρίδια. Η επώαση των πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης έγινε για 1 ώρα, υπό ανάδευση, στους 4°C. Η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα, καθώς είναι γνωστό πως δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν αποτελεσματικότερα στο χώρο μέσα σε ένα διάλυμα όταν δεν παρεμποδίζονται χωροταξικά, ένα πρόβλημα που πιθανότατα ενισχύεται με την παρουσία των σφαιριδίων γλουταθειόνης. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησαν 6 πλύσεις των σφαιριδίων γλουταθειόνης με κατάλληλο διάλυμα πλύσης (50 mM Tris–HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 μM GDP), ενώ το υπερκείμενο με τις αδέσμευτες πρωτεΐνες (Unbound material) αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση (δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα). Οι πλύσεις υλοποιήθηκαν με φυγοκέντρηση σε 14000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C, απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη εκ νέου 1 ml διαλύματος πλύσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια πλύση των σφαιριδίων με 500 μl διαλύματος: 50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C και απόρριψη του υπερκειμένου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αποδέσμευση του συμπλόκου GST–Rab5a:GDP/ACAT2 μέσω ειδικής έκλουσης της ACAT2 με τη χρήση διαλύματος έκλουσης (50 mM Tris–HCl, pH:7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM EDTA). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά, με ανάδευση κάθε 30''. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 14000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C, το υπερκείμενο με την εκλουόμενη ποσότητα της ACAT2 συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Στη συνέχεια,

πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις των σφαιριδίων με 500 μ l διαλύματος έκλουσης ανά πλύση, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν ανεπιθύμητων πρωτεϊνών (π.χ. ποσότητα BSA, μη προσδεμένη ποσότητα ACAT2, ποσότητα GST-Rab5a ύστερα από πιθανή «διαρροή» από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης). Ακολούθησε προσθήκη 30 μ l διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (50 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 15 mM ανηγμένη γλουταθειόνη, 100 μ M GDP) στα σφαιρίδια κάθε δείγματος. Οι διαδικασίες της έκλουσης με διάλυμα γλουταθειόνης και αποθήκευσης του υπερκειμένου πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τέλος, ποσότητες από τα δύο είδη δειγμάτων φορτώθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% μαζί με γνωστές ποσότητες καθαρής ACAT2 (1, 10, 100 ng καθαρής ACAT2), οι οποίες προέκυψαν ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις παρουσία διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Από τα δείγματα με την εκλουόμενη ποσότητα της ACAT2 φορτώθηκε 0,5 μ l πρωτεϊνικού δείγματος (2,5 μ l από αραιωμένο δείγμα 1/5) σε συνολικό όγκο 10 μ l. Ωστόσο, από τα δείγματα με την εκλουόμενη GST-Rab5a:GDP με διάλυμα γλουταθειόνης φορτώθηκαν 5 μ l από το καθένα σε συνολικό όγκο 20 μ l. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δύο πηκτωμάτων, όπως αναλύθηκε στην ενότητα 2.4, με επακόλουθη ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικό αντίσωμα έναντι της ACAT2 (βλ. ενότητα 2.6, Εικ. 3.7, Εικ. 3.8). Ύστερα, στα ήδη υπάρχοντα σφαιρίδια γλουταθειόνης προστέθηκαν 30 μ l διαλύματος φόρτωσης (που περιείχε SDS), για να πραγματοποιηθεί έκλουση όλων των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούσαν μη ειδικά με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Κατά κύρια βάση, η φύση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων θεωρείται υδρόφοβη. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 100°C, για 10 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 12000 rpm, για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο (~ 30 μ l) και μέρος αυτού (10 μ l) φορτώθηκε σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκε, περαιτέρω, με ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικό αντίσωμα έναντι της ACAT2 (Εικ. 3.9).

Μία διαφοροποιημένη έκδοση του βασικού εργαστηριακού πρωτοκόλλου της τεχνικής κατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί αν η αλληλεπίδραση της ACAT2 με την Rab5 οφείλεται σε μια πιθανή σύνδεση της ACAT2 με το νουκλεοτίδιο GDP και όχι με την πρωτεΐνη. Αρχικά, υλοποιήθηκε πρόσδεση 500 μ g της GST-Rab27a:GDP επάνω σε 50 μ l σφαιριδίων γλουταθειόνης (για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως αρνητικός μάρτυρας). Πριν την πρόσδεση της

πρωτεΐνης στα σφαιρίδια, πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις των σφαιριδίων με διάλυμα PBS 1x, για να απομακρυνθεί η ποσότητα της αιθανόλης και, ύστερα, ακολούθησαν δύο πλύσεις με 200 μl κατάλληλου διαλύματος πλύσης (50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM GDP). Το παραπάνω διάλυμα ονομάστηκε αυθαίρετα διάλυμα πλύσης 2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των σφαιριδίων σε 14000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και, στη συνέχεια, προστέθηκαν 43,5 μl GST–Rab27a:GDP (11,5 μg/μl) σε 50 μl σφαιριδίων. Η επώαση έγινε για 2 ώρες, στους 4°C, υπό περιστροφική ανάδευση. Ακολούθησαν 5 πλύσεις των σφαιριδίων με 1 ml διαλύματος πλύσης 1 ανά πλύση (50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 μM GDP) με σκοπό την απομάκρυνση της αδέσμευτης ποσότητας της GST–Rab27a:GDP. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 50 μl διαλύματος πλύσης 2. Τέλος, μεταφέρθηκαν 20 μl σφαιριδίων σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf, έστω erpendorf 5. Παράλληλα, υπήρχαν αποθηκευμένα στους 4°C σφαιρίδια γλουταθειόνης με προσδεμένη GST–Rab5a:GDP (βλέπε πιο πάνω πρωτόκολλο καθαρισμού της GST-Rab5a). Πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με διαλύματα πλύσης διαφορετικής σύστασης (βλέπε πιο κάτω), όπου μετά το τέλος της καθεμίας μεταφερόταν ποσότητα 20 μl σφαιριδίων σε σωληνάριο τύπου erpendorf (συνολικά 4). Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα παρουσιάζεται συνοπτικά η παραπάνω διαδικασία:



Τα διαλύματα πλύσης περιείχαν διαφορετικές, αυξανόμενες συγκεντρώσεις νουκλεοτιδίου GDP, με αποτέλεσμα τα 4 σωληνάκια τύπου eppendorf να περιέχουν ίση ποσότητα GST-Rab5a:GDP, αλλά σε διαφορετική συγκέντρωση ελεύθερου νουκλεοτιδίου GDP:

- **Διάλυμα πλύσης:** 50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂
- **Διάλυμα πλύσης 1:** 50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 μM GDP
- **Διάλυμα πλύσης 2:** 50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM GDP
- **Eppendorf 1:** Ποσότητα GST – Rab5a:GDP σε διάλυμα χωρίς νουκλεοτίδιο GDP
- **Eppendorf 2:** Ποσότητα GST – Rab5a:GDP σε διάλυμα με 100 μM GDP
- **Eppendorf 3:** Ποσότητα GST – Rab5a:GDP σε διάλυμα με 1 mM GDP

- **Eppendorf 4:** Ποσότητα GST – Rab5a:GDP σε διάλυμα με 1 mM GDP (Θετικός μάρτυρας)
- **Eppendorf 5:** Ποσότητα GST – Rab27a:GDP σε διάλυμα με 1 mM GDP (Αρνητικός μάρτυρας)

Στη συνέχεια, τα 5 σωληνάρια με την GST–Rab5a:GDP τοποθετήθηκαν στον πάγο. Προηγουμένως, είχε εκτιμηθεί η συγκέντρωση της GST–Rab5a:GDP επάνω στα σφαιρίδια με τη χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου Bradford (14,5 μg/μl ⇔ 290 μg GST–Rab5a:GDP προσδεμένα σε 20 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση της ACAT2 σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο που αναλύθηκε στην ενότητα 2.2. Ο τελικός όγκος της συμπυκνωμένης ACAT2 ήταν 60 μl με τελική πρωτεϊνική συγκέντρωση ίση με 3,98 μg/μl. Από αυτό προστέθηκαν 12 μl συμπυκνωμένης ACAT2 (~48 μg) σε 20 μl συνολικού όγκου επώασης σε νέα σωληνάρια τύπου erppendorf (1–3). Ακολούθησε προ–επώαση της ACAT2 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GDP (0–100–1000 μM) στα σωληνάρια 1–3, αντίστοιχα. Τα σωληνάρια 4+5 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα, όπου η ACAT2 δεν προ–επώαστηκε με GDP. Η προ–επώαση πραγματοποιήθηκε για 30', στον πάγο, χωρίς συνεχή ανάδευση. Μετά το πέρας της προ–επώασης, τα 20 μl της αντίδρασης προστέθηκαν στα αντίστοιχα σωληνάρια (erppendorfs 1–3) με την προσδεμένη ποσότητα της GST–Rab5a:GDP επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Επιπλέον, προετοιμάστηκαν και τα δύο δείγματα των μαρτύρων (erppendorfs 4–5) σε συνολικό όγκο 20 μl και προστέθηκαν απευθείας στα αντίστοιχα σωληνάρια. Ακολούθησε ταυτόχρονη επώαση των 5 δειγμάτων για 2 ώρες, στους 4°C, υπό ανάδευση. Από το σημείο αυτό, η διαδικασία ήταν ακριβώς η ίδια με το βασικό εργαστηριακό πρωτόκολλο της τεχνικής pull down (βλ. παραπάνω). Τέλος, η συγκέντρωση της εκλούμενης ACAT2 κάθε δείγματος υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford και εκτιμήθηκε το ποσοστό της προσδεμένης ACAT2 επάνω στην GST–Rab5a:GDP σε κάθε περίπτωση (Εικ. 3.10B). Επιπρόσθετα, ποσότητα της εκλούμενης ACAT2 (1 μl αραιωμένων δειγμάτων 1/10) φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS–PAGE 12% και αναλύθηκε, περαιτέρω, με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της ACAT2 (Εικ. 3.10A).

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της GST–Rab5a:GDP και της 6xHis–GDI πραγματοποιήθηκε η τεχνική pull down με παρόμοιο τρόπο, όπως αναλύθηκε παραπάνω. Συνοπτικά, 2 mg της GST–Rab5a:GDP προσδέθηκαν σε 200

μl σφαιριδίων γλουταθειόνης σε κατάλληλο διάλυμα σύστασης: 50 mM Tris – HCl, pH:7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 μM GDP. Η επώαση της GST–Rab5a:GDP με τα σφαιρίδια διήρκησε 2 ώρες, στους 4 °C, υπό περιστροφική ανάδευση. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 30 μl σφαιριδίων σε νέο σωληνάριο τύπου erppendorf και προστέθηκαν 300 μg 6xHis–GDI (1,62 μg/μl) και πραγματοποιήθηκε επώαση για 2 ώρες, στους 4 °C, υπό περιστροφική ανάδευση. Κατόπιν, ακολούθησε ακριβώς το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο όπως και με τις προηγούμενες επαναλήψεις της μεθόδου. Να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της επώασης δεν προστέθηκε καθόλου ποσότητα BSA για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων αλληλεπίδρασης, διότι έχει παρόμοιο μοριακό βάρος με την 6xHis–GDI (62 kDa), γεγονός που μπορεί να δυσκόλευε τον διαχωρισμό τους με SDS-PAGE. Επιπλέον, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα με «κενά» σφαιρίδια γλουταθειόνης, τα οποία επώαστηκαν με ίδια ποσότητα 6xHis–GDI (300 μg) κάτω από τις ίδιες συνθήκες (50 mM Tris – HCl, pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 100 μM GDP). Ακολούθησε συλλογή των εκλούμενων πρωτεϊνικών δειγμάτων, τα οποία, στη συνέχεια, φορτώθηκαν πλήρως (20 μl) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS – PAGE 12% μαζί με διαφορετικές ποσότητες καθαρών πρωτεϊνών GST–Rab5a:GDP και 6xHis–GDI (ως μάρτυρες θέσης των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση). Λόγω έλλειψης αντισώματος έναντι της GDI, πραγματοποιήθηκε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο, μία μέθοδος που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα (βλ. ενότητα 2.5), με σκοπό την ανίχνευση της 6xHis–GDI που αλληλεπιδρούσε με την GST–Rab5a:GDP (Εικ. 3.11).

2.8 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry)

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry ή αλλιώς σε συντομογραφία ITC) είναι μία ποσοτική μέθοδος μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (protein–protein interactions). Πιο συγκεκριμένα, όταν δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν εμφανίζονται αλλαγές στις θερμοδυναμικές παραμέτρους του συστήματος (ΔG , ΔH , ΔS), οι οποίες μπορούν να μετρηθούν άμεσα με την μέθοδο ITC. Οι παραπάνω θερμοδυναμικές παράμετροι χαρακτηρίζονται από την στοιχειομετρία της αντίδρασης (n), την σταθερά σχηματισμού του (πρωτεϊνικού) συμπλόκου (K_a), την ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG_b), την ενθαλπία (ΔH_b), την εντροπία (ΔS_b) και την θερμοχωρητικότητα (ΔC_p) της αλληλεπίδρασης. Σε συνδυασμό με πληροφορίες δομής, η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης

μπορεί να παρέχει πλήρη απεικόνιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων συνεισφέροντας, επιπλέον, στην ταυτοποίηση των πλέον σημαντικών πρωτεϊνικών περιοχών που αλληλεπιδρούν (Pierce M. M. *et.al*, 1999). Να σημειωθεί ότι οι θερμοδυναμικές παράμετροι μιας αντίδρασης συνδέονται με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Οι παραπάνω θερμοδυναμικές παράμετροι καθορίζουν τη φύση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Αναλυτικότερα, στην πλειοψηφία των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων η διαδικασία πραγματοποιείται αυθόρμητα χωρίς την προσθήκη ενέργειας, καθώς στο εσωτερικό των κυττάρων οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μόνο όταν δύο μόρια έρθουν πολύ κοντά μεταξύ τους στον χώρο. Γι' αυτό το λόγο οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας (ΔG_b) και της ενθαλπίας (ΔH_b) είναι αρνητικές στην πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων ($\Delta G_b, \Delta H_b < 0$), γεγονός που ερμηνεύεται ως εξώθερμες και αυθόρμητες αντιδράσεις. Η ενθαλπία πρόσδεσης (ΔH_b) αντικατοπτρίζει την ισχύ των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (π.χ. δεσμοί Van der Waals, υδρογόνου κ.α.) σε συσχέτιση με αυτών του διαλύτη (dH_2O). Από την άλλη, οι αλλαγές στην εντροπία συνεισφέρουν ως εξής:

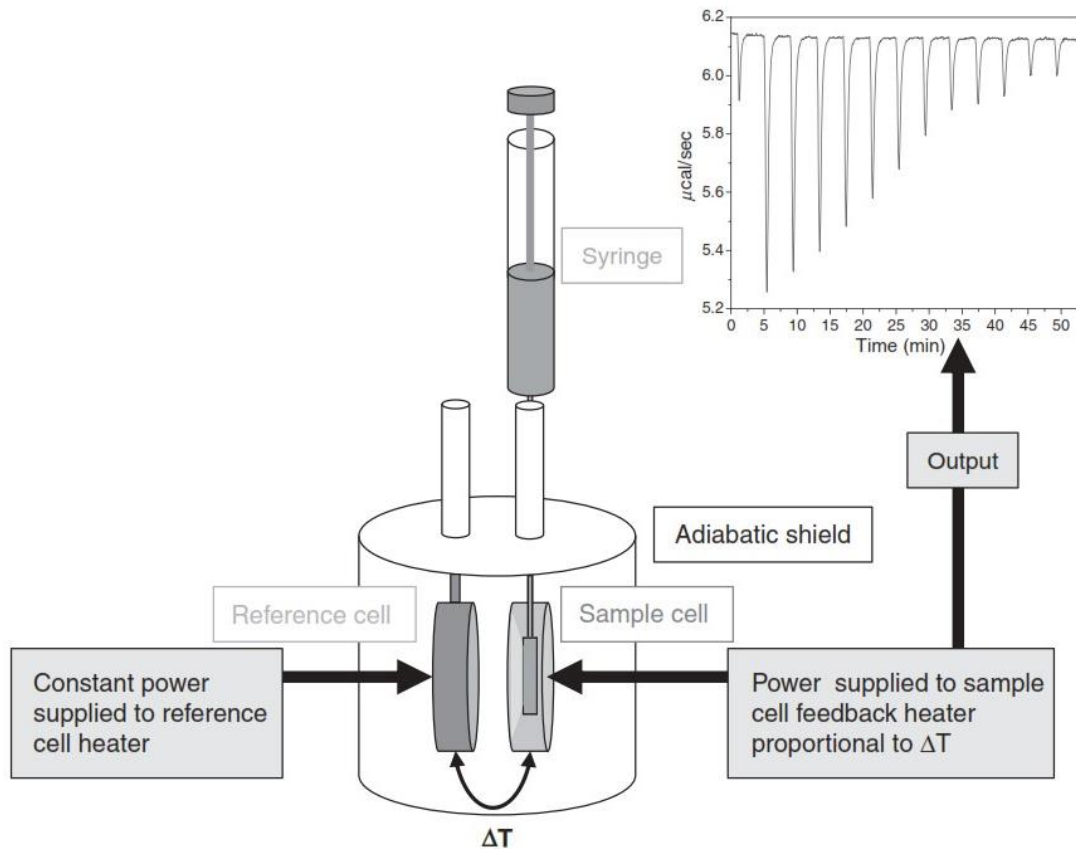
- Αλλαγές στην εντροπία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του διαλύτη (dH_2O) και των διαλυμένων ουσιών (πρωτεΐνες)
- Αλλαγές στην εντροπία της στερεοδιαμόρφωσης

Κατά την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα αντικατάσταση των μορίων του διαλύτη, που περικλείουν τη μία πρωτεΐνη, από τα μόρια της δεύτερης πρωτεΐνης (desolvation). Με λίγα λόγια, τα μόρια του διαλύτη, που βρίσκονται ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες, απομακρύνονται με σκοπό να υλοποιηθεί η αλληλεπίδραση. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της εντροπίας, γεγονός που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τις υδρόφοβες ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων προς σχηματισμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στις αλληλεπιδρώσεις πρωτεϊνικές περιοχές. Ταυτόχρονα, το αντίθετο φαινόμενο παρατηρείται στις αλλαγές της εντροπίας στερεοδιαμόρφωσης. Αυτό συμβαίνει, επειδή κατά την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η ελευθερία στερεοδιαμόρφωσης του συμπλόκου, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η κινητικότητά του στον χώρο, γεγονός που μειώνει την συγκεκριμένη μορφή

εντροπίας. Η συνδυαστική επίδραση των δύο παραπάνω μεγεθών αντικατοπτρίζει την συνολική αλλαγή της εντροπίας του συστήματος. Τέλος, η ισχύς της αλληλεπίδρασης μπορεί να εκτιμηθεί από τις τιμές των σταθερών σχηματισμού (K_a) και αποδιάταξης του συμπλόκου (K_d). Η σχέση που συνδέει τις δύο σταθερές είναι η εξής: $K_d = 1/K_a$. Η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές σταθεράς αποδιάταξης (K_d), σε τάξη μεγέθους nM, και υψηλές τιμές σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου (K_a), σε τάξη μεγέθους μ M. Επειδή πρόκειται για δύο αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη, το αντίθετο συμβαίνει στις ασθενείς αλληλεπιδράσεις (Leavitt S. & Freire E., 2001; Velazquez – Campoy A. *et.al*, 2004).

Συνοπτικά, η βασική αρχή της τεχνικής της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης περιγράφεται παρακάτω (Εικ. 2.1). Στο εσωτερικό ενός μηχανήματος υπάρχουν δύο διακριτοί θάλαμοι, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα αδιαβατικό κέλυφος, για να μην προκαλείται ανταλλαγή θερμότητας με το εξωτερικό περιβάλλον. Ο ένας ονομάζεται θάλαμος αναφοράς (reference cell), ο οποίος περιέχει μόνο τον διαλύτη των πρωτεϊνών ως σημείο αναφοράς (κυρίως dH₂O), και ο δεύτερος ονομάζεται θάλαμος των δειγμάτων (sample cell), στον οποίο διεξάγεται το κύριο πείραμα της θερμιδομετρίας. Οι θερμιδομετρικές μετρήσεις ελέγχονται κάτω από σταθερή τιμή θερμοκρασίας, εξ' ου και ο όρος «ισοθερμική». Αρχικά, παρέχεται σταθερή ισχύς στον θάλαμο αναφοράς. Ταυτόχρονα, οι αισθητήρες θερμοκρασίας του άλλου θαλάμου ενεργοποιούνται και παρέχεται τόση ενέργεια στον θάλαμο των δειγμάτων όση απαιτείται, για να υπάρχει η ίδια ακριβώς θερμοκρασία μεταξύ των δύο θαλάμων ($\Delta T = 0 \Leftrightarrow T_{\text{θαλάμου αναφοράς}} = T_{\text{θαλάμου δειγμάτων}}$). Επιπλέον, το μηχανήμα διαθέτει μία σύριγγα στην οποία προστίθεται η μία εκ των δύο πρωτεϊνών, ενώ η δεύτερη πρωτεΐνη τοποθετείται στον θάλαμο των δειγμάτων. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που βρίσκεται στην σύριγγα απαιτείται να είναι 10 φορές τουλάχιστον πυκνότερη από εκείνη που τοποθετείται στον θάλαμο των δειγμάτων, με σκοπό να επιτευχθεί, τελικά, κορεσμός στην αλληλεπίδραση και να υπολογιστούν οι θερμοδυναμικές παράμετροι. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, η σύριγγα τοποθετείται στο εσωτερικό του θαλάμου των δειγμάτων και πραγματοποιεί τιτλοδότηση, παράλληλα, υπό συνεχή ανάδευση για ομοιόμορφη κατανομή των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Κατά τη διάρκεια των εξώθερμων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, απειροελάχιστα ποσά ενέργειας υπό μορφή θερμότητας απελευθερώνονται στον θάλαμο των δειγμάτων αυξάνοντας την θερμοκρασία του

περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, οι διαφορές της θερμοκρασίας γίνονται αισθητές στον θάλαμο δειγμάτων και η ισχύς που του παρέχεται μειώνεται, έτσι ώστε να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία μεταξύ των δύο θαλάμων. Το παραπάνω σύστημα βρίσκεται συνεχώς κάτω από τον έλεγχο πολλαπλών κυκλωμάτων και αισθητήρων, με σκοπό την συνεχή εξισορρόπηση της θερμοκρασίας μεταξύ των δύο θαλάμων. Η παραπάνω μείωση της ισχύος στον θάλαμο των δειγμάτων στον άξονα του χρόνου θεωρείται το μετρήσιμο σήμα των πειραμάτων θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης ($\mu\text{cal}/\text{sec}$ ή $\mu\text{J}/\text{sec}$). Αντίθετα φαινόμενα παρατηρούνται στις ενδόθερμες χημικές αντιδράσεις. Μετά το πέρας της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών στον θάλαμο (λίγα δευτερόλεπτα μετά την τιτλοδότηση), το σύστημα επανέρχεται σε κατάσταση ισορροπίας μέχρι την επόμενη τιτλοδότηση. Να επισημανθεί ότι στην κατάσταση ισορροπίας η διαφορά της θερμοκρασίας των δύο θαλάμων είναι $\Delta T=0$. Όσο βρίσκονται αρκετά ελεύθερα μόρια πρωτεϊνών να αλληλεπιδράσουν, τόσο παράγεται μετρήσιμο σήμα. Παρόλα αυτά, η μείωση των διαθέσιμων πρωτεϊνικών μορίων με την πάροδο του χρόνου οδηγεί σε μείωση του μετρήσιμου σήματος, έως ότου επέλθει κορεσμός προς το τέλος των τιτλοδοτήσεων, χρονικά. Μετά το πέρας του πειράματος, οι ακατέργαστες μετρήσεις (raw data) υπόκεινται σε επεξεργασία με τη βοήθεια ενός προγράμματος (Origin) και εξάγονται τα τελικά συμπεράσματα της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (φυσικοχημικές και θερμοδυναμικές παράμετροι, στοιχειομετρία αντίδρασης, σταθερά σχηματισμού και αποδιάταξης συμπλόκου) (Freyer M. W. & Lewis E. A., 2008).



Εικ. 2.1: Βασική αρχή λειτουργίας της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης. Τα κύρια χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται είναι: οι δύο θάλαμοι αναφοράς (*reference cell*) και δείγματος (*sample cell*), η σύριγγα του τιτλοδότη καθώς και το αδιαβατικό κάλυμμα που περικλείει τους δύο θαλάμους. Εδώ παρουσιάζεται μία απλουστευμένη εκδοχή της λειτουργίας της τεχνικής, σχετικά με το πώς διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία ($\Delta T = 0$) μεταξύ των δύο θαλάμων και το γεγονός ότι οι διαφορές στην παρεχόμενη ισχύ στον θάλαμο των δειγμάτων μετατρέπονται στο μετρήσιμο σήμα των πειραμάτων θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης. *Freyer M. W. & Lewis E. A., Methods in Cell Biology, 2008.*

Η τεχνική της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης εφαρμόστηκε για την μελέτη και προσδιορισμό των φυσικοχημικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5a:GDP και ACAT2. Αρχικά, υπερεκφράστηκαν, καθαρίστηκαν και απομονώθηκαν οι δύο πρωτεΐνες, Rab5a:GDP και ACAT2, χωρίς την GST πρωτεΐνη σύμφωνα με τα εργαστηριακά πρωτόκολλα που περιγράφηκαν παραπάνω (βλ. ενότητες 2.1.1, 2.1.2). Στη συνέχεια, οι δύο πρωτεΐνες υπέστησαν διαπίδυση έναντι 600 ml κοινού διαλύματος σύστασης: 20 mM HEPES, pH: 7.5, 130 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 100 μM GDP. Η διαπίδυση

των δύο πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε για 16 ώρες, στους 4°C, υπό μαγνητική ανάδευση. Την επόμενη μέρα έγινε μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με 1 L διάλυμα ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίστηκε για ακόμη 6 ώρες. Μετά το πέρας της διαδικασίας οι δύο πρωτεΐνες συλλέχθηκαν σε νέο σωληνάριο τύπου erppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε 14000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέχθηκε, ενώ τυχόν ίζημα κατακρημνισμένων πρωτεϊνών απορρίφθηκε. Κατόπιν, υπολογίστηκαν με ακρίβεια οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις με την χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου Bradford ($C_{\text{Rab5a:GDP}} = 6,6 \mu\text{g}/\mu\text{l} \Leftrightarrow 264 \mu\text{M}$, $C_{\text{ACAT2}} = 2,57 \mu\text{g}/\mu\text{l} \Leftrightarrow 64,2 \mu\text{M}$). Κατά τη διάρκεια του πειράματος της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης, η ποσότητα της Rab5a:GDP τοποθετήθηκε στη σύριγγα (264 μM), ενώ η ACAT2 πριν τοποθετηθεί στον θάλαμο των δειγμάτων αραιώθηκε σε 26,4 μM (Εικ. 3.12). Να σημειωθεί πως ο όγκος κάθε τιτλοδότησης ήταν 2 μl . Επιπρόσθετα, σε επόμενο πείραμα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης τοποθετήθηκε στον θάλαμο των δειγμάτων μόνο ο διαλύτης των δύο πρωτεϊνών (20 mM HEPES, pH: 7.5, 130 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 3 mM GDP), ενώ η GST-Rab5a:GDP τοποθετήθηκε στη σύριγγα (960 μM). Η παραπάνω δοκιμασία υλοποιήθηκε με σκοπό να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (Εικ. 3.13). Να σημειωθεί ότι η τεχνική της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης δεν έχει βελτιστοποιηθεί ακόμη στο εργαστήριο για το σύστημα αλληλεπίδρασης της Rab5a:GDP και της ACAT2.

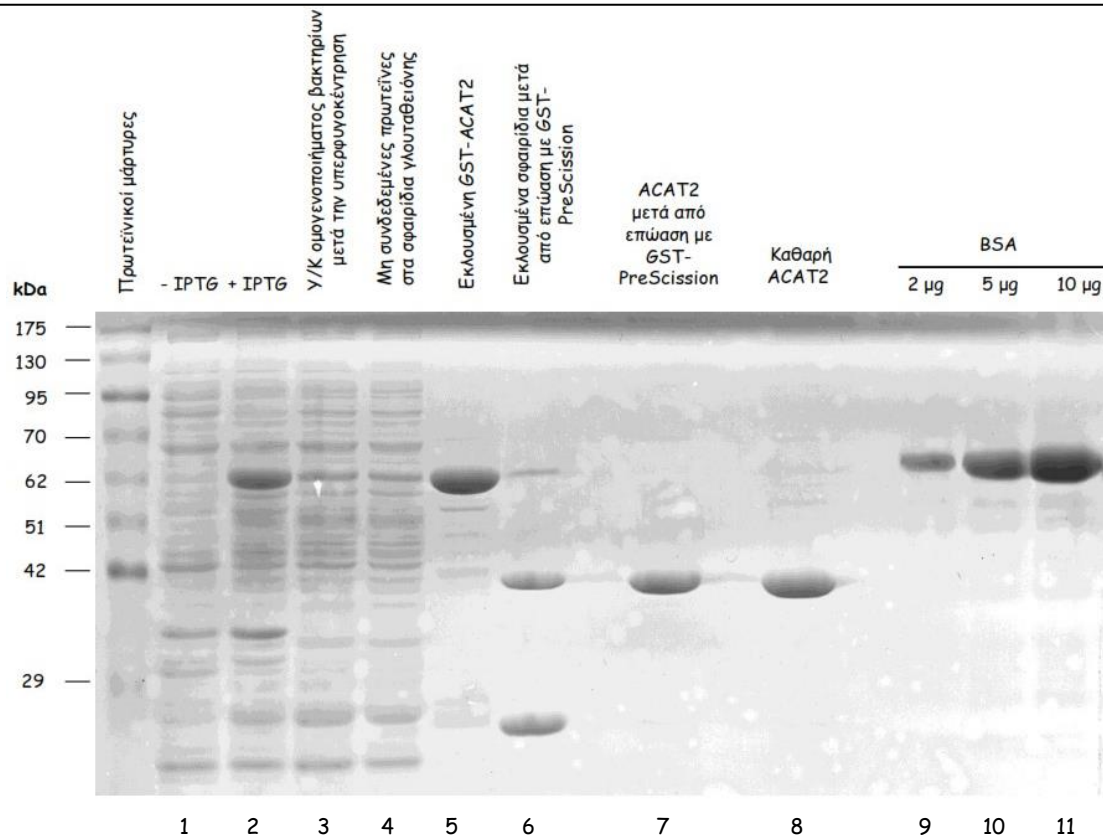
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21DE3

Προκειμένου να μελετηθεί *in vitro* η αλληλεπίδραση μεταξύ της κυτταροπλασματικής ACAT2 (όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες ενότητες, ACAT2 είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο ακετοακετυλ-CoA θειολάση) και της ανενεργής μορφής της μικρής GTPάσης Rab5a, οι πρωτεΐνες αυτές παρασκευάστηκαν σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης *E. coli* και απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή. Ο έλεγχος της έκφρασης και του καθαρισμού των πρωτεϊνών περιγράφεται στη συνέχεια.

3.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-ACAT2

Η ανασυνδυασμένη GST-ACAT2 (~62 kDa) υπερεκφράστηκε σε *E. coli* και απομονώθηκε σε χρωματογραφική στήλη με σφαιρίδια γλουταθειόνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» (βλ. ενότητα 2.1.2). Κατόπιν, η GST-ACAT2, ενώ παρέμενε συνδεδεμένη στα σφαιρίδια, επώαστηκε με την GST-PreScission (η οποία παράχθηκε σε καθαρή μορφή, βλέπε παρακάτω παράγραφο 3.1.5), μία εξειδικευμένη πρωτεάση που προκαλεί διάσπαση του τμήματος ανάμεσα στην GST και στην αλληλουχία αμινοξέων της ACAT2, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μοτίβο. Η επώαση αυτή οδήγησε σε έκλυση της ACAT2 από τη στήλη, ενώ η GST παρέμεινε προσδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνης (βλ. ενότητα 2.1.2). Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα της ACAT2, αφού υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της με την χρωματομετρική μέθοδο Bradford, μικρή ποσότητα απ' όλα τα στάδια του καθαρισμού αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12%, όπου ακολούθησε χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (Εικ. 3.1). Στις τελευταίες θέσεις της πηκτής φορτώθηκαν κατάλληλες ποσότητες BSA (Bovine Serum Albumin), ως μέτρο σύγκρισης της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.



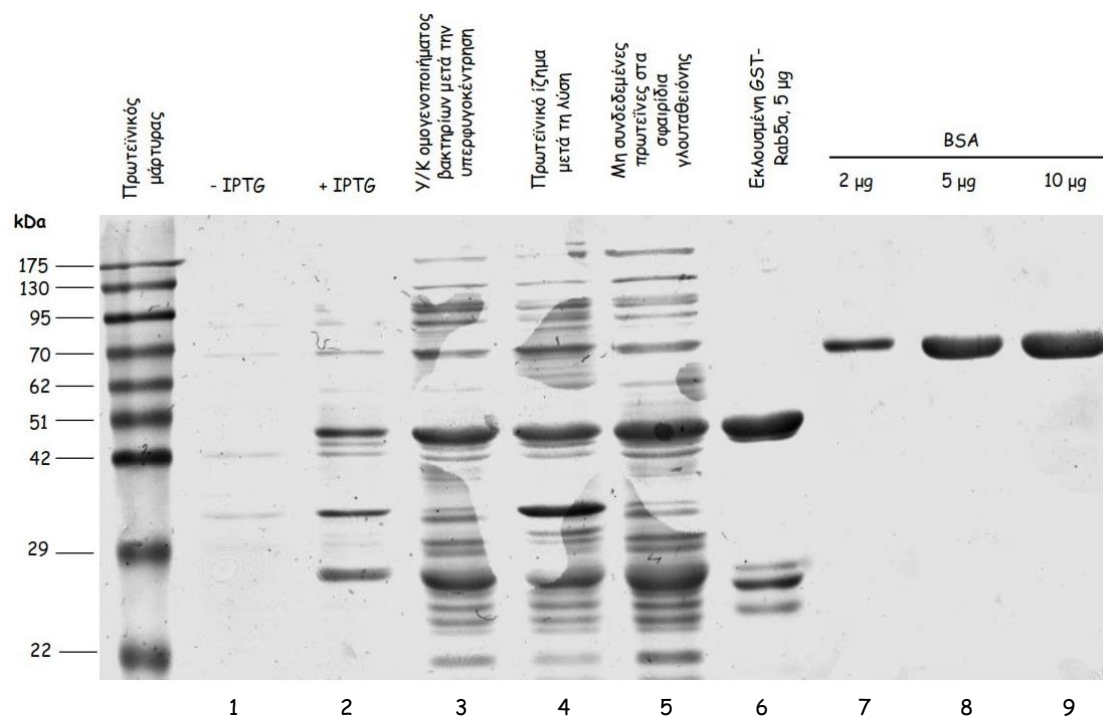
Εικ. 3.1: Στάδια καθαρισμού της GST-ACAT2. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο που εξέφραζε την ανασυνδυασμένη GST-ACAT2. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επάχθηκε με την προσθήκη 10 μ M IPTG και ακολούθησε καθαρισμός σε σφαιρίδια γλουταθειόνης. Για να παραχθεί η καθαρή μορφή της ACAT2 χωρίς την GST, πραγματοποιήθηκε επώαση με μία εξειδικευμένη πρωτεάση (GST-PreScission protease). Η καθαρή ACAT2 υπέστη διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα επόμενα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: **(1):** Βακτήρια πριν την επαγωγή με IPTG (10 μ g), **(2):** Βακτήρια μετά από επαγωγή με IPTG (10 μ g), **(3):** Υπερκείμενο ομογενοποιημένου βακτηρίου μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση (10 μ g), **(4):** Μη προσδεμένες πρωτεΐνες μετά την επώαση του υπερκειμένου με σφαιρίδια γλουταθειόνης – σεφαρόζης (10 μ g), **(5):** Εκλουόμενη πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (5 μ g), **(6):** Εκλουόμενα σφαιρίδια με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης μετά από επώαση με την GST-PreScission (5 μ g), **(7):** ACAT2 στην υγρή φάση της στήλης μετά από επώαση με την GST-PreScission (5 μ g), **(8):** Καθαρή ACAT2 (5 μ g), **(9):** 2 μ g BSA, **(10):** 5 μ g BSA, **(11):** 10 μ g BSA.

Τελικά, απομονώθηκε καθαρή ACAT2 (~41 kDa), χωρίς το πρόσδεμα GST, σε συγκέντρωση που κυμαίνονταν από 1,5 μ g/ μ l έως 2,6 μ g/ μ l. Στη συνέχεια, η καθαρή ACAT2 υπέστη διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος (βλ ενότητα 2.1.2), η

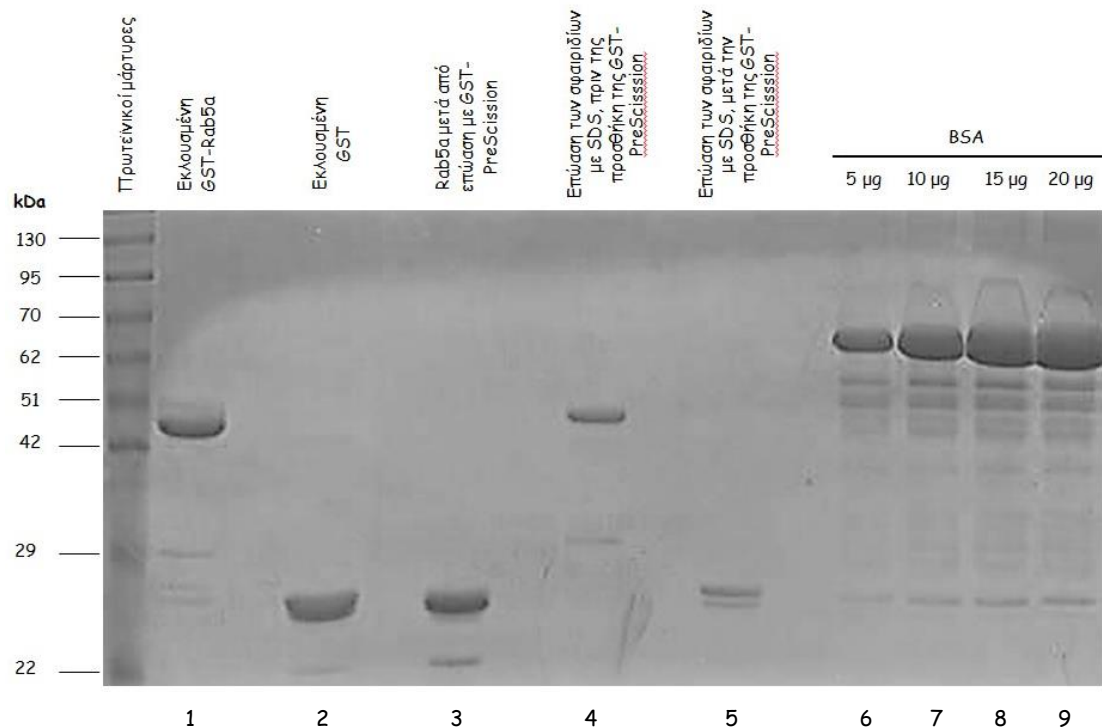
σύσταση του οποίου εξαρτιόνταν από τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη, και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή της.

3.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST–Rab5a:GDP

Με παρόμοια μεθοδολογία, η GST–Rab5a:GDP υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21DE3 (Εικ. 3.2). Η μόνη διαφορά σε σχέση με τον καθαρισμό της ACAT2 ήταν ότι στα διαλύματα του καθαρισμού προστέθηκε το νουκλεοτίδιο GDP (βλ ενότητα 2.1.1). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το πρωτόκολλο απομόνωσης της GST–Rab5a:GDP πραγματοποιήθηκε με κατάλληλες προσαρμογές και παραλλαγές, ανάλογα με τις μετέπειτα τεχνικές που θα χρησιμοποιούνταν η καθαρή πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, για τις τεχνικές συγκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη μορφή της GST–Rab5a:GDP, ενώ για τα πειράματα θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκε η Rab5a:GDP χωρίς την GST (Εικ. 3.3). Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα της GST–Rab5a:GDP και της Rab5a:GDP, η συγκέντρωσή της υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford και ποσότητες από τα στάδια του καθαρισμού αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS–PAGE 12% και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R–250 (Εικ. 3.2, Εικ. 3.3). Κατάλληλες ποσότητες BSA φορτώθηκαν στις τελευταίες διαδρομές της πηκτής, ως μέτρο σύγκρισης της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης τόσο της GST–Rab5a:GDP όσο και της καθαρής Rab5a:GDP (Εικ. 3.3). Τελικά, απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή οι GST–Rab5a:GDP και Rab5a:GDP, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 6,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ έως 13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ για την Rab5a:GDP και από 17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ έως 34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ για την GST–Rab5a:GDP.



Εικ. 3.2: Στάδια καθαρισμού της GST-Rab5a. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο που εξέφραζε την GST-Rab5a. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επάχθηκε με την προσθήκη 100 µM IPTG. Ο καθαρισμός της GST-Rab5a διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή GST-Rab5a υπέστη διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα εκάστοτε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (1): Βακτήρια πριν την επαγωγή με IPTG, (2): Βακτήρια μετά από επαγωγή με IPTG, (3): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση, (4): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση, (5): Μη προσδεμένες πρωτεΐνες μετά την επώαση του υπερκειμένου με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, (6): Καθαρή GST-Rab5a μετά από έκλυση των πλυμένων σφαιριδίων γλουταθειόνης με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης. Τα σφαιρίδια είχαν επωαστεί προηγουμένως με κατάλληλο διάλυμα πλύσης, (7): 2 µg BSA, (8): 5 µg BSA, (9): 10 µg BSA.

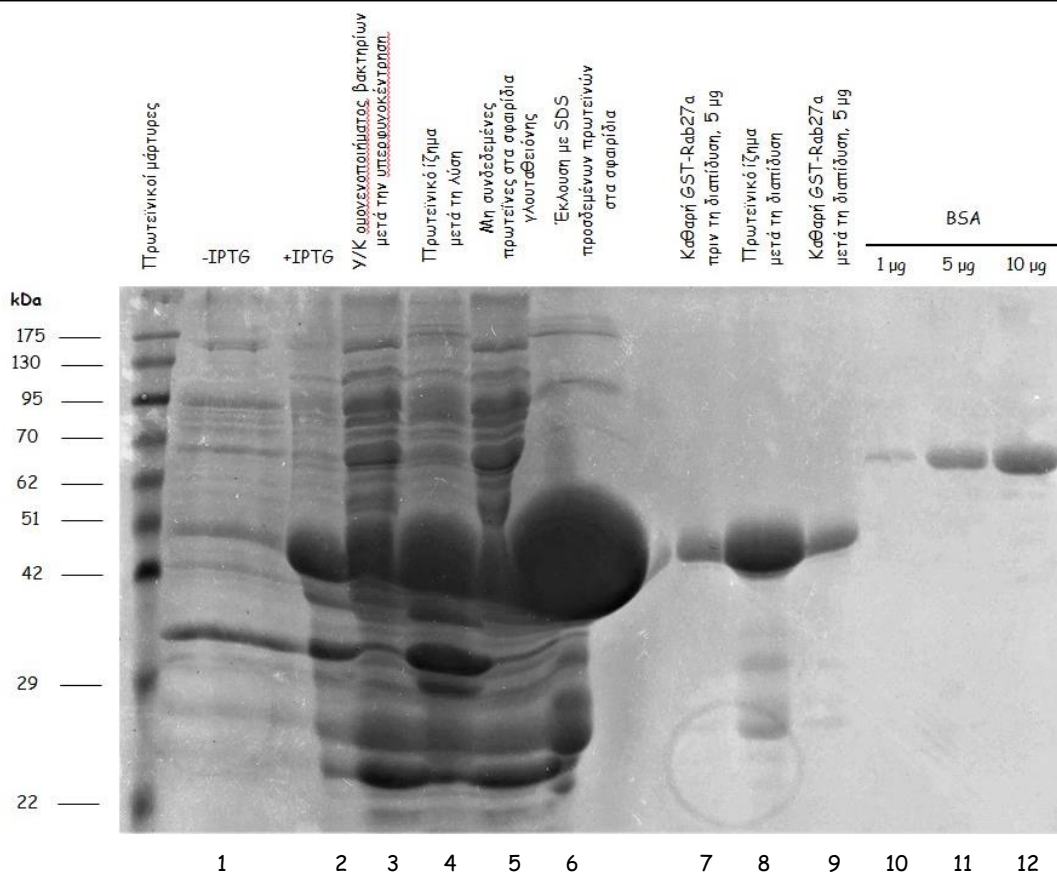


Εικ. 3.3: Έλεγχος καθαρισμού της εκφρασμένης σε *E. coli* Rab5a. (1): Εκλουσμένη GST-Rab5a (5 μg) από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης. (2): Εκλουσμένη GST (5 μg) από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης μετά από επώαση με την πρωτεάση GST-PreScission. (3): Καθαρή Rab5a (5 μg) μετά από επώαση των σφαιριδίων γλουταθειόνης με την πρωτεάση GST-PreScission. (4): Εκλουσμένη πρωτεΐνη (5 μg) από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση SDS πριν την επώαση με την GST-PreScission. (5): Εκλουσμένη πρωτεΐνη (5 μg) από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση SDS μετά την επώαση με την GST-PreScission. Να σημειωθεί ότι η προσθήκη του διαλύματος SDS πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση των σφαιριδίων με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης. (6): 5 μg BSA, (7): 10 μg BSA, (8): 15 μg BSA (9): 20 μg BSA.

3.1.3 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-Rab27a:GDP

Στην μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Rab5 και της ACAT2 ήταν σημαντικό να υπάρχει ένας αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η πρωτεΐνη GST-Rab27, καθώς η Rab27 είναι μέλος της οικογένειας των Rab πρωτεϊνών με μεγάλη ομολογία με την Rab5, αλλά με ξεχωριστό ρόλο στην μεμβρανική μεταφορά δεδομένου ότι η Rab27 ελέγχει την εξωκυττάρωση. Η GST-Rab27a:GDP υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21DE3 με την υλοποίηση παρόμοιου εργαστηριακού πρωτοκόλλου με αυτό της GST-Rab5a:GDP (βλ ενότητα 2.1.3).

Μετά το πέρας του καθαρισμού, προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα της GST-Rab27a:GDP, η συγκέντρωσή της υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford και ποσότητες από τα στάδια του καθαρισμού αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 (Εικ. 3.4). Τελικά, απομονώθηκε καθαρή GST-Rab27a:GDP (~ 50 kDa) σε συγκέντρωσή 11,5 µg/ml.

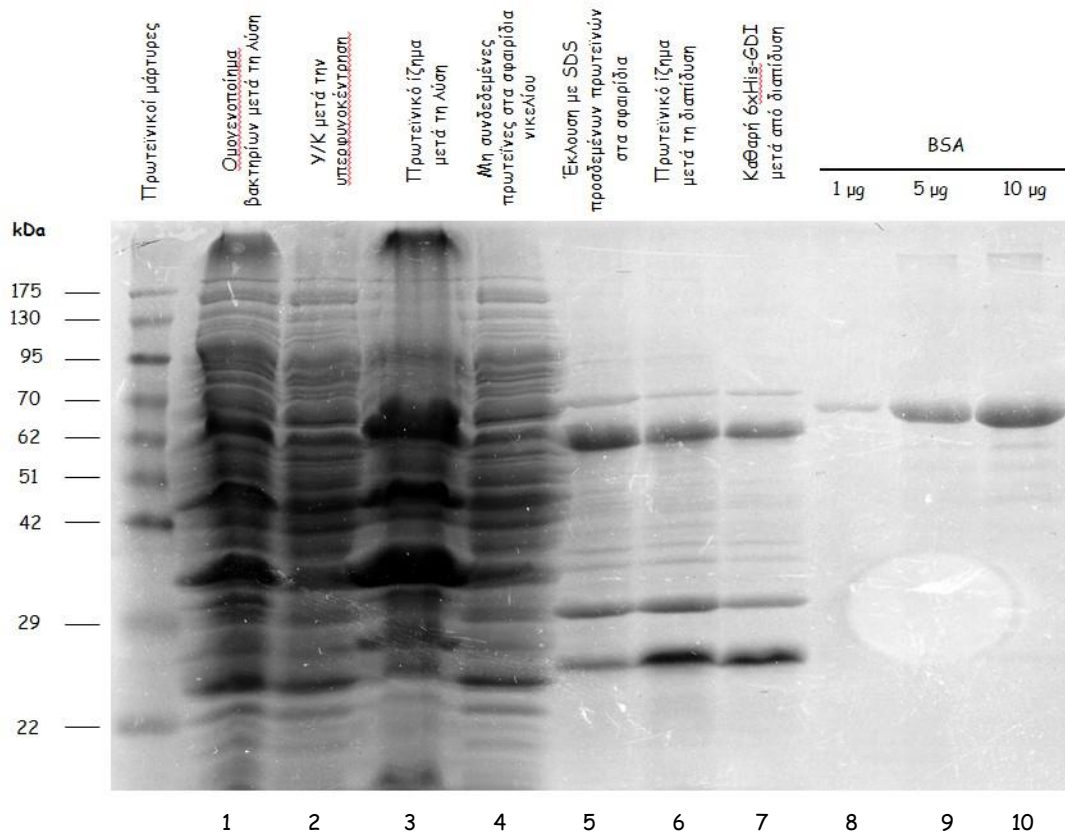


Εικ. 3.4: Στάδια καθαρισμού της GST-Rab27a. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο που εξέφραζε την GST-Rab27a. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επάχθηκε με την προσθήκη 100 µM IPTG. Η απομόνωση της GST-Rab27a πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή πρωτεΐνη υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιείχε: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 µM GDP. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή SDS – PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (1): Βακτήρια πριν την επαγωγή με IPTG (20 µg), (2): Βακτήρια μετά από επαγωγή με IPTG (20 µg), (3): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση (20 µg), (4): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση (20 µg), (5): Μη προσδεμένες πρωτεΐνες μετά την επώαση του υπερκειμένου με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (20 µg), (6): Εκλουσμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με την χρήση SDS, (7): Εκλουσμενη GST-Rab27a από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης μετά τις πλύσεις με τη χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης πριν τη διαπίδυση (5 µg), (8): Πρωτεϊνικό ίζημα μετά τη διαπίδυση,

(9): Καθαρή GST-Rab27a μετά τη διαπίδυση, (10): 1 μ g BSA, (11): 5 μ g BSA, (12): 10 μ g BSA.

3.1.4 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης 6xHis-GDI

Μια γνωστή πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Rab5:GDP είναι η RabGDI (στο εξής θα ονομάζεται GDI). Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η GDI ως θετικός μάρτυρας στα πειράματα αλληλεπίδρασης, η πρωτεΐνη 6xHis-GDI υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21DE3 σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο (βλ. ενότητα 2.1.5). Μετά το τέλος του καθαρισμού, η συγκέντρωση της 6xHis-GDI εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Bradford και ποσότητες από τα στάδια του καθαρισμού αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε χρώση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (Εικ. 3.5). Κατάλληλες ποσότητες BSA φορτώθηκαν στις τελευταίες διαδρομές της πηκτής, για έλεγχο της συγκέντρωσης της καθαρής 6xHis-GDI. Τελικά, απομονώθηκε καθαρή 6xHis-GDI (~62 kDa) σε συγκέντρωσή 8 μ g/ μ l. Ωστόσο, παρατηρούνται δύο επιπλέον ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους (24 και 29 kDa) στο δείγμα της καθαρής 6xHis-GDI. Είναι πιθανό η 6xHis-GDI να υπόκειται σε μερική αποικοδόμηση από ενδογενείς πρωτεάσες των βακτηρίων.

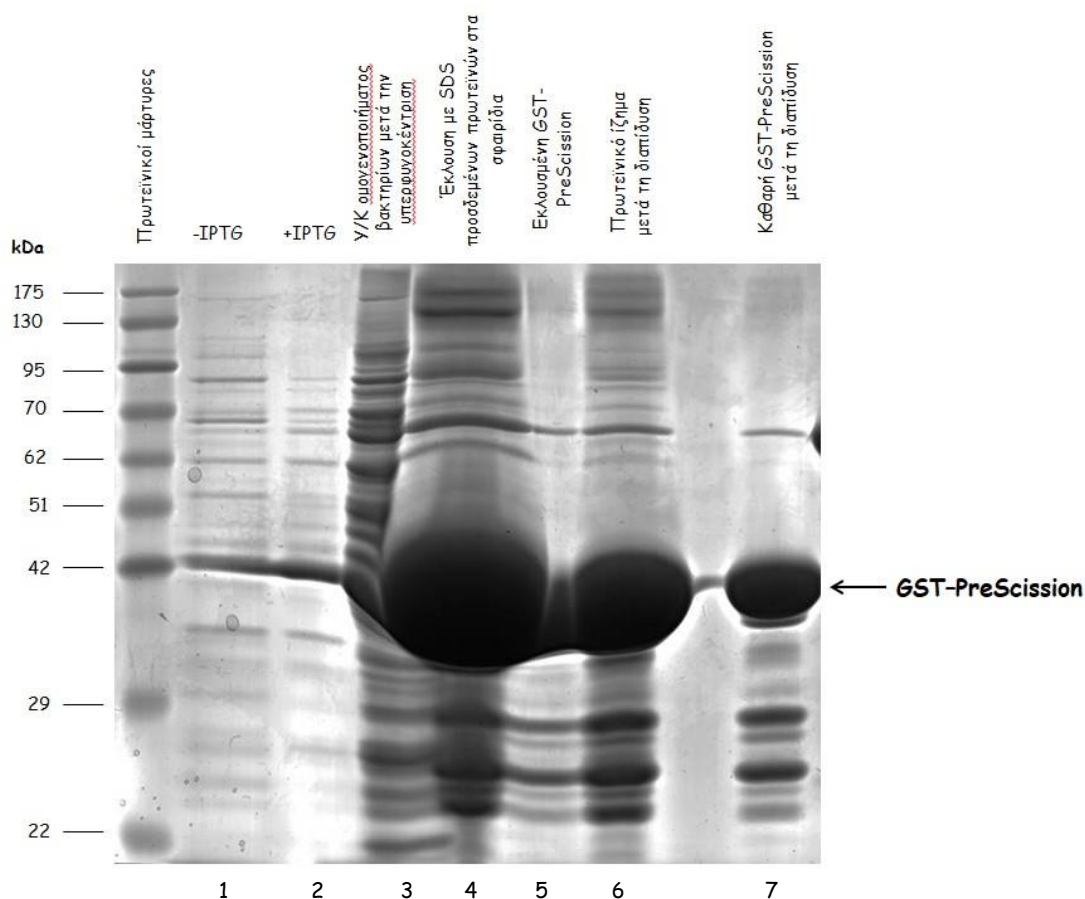


Εικ. 3.5: Στάδια καθαρισμού της 6xHis-GDI. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο που εξέφραζε την 6xHis-GDI. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε χωρίς την παρουσία IPTG. Ο καθαρισμός της 6xHis-GDI διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή 6xHis-GDI υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιείχε: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 100 mM NaCl. Δείγματα από τα στάδια του καθαρισμού της φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (1): Βακτήρια μετά από λύση με τη μέθοδο French pressure (20 µg), (2): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση (20 µg), (3): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρωση (20 µg), (4): Μη προσδεμένες πρωτεΐνες μετά την επώαση του υπερκείμενου με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (20 µg), (5): Εκλουσμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια νικελίου με τη χρήση SDS, (6): Πρωτεϊνικό ίζημα μετά τη διαπίδυση, (7): Καθαρή GDI (~62 kDa) μετά από διαπίδυση, (8): 1 µg BSA, (9): 5 µg BSA, (10): 10 µg BSA.

3.1.5 Υπερέκφραση και καθαρισμός της πρωτεάσης GST-PreScission

Η πρωτεάση GST-PreScission υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21DE3 (βλέπε παράγραφο 2.1.4) και χρησιμοποιήθηκε για την ενζυματική σχάση των πρωτεϊνών GST-ACAT2 και GST-Rab5a:GDP, με σκοπό την παραγωγή καθαρής ACAT2 και Rab5a:GDP χωρίς την GST ετικέτα, αντίστοιχα, όπου κρίθηκε απαραίτητο. Μετά το τέλος του καθαρισμού, η συγκέντρωση της GST-

PreScission υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford και ποσότητες από όλα τα στάδια του καθαρισμού της φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12%, η οποία επεξεργάστηκε με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 για χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών (Εικ. 3.6). Τελικά, απομονώθηκε η πρωτεάση GST-PreScission (~ 41 kDa) σε συγκέντρωση 16,83 μg/μl, ή 16,83 Units ενζύμου/μl, σε ικανοποιητικά καθαρή μορφή.



Εικ. 3.6: Στάδια καθαρισμού της πρωτεάσης GST-PreScission. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο που εξέφραζε την GST-PreScission. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επάχθηκε με την προσθήκη 100 μM IPTG. Ο καθαρισμός της GST-PreScission διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή πρωτεάση υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιείχε: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Δείγματα από τα στάδια του καθαρισμού της φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (1): Βακτήρια πριν την επαγωγή με IPTG, (2): Βακτήρια μετά από επαγωγή με IPTG, (3): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφωγοκέντρωση, (4): Εκλυσμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με την χρήση SDS μετά τις πλύσεις τους, (5): Εκλυσμένη GST-PreScission από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης μετά τις πλύσεις με την χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης, (6): Πρωτεϊνικό ίζημα μετά την διαπίδυση, (7): Καθαρή GST-PreScission (~41 kDa) μετά από διαπίδυση.

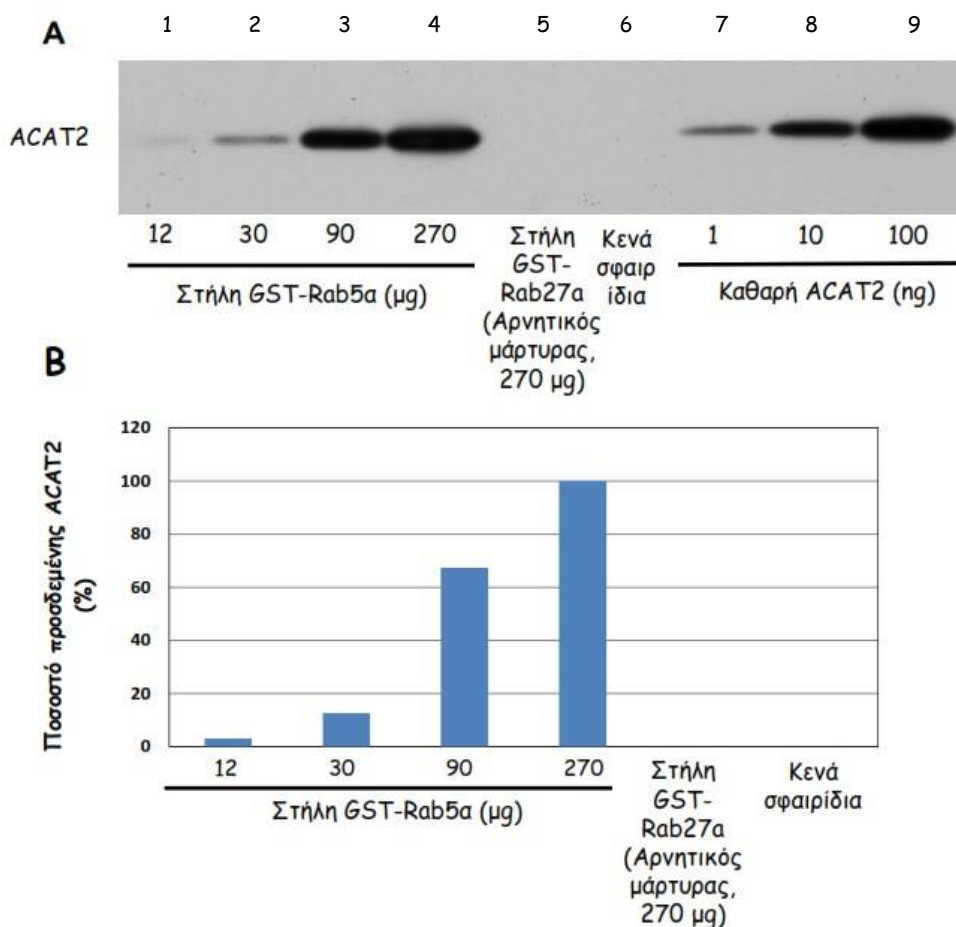
3.2 Μελέτη της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της GST–Rab5a:GDP και της ACAT2

Οι πρωτεΐνες που παράχθηκαν και καθαρίστηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* τεχνικές συγκατακρήμισης που περιγράφονται στη συνέχεια, με σκοπό την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ανενεργής μορφής της Rab5a:GDP και της ACAT2.

3.2.1 Η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την GST–Rab5a:GDP, με δοσοεξαρτώμενη σχέση.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Rab5 και της ACAT2, η πρώτη απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως χιμαιρική πρωτεΐνη με το πρόσδεμα GST (GST–Rab5a:GDP), ενώ η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε μετά από αφαίρεση της GST (βλ. ενότητα 3.1.1). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η GST–Rab27a:GDP. Αρχικά, αυξανόμενες ποσότητες GST–Rab5a:GDP (12, 30, 90, 270 μ g) και 270 μ g GST–Rab27a:GDP επώαστηκαν με 10 μ g ACAT2 για 2 ώρες, στους 4°C, υπό ανάδευση. Μετά τη δημιουργία του συμπλόκου GST–Rab5a:GDP/ACAT2, οι παραπάνω ποσότητες προστέθηκαν σε 30 μ l σφαιριδίων σεφαρόζης–γλουταθειόνης (Sepharose 4B Glutathione Beads), τα οποία προηγουμένως πλύθηκαν με ισότονο διάλυμα και επώαστηκαν με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης BSA, για να ελαχιστοποιηθούν οι μη – ειδικές αλληλεπιδράσεις (βλ. ενότητα 2.7). Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα, στους 4°C, υπό περιστροφική ανάδευση. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα σύμπλοκα προσδέθηκαν στα σφαιρίδια γλουταθειόνης μέσω του προσδέματος GST. Κατόπιν, τα σφαιρίδια πλύθηκαν με ισότονο διάλυμα, για να απομακρυνθεί η ποσότητα της αδέσμευτης ACAT2 (Unbound material) και επώαστηκαν με 30 μ l κατάλληλου διαλύματος έκλουσης που περιείχε 20 mM EDTA και 100 μ M GTP γ S, σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο (Christoforidis S. & Zerial M., 2000; Christoforidis S. & Zerial M., 2001). Το περιεχόμενο της έκλουσης κάθε δείγματος (1/6 του συνολικού όγκου έκλουσης) αναλύθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS–PAGE με επακόλουθη ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting) με την χρήση εξειδικευμένου αντισώματος έναντι της ACAT2, Εικ. 3.7A). Έπειτα, οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ (Εικ. 3.7B). Όπως ήταν αναμενόμενο, η ACAT2 ανιχνεύθηκε μόνο στο περιεχόμενο της έκλουσης από την στήλη με την GST–Rab5a:GDP, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανιχνεύσιμο σήμα στην στήλη με την GST–Rab27a:GDP, ούτε σε

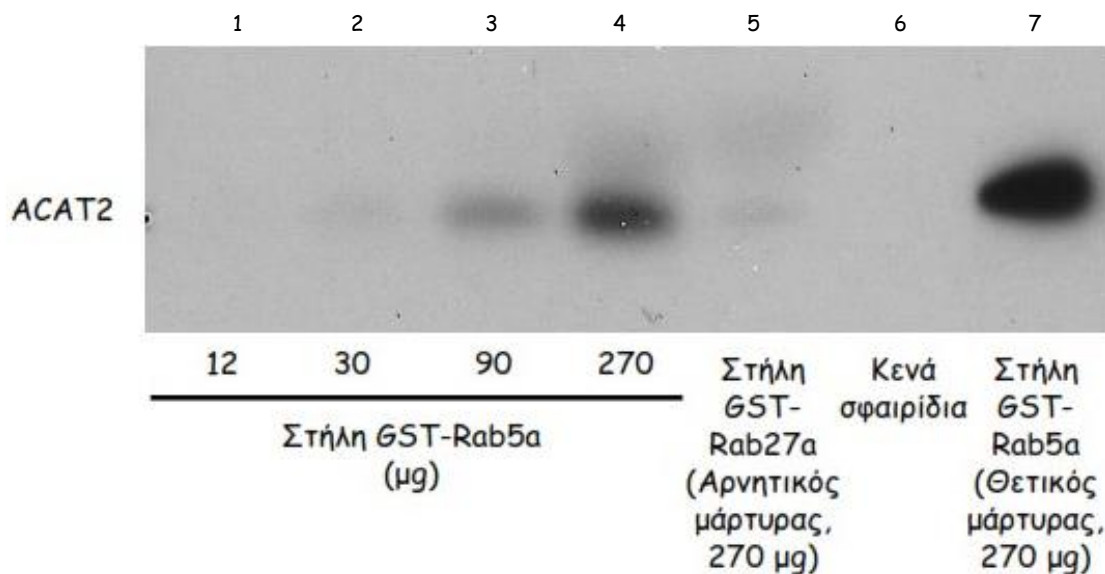
εκείνη με «κενά» σφαιρίδια, γεγονός που αποδεικνύει την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2. Μια ακόμη παρατήρηση που ενισχύει το συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι εξειδικευμένη αποτελεί το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση διασπάται από τη χρήση του χηλικού παράγοντα EDTA (μέσο έκλουσης της στήλης). Το EDTA αφαιρεί τα ιόντα Mg^{2+} από την Rab5, προκαλώντας έτσι την αποδέσμευση του GDP. Το γεγονός ότι η σύνδεση Rab5-ACAT2 εξαρτάται από το GDP, που είναι γνωστό ότι επηρεάζει την διαμόρφωση της Rab5 είναι ισχυρή ένδειξη της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η πρόσδεση της ACAT2 στην GST-Rab5a:GDP ακολουθούσε δοσοεξαρτώμενη σχέση, δηλαδή ολοένα και μεγαλύτερο ποσοστό της ACAT2 προσδενόταν σε αυξανόμενες ποσότητες της GST-Rab5a:GDP. Βασισμένοι σε διαφορετικά πειράματα με την τεχνική συγκατακρήμνισης, εκτιμήθηκε πως περίπου το 40–50% της συνολικής ποσότητας της προστιθέμενης ACAT2 προσδέθηκε στην στήλη με την GST-Rab5a:GDP. Το ποσοστό πρόσδεσης των δύο πρωτεϊνών κρίνεται αξιοσημείωτο αν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι οι δύο πρωτεΐνες παράγονται σε ανασυνδυασμένη μορφή σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης, και επομένως πιθανά να μην έχουν απόλυτα την φυσική τους μορφή (native) όπως θα παράγονταν σε ευκαρυωτικά κύτταρα.



Εικ. 3.7: Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή μορφή της GST-Rab5a:GDP με δοσοεξαρτώμενη σχέση. **(A):** 10 µg ACAT2 επώαστηκαν με αυξανόμενες ποσότητες GST-Rab5a (12, 30, 90, 270 µg, θέσεις 1-4) και το μείγμα προστέθηκε σε σφαιρίδια σεφαρόζης - γλουταθειόνης, τα οποία προηγουμένως επώαστηκαν με διάλυμα που περιείχε 10 mg/ml αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA). Ως αρνητικοί μάρτυρες, ίδια ποσότητα ACAT2 (10 µg) επώαστηκε με 270 µg GST-Rab27a:GDP (θέση 5) καθώς και με «κενά» σφαιρίδια κάτω από τις ίδιες συνθήκες (control empty beads, θέση 6). Η έκλυση της ACAT2 από τα σφαιρίδια επιτεύχθηκε μετά από επώαση των τελευταίων με διάλυμα που περιείχε EDTA, το οποίο αποδεσμεύει το σύμπλοκο νουκλεοτιδίου GDP/Mg²⁺ και απελευθερώνει τις προσδεμένες πρωτεΐνες. Το 1/6 του συνολικού όγκου έκλυσης (5 µl από συνολικά 30 µl όγκου έκλυσης) όλων των δειγμάτων αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικό αντίσωμα έναντι της ACAT2. Ποσότητες καθαρής ACAT2 (1, 10, 100 ng) φορτώθηκαν στις τελευταίες θέσεις του ηηκτώματος για την εκτίμηση του ποσοστού της προσδεμένης ACAT2 στην στήλη της GST-Rab5a:GDP (θέσεις 7-9). **(B):** Ημι-ποσοτικοποίηση της έντασης των ανοσοδραστικών ζωνών της ACAT2 του Western blot στο A με τη χρήση του λογισμικού ImageJ. Η αλληλεπίδραση του δείγματος των 10 µg ACAT2 στα 270 µg GST-Rab5a:GDP ορίστηκε αυθαίρετα ως 100%. Από την άλλη, τα επίπεδα της ACAT2 στους αρνητικούς μάρτυρες δεν ήταν ανιχνεύσιμα.

3.2.2 Μετά την έκλυση με EDTA, εν συνεχεία έκλυση της στήλης με γλουταθειόνη καταδεικνύει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της ACAT2 συνδέεται στην Rab5 με δεσμούς που εξαρτώνται από το νουκλεοτίδιο GDP.

Μετά την έκλυση των παραπάνω δειγμάτων με EDTA (όπου εκλούστηκε η ποσότητα της ACAT2 που συνδέονταν με την διαμόρφωση της Rab5 που εξαρτάται από το νουκλεοτίδιο GDP), προχωρήσαμε σε επώαση των σφαιριδίων με 30 μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης προκειμένου να προσδιορίσουμε την ποσότητα της ACAT2 που αλληλεπιδρά με την Rab5 χωρίς την ανάγκη του νουκλεοτιδίου GDP. Να σημειωθεί ότι μετά την ειδική έκλυση της προσδεμένης ACAT2 από την στήλη της GST-Rab5a:GDP με EDTA, πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις των σφαιριδίων με το ίδιο διάλυμα (500 μl ανά πλύση), για να απομακρυνθεί η ποσότητα της εκλουσμένης ACAT2 από τον νεκρό όγκο των σφαιριδίων. Μετά το πέρας της έκλυσης με γλουταθειόνη, το 1/6 του συνολικού όγκου των εκλουσμένων δειγμάτων φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικ. 3.8). Παρατηρήθηκε ότι λιγότερο από 1% της συνολικής προστιθέμενης ACAT2 (< 10 ng ανιχνεύσιμης ποσότητας ACAT2 σε κάθε δείγμα), συγκριτικά με τα εκλουσμένα δείγματα με EDTA, εκλύεται από τα σφαιρίδια με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης, ακολουθώντας την ίδια δοσοεξαρτώμενη σχέση (βλ. ενότητα 3.2.1). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western των εκλουσμένων δειγμάτων με EDTA και των εκλουσμένων δειγμάτων με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν συγκρίσιμα μεταξύ τους, καθώς οι δύο εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο τελικό όγκο (30 μl) και ίδιες ποσότητες των δειγμάτων (1/6 του συνολικού όγκου έκλυσης σε κάθε περίπτωση) αναλύθηκαν περαιτέρω. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η σύνδεση της ACAT2 στην GST-Rab5a:GDP πραγματοποιείται ειδικά στην διαμόρφωση της Rab5 που εξαρτάται από το νουκλεοτίδιο GDP.

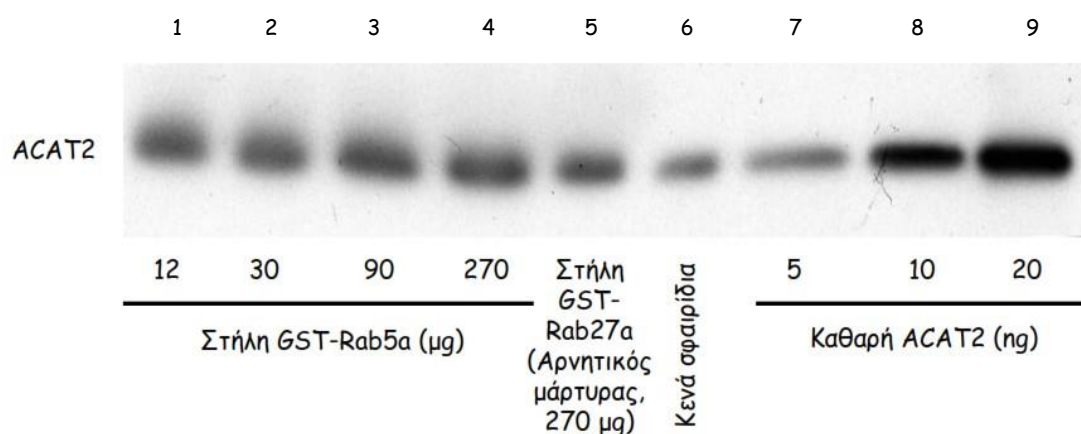


Εικ. 3.8: Ελάχιστες ποσότητες ACAT2 ανιχνεύθηκαν σε δείγματα μετά από έκλυση των σφαιριδίων γλουταθειόνης με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης. Οι πρωτεΐνες GST-Rab5a:GDP και GST-Rab27a:GDP παρέμειναν προσδεμένες στα σφαιρίδια γλουταθειόνης μετά την επώασή τους με διάλυμα που περιείχε EDTA. Επιπλέον, μετά την έκλυση με EDTA, πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις (500 μl ανά πλύση) με διάλυμα EDTA, με σκοπό την απομάκρυνση της εκλουσμένης ACAT2 από τον νεκρό όγκο των σφαιριδίων. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επώαστηκαν με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης και οι εκλουσμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Οι ποσότητες της ACAT2 ανιχνεύθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι της ACAT2. Ελάχιστες ποσότητες ACAT2 παρατηρήθηκαν στα δείγματα με αυξανόμενες ποσότητες GST-Rab5a:GDP (12, 30, 90, 270 μg, θέσεις 1-4) μετά την ανάκτηση των τελευταίων με διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης. Η GST-Rab27a:GDP χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (θέση 5). Ως δεύτερο δείγμα αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν «κενά» σφαιρίδια γλουταθειόνης (θέση 6). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας δείγμα που περιείχε ACAT2 που εκλούσθηκε με EDTA από στήλη που περιείχε 270 μg GST-Rab5a:GDP (θέση 7).

3.2.3 Περαιτέρω έκλυση της στήλης με SDS καταδεικνύει ότι η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την GST-Rab5a:GDP και όχι μη ειδικά με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Μετά την έκλυση των παραπάνω δειγμάτων με γλουταθειόνη, προχωρήσαμε σε επώαση των σφαιριδίων με υψηλή συγκέντρωση SDS (ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας) με σκοπό να διερευνήσουμε αν υπάρχει κάποιο ποσοστό της ACAT2 που συνδέεται μη ειδικά με τα σφαιρίδια. Για το σκοπό αυτό, μετά το πέρας της έκλυσης των σφαιριδίων με γλουταθειόνη (βλέπε προηγούμενη παράγραφο), προστέθηκαν 30 μl SDS στα σφαιρίδια και το 1/3 του συνολικού όγκου των

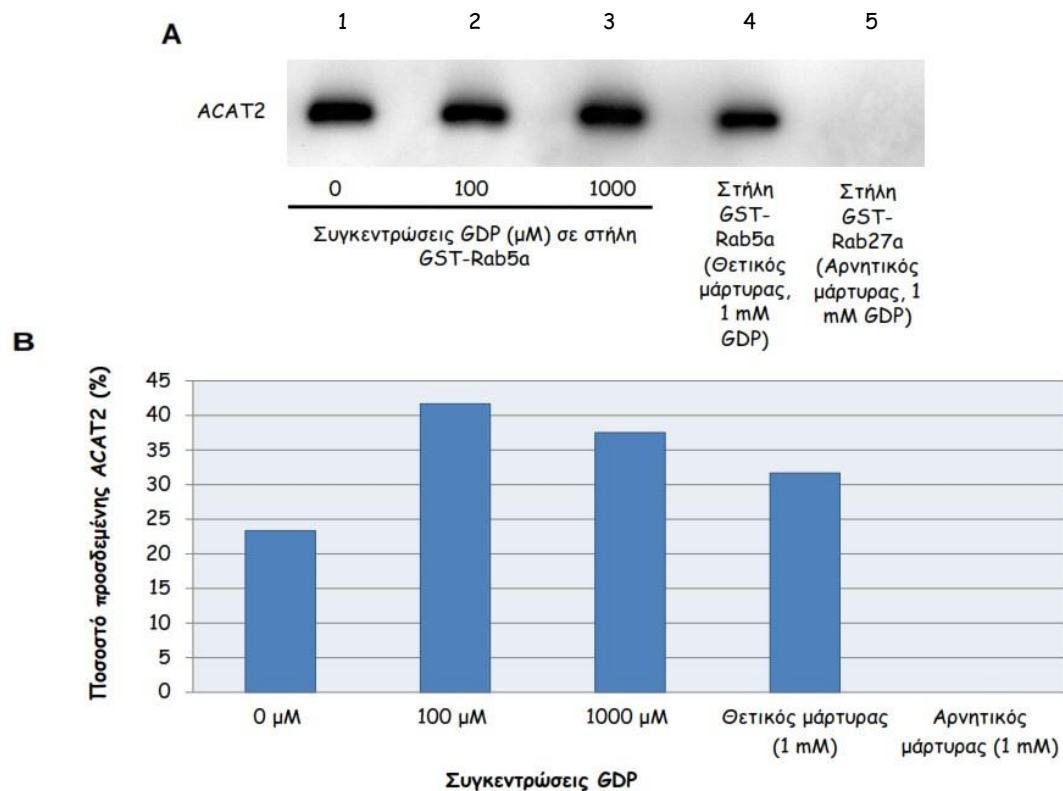
εκλουσμένων δειγμάτων φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της ACAT2 (Εικ. 3.9). Παρατηρήθηκε ότι ελάχιστη ποσότητα ACAT2 εκλούστηκε με SDS, χωρίς δοσοεξάρτηση. Συνεπώς, ένα πολύ μικρό μέρος της ACAT2 συνδέεται μη ειδικά στα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων των προηγούμενων δειγμάτων (εκλουσμένα δείγματα με EDTA και εκλουσμένα δείγματα με γλουταθειόνη), παρατηρήθηκε πως μόλις 15 ng ACAT2 (< 1% της συνολικής ACAT2 που προστέθηκε αρχικά στη στήλη GST-Rab5a:GDP) προσδέθηκαν μη ειδικά στα σφαιρίδια. Η ποσότητα αυτή είναι πολύ μικρή συγκριτικά με την δοσοεξαρτώμενη σχέση αλληλεπίδρασης της GST-Rab5a:GDP και της ACAT2 (όπως προσδιορίστηκε με την έκλυση με EDTA), γεγονός που ενισχύει το συμπέρασμα ότι η σύνδεση της ACAT2 στα σφαιρίδια που περιέχουν GST-Rab5GDP είναι ειδική.



Εικ. 3.9: Πολύ μικρές ποσότητες ACAT2 εκλούστηκαν μετά από επώαση των σφαιριδίων με SDS. Τα παραπάνω σφαιρίδια (βλ. ενότητα 3.2.2) επώαστηκαν με 30 μl SDS, που αποτελεί έναν ισχυρό αποδιατακτικό παράγοντα των πρωτεϊνών. Η επίδραση με SDS πραγματοποιήθηκε σε όλα τα παραπάνω δείγματα και, στη συνέχεια, το 1/3 του συνολικού όγκου των εκλουσμένων δειγμάτων (10 μl) φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Οι ποσότητες της ACAT2 ανιχνεύθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι της ACAT2. Πολύ μικρές ποσότητες ACAT2 ανιχνεύθηκαν μη ειδικά με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης παρατηρήθηκαν σε όλα τα δείγματα (θέσεις 1-4). Η GST-Rab27a:GDP χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (θέση 5). Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και από το δείγμα του δεύτερου αρνητικού μάρτυρα (ποσότητα της ACAT2 σε «κενά» σφαιρίδια γλουταθειόνης, θέση 6). Τέλος, γνωστές ποσότητες απομονωμένης ACAT2 (5, 10, 20 ng, θέσεις 7-9 αντίστοιχα) φορτώθηκαν με σκοπό την εκτίμηση της συνολικής ποσότητας των προηγούμενων δειγμάτων.

3.2.4 Η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα μόνο με το πρωτεϊνικό τμήμα της GST-Rab5a:GDP και όχι με το GDP νουκλεοτίδιο.

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι η ACAT2 συνδέεται με την Rab5 με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από το νουκλεοτίδιο GDP (αφού το EDTA, το οποίο αφαιρεί το σύμπλοκο GDP/Mg^{2+} , προκαλεί έκλυση της ACAT2 από τη στήλη). Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στο να διερευνήσουμε αν η ACAT2 συνδέεται με την Rab5 αυτή καθαυτή (της οποίας η διαμόρφωση εξαρτάται από το νουκλεοτίδιο), ή αν συνδέεται απλά και μόνο με το νουκλεοτίδιο (που είναι συνδεδεμένο στη Rab5) χωρίς η αλληλεπίδραση να περιλαμβάνει την Rab5 την ίδια. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε προεπάση της ACAT2 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GDP (ώστε να δοθεί η δυνατότητα στην ACAT2 να συνδεθεί πρώτα με το νουκλεοτίδιο, αν υπάρχει η αλληλεπίδραση αυτή) και στην συνέχεια έγινε η επώασή της με σφαιρίδια στα οποία ήταν προσδεμένη η GST-Rab5a:GDP, και πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο συγκατακρήμνισης (βλ. ενότητα 2.7). Κατόπιν, τα δείγματα που εκλούστηκαν φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση εξειδικευμένου αντισώματος έναντι της ACAT2 (Εικ. 3.10A). Επιπρόσθετα, η ποσότητα της ACAT2 σε κάθε δείγμα έκλυσης υπολογίστηκε με την χρωματομετρική μέθοδο Bradford και εκτιμήθηκε το ποσοστό (%) της ACAT2 που προσδέθηκε στην GST-Rab5a:GDP. Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.10B, προεπάση της ACAT2 ακόμη και με την μέγιστη ποσότητα GDP (1 mM) δεν μείωσε την ποσότητα της προσδεμένης ACAT2 στην Rab5, σε σύγκριση με το δείγμα που προεπώαστηκε απουσία GDP. Μάλιστα, φαίνεται να συνδέεται μεγαλύτερη ποσότητα της ACAT2 στην Rab5 όταν έχει προηγηθεί επώαση της ACAT2 με 1 mM GDP σε σχέση με την προεπάση με 0 mM νουκλεοτιδίου. Αν και δεν είναι δυνατό να εκτιμηθεί στη φάση αυτή αν οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων είναι στατιστικά σημαντικές (το πείραμα έγινε μόνο μία φορά), μπορεί κανείς να εξάγει το συμπέρασμα ότι η προεπάση με GDP δεν επηρεάζει την σύνδεση της ACAT2 με την Rab5. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ACAT2 δεν συνδέεται απλά και μόνο με το GDP της Rab5, αλλά με τη Rab5 αυτή καθαυτή, στη διαμόρφωσή της που εξαρτάται από το GDP (αφού, όπως ειπώθηκε πιο πάνω, το σύμπλοκο Rab5-ACAT2 διασπάται με το EDTA).



Εικ. 3.10: Η ACAT2 αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με το πρωτεϊνικό μέρος της GST–Rab5a:GDP και όχι με το GDP νουκλεοτίδιο. Η συνολική ποσότητα της ACAT2 που προστέθηκε σε αυτή την τεχνική συγκατακρήμνισης συμπυκνώθηκε και, στη συνέχεια, ένα μέρος της (~48 μg) επώαστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GDP νουκλεοτιδίου (0, 100 και 1000 μM, θέσεις 1–3). Κατόπιν, τα 48 μg της ACAT2 προστέθηκαν σε 20 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης που περιείχαν 290 μg GST–Rab5a:GDP. Ακολούθησε παρόμοια διαδικασία με τις προηγούμενες τεχνικές συγκατακρήμνισης, ως προς τα στάδια των πλύσεων και της ειδικής έκλουσης της ACAT2. Να σημειωθεί ότι στα δείγματα θετικού (GST–Rab5a:GDP, θέση 4) και αρνητικού μάρτυρα (GST–Rab27a:GDP, θέση 5) δεν προηγήθηκε επώαση της ACAT2 με ποσότητα GDP νουκλεοτιδίου, αλλά η πρωτεΐνη προστέθηκε ταυτόχρονα στα σφαιρίδια γλουταθειόνης μαζί με 1 mM GDP νουκλεοτιδίου. (A): Ανοσοαποτύπωση κατά Western των εκλούμενων ποσοτήτων της ACAT2 με εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της ACAT2. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της ACAT2 με την GST–Rab5a:GDP σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός του δείγματος αρνητικού μάρτυρα. (B): Οι συγκεντρώσεις των εκλούμενων ποσοτήτων της ACAT2 κάθε δείγματος υπολογίστηκαν με την μέθοδο Bradford και προσδιορίστηκε το ποσοστό (%) της προσδεμένης ACAT2 στην GST–Rab5a:GDP. Αν και οι διαφορές μεταξύ των πειραματικών δειγμάτων και του αρνητικού μάρτυρα είναι πρόδηλες, δεν είναι δυνατό να εκτιμηθεί αν οι μικρές διαφορές μεταξύ των πειραματικών δειγμάτων είναι στατιστικά σημαντικές, αφού το πείραμα έγινε μόνο μία φορά.

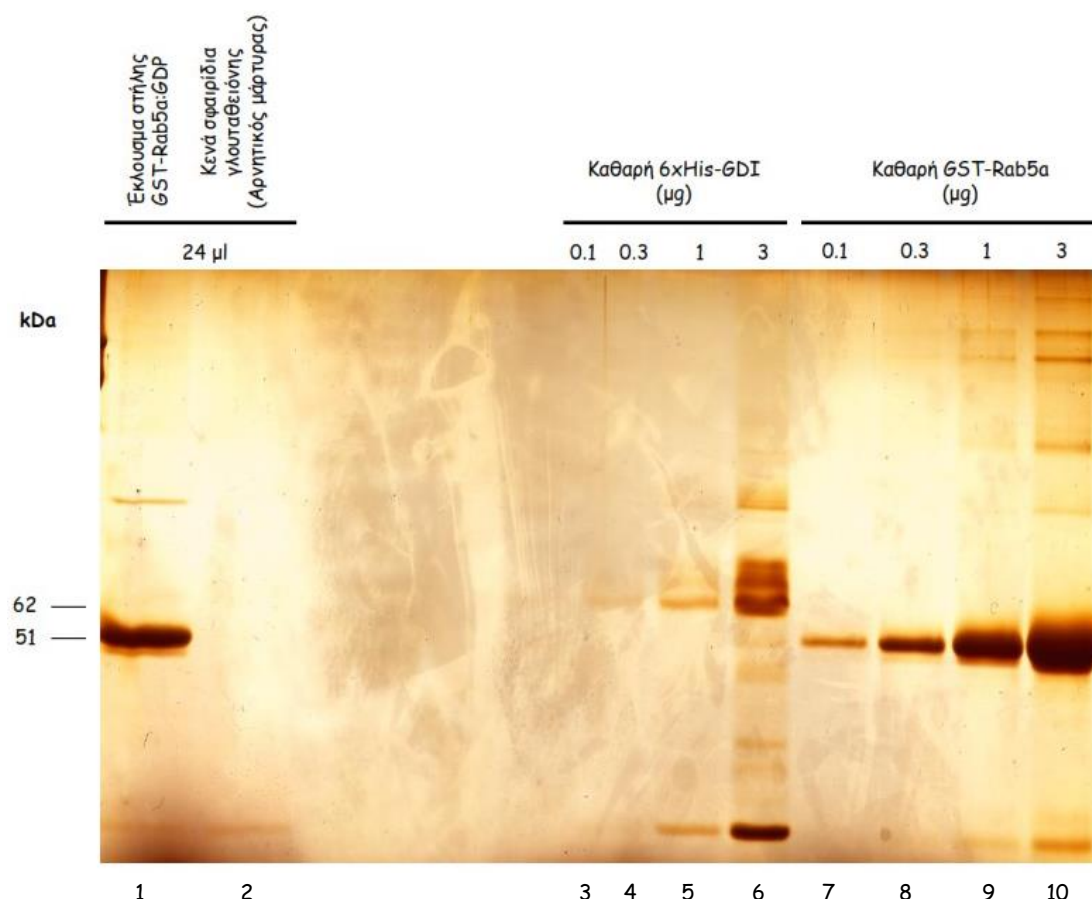
3.2.5 Η 6xHis–GDI δεν αλληλεπιδρά με την GST–Rab5a:GDP όταν εκφράζονται σε βακτηριακό σύστημα.

Στο κυτταρόπλασμα, η Rab5 στην GDP μορφή της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RabGDI (ή απλά GDI), η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της Rab5 στην

μεμβράνη του ενδοσώματος. Επίσης, η GDI προκαλεί απόσπαση της Rab5:GDP από την μεμβράνη, δημιουργώντας σύμπλοκο με την Rab5 στο κυτταρόπλασμα έως ότου ξεκινήσει ένας νέος κύκλος μεταφοράς της Rab5 σε επόμενη μεμβράνη-στόχο. Συνεπώς, δεδομένου ότι, παρόμοια με την GDI, η ACAT2 είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που συνδέεται με τη Rab5 στη GDP μορφή, τίθεται το ερώτημα αν η Rab5 αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με τη GDI και την ACAT2 (δημιουργώντας ένα τριμερές σύμπλοκο), ή αν υφίσταται ανταγωνισμός μεταξύ της ACAT2 και της GDI για σύνδεση με την Rab5:GDP. Για να διερευνηθούν τα δύο παραπάνω ενδεχόμενα έπρεπε προηγουμένως να παραχθεί η πρωτεΐνη 6xHis-GDI (βλ. ενότητα 2.1.5) και να ελεγχθεί η αλληλεπίδρασή της με την Rab5:GDP, όταν και οι δύο πρωτεΐνες παράγονται σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της 6xHis-GDI και της GST-Rab5a:GDP, ποσότητα της 6xHis-GDI προστέθηκε σε σφαιρίδια γλουταθειόνης τα οποία περιείχαν GST-Rab5a:GDP (βλ. ενότητα 2.7). Έπειτα, υλοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία της τεχνικής συγκατακρήμνισης. Το σύνολο του εκλουσμένου δείγματος φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και ακολούθησε χρώση πρώτα με Coomassie Brilliant Blue R-250 και, στη συνέχεια, με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver stain), για αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης. Να σημειωθεί ότι στα συγκεκριμένα πειράματα δεν χρησιμοποιήθηκε ποσότητα BSA για την μείωση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων, διότι έχει παρόμοιο μοριακό βάρος με την GDI (~62 kDa) και δεν θα ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των δύο ζωνών μετά την επεξεργασία με τον νιτρικό άργυρο. Ως δείγμα αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν «κενά» σφαιρίδια γλουταθειόνης, τα οποία επώαστηκαν με την ίδια ποσότητα 6xHis-GDI κάτω από τις ίδιες συνθήκες συγκριτικά με το υπό μελέτη δείγμα. Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.11, στο δείγμα με την GST-Rab5a:GDP δεν εμφανίζεται κάποια ζώνη που να αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της 6xHis-GDI (η έντονη ζώνη που φαίνεται στα 50 kDa αντιστοιχεί στην GST-Rab5 που διέρρευσε από τα σφαιρίδια (παρατηρείται πάντα στα πειράματα συγκατακρήμνισης, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης, όπως η χρώση με νιτρικό άργυρο). Η έλλειψη αλληλεπίδρασης της 6xHis-GDI με την Rab5 στο σύστημα αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι και οι δύο πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης (*E. coli* BL21DE3). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η GDI αναγνωρίζει τις πρενυλιωμένες μορφές των Rab πρωτεϊνών (βλ. ενότητα 1.3.1)

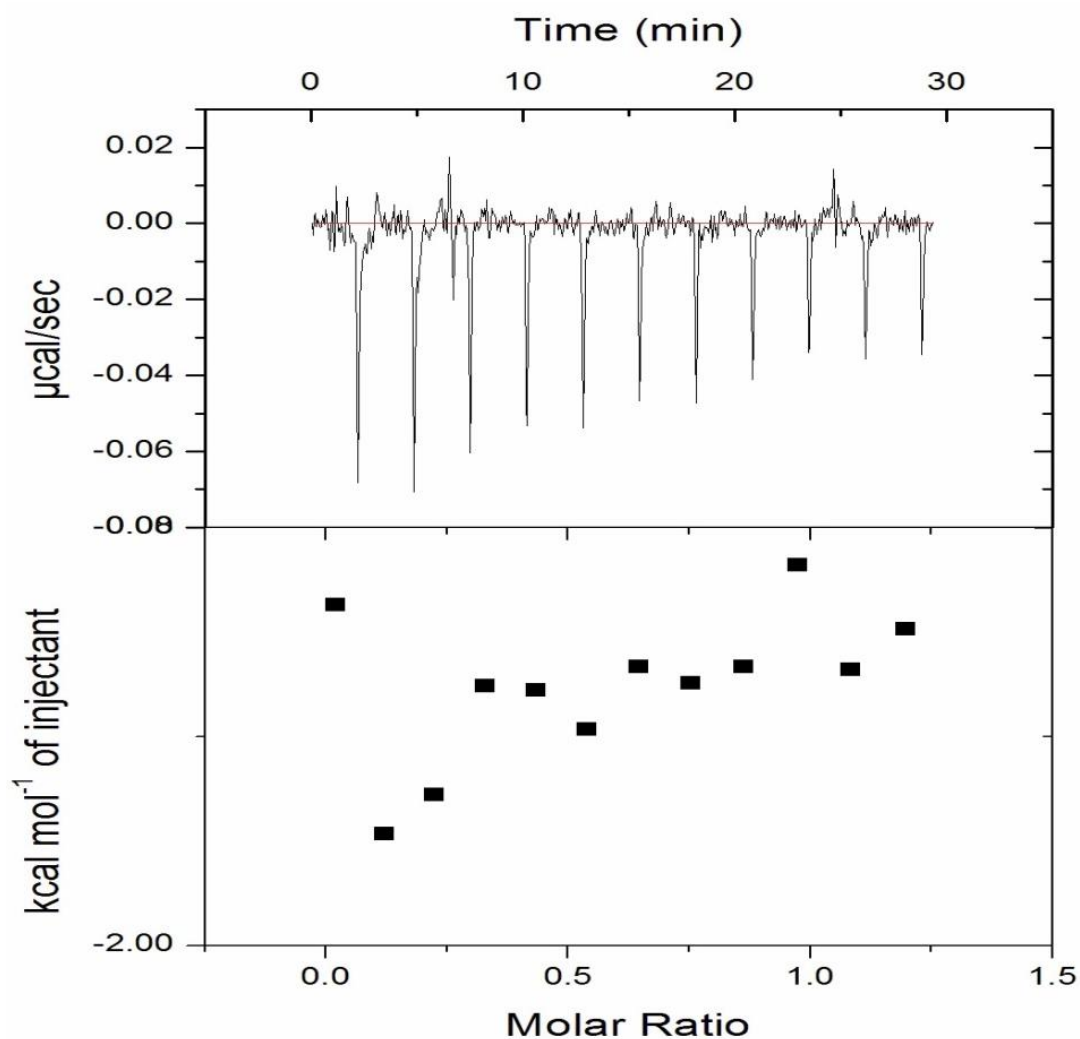
(Seabra M. C. & Wasmeier C., 2004; Seixas E. *et.al*, 2013). Συνεπώς, δεδομένου ότι τα βακτήρια δεν διαθέτουν τους απαραίτητους μηχανισμούς μετα-μεταφραστικής πρενυλίωσης, φαίνεται πως δεν είναι εφικτό να μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ Rab5 και GDI χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες που παράγονται σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης.



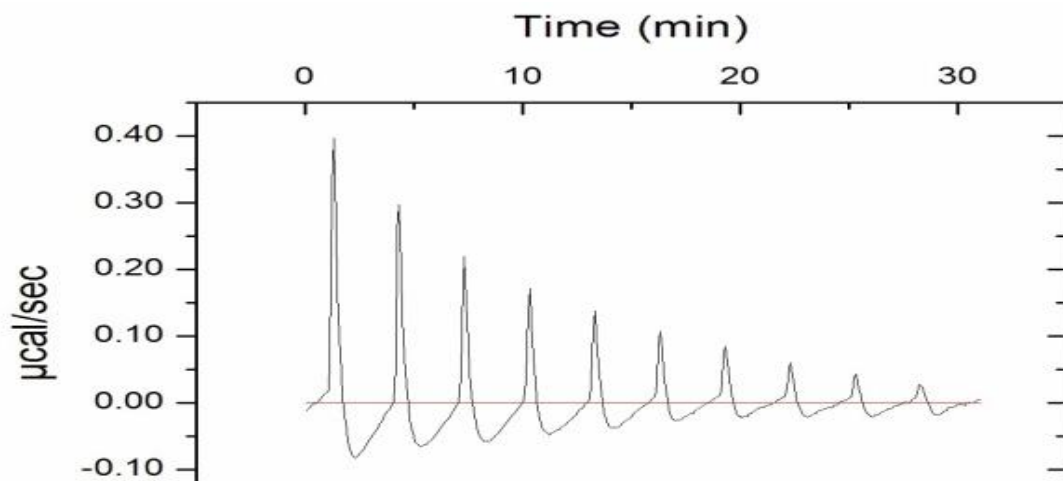
Εικ. 3.11: Η 6xHis-GDI δεν αλληλεπιδρά με την GST-Rab5a:GDP όταν οι δυο πρωτεΐνες εκφράζονται σε βακτήρια. Συνολική ποσότητα 1554 μg 6xHis-GDI προστέθηκε σε 30 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης που είχαν προσδεμένα 300 μg GST-Rab5a:GDP. Τα σφαιρίδια δεν επώαστηκαν με BSA για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων εξαιτίας του παρόμοιου μοριακού βάρους της με την 6xHis-GDI (62 kDa). Μετά την επώαση, ακολούθησαν πλύσεις και έκλυση με EDTA. Ολόκληρη η ποσότητα της εκλουόμενης 6xHis-GDI (~24 μl, **θέση 1**) φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12%, ακολούθησε χρώση με Coomassie και, κατόπιν, με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Silver stain). Δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα της 6xHis-GDI στο δείγμα που επώαστηκε με την GST-Rab5a:GDP, παρά μόνο μικρή ποσότητα GST-Rab5a:GDP (~3 μg), η οποία διέρρευσε από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Επιπλέον, ως δείγμα αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν «κενά» σφαιρίδια γλουταθειόνης, τα οποία επώαστηκαν με 1554 μg 6xHis-GDI και φορτώθηκαν ολόκληρη η ποσότητα του εκλουόμενου δείγματος (~24 μl, **θέση 2**). Τέλος φορτώθηκαν αυξανόμενες ποσότητες καθαρής 6xHis-GDI (**θέσεις 3-6**) καθώς και καθαρής GST-Rab5a (**θέσεις 7-10**) για ποιοτική σύγκριση.

3.3 Η αλληλεπίδραση μεταξύ της Rab5a:GDP και της ACAT2 είναι ασθενής και εξώθερμη

Προκειμένου να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 με μια βιοφυσική προσέγγιση και να υπολογιστούν οι θερμοδυναμικές ιδιότητες της αλληλεπίδρασης, οι δύο πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν σε μεγάλες ποσότητες, απομονώθηκαν, συμπυκνώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (βλ. ενότητα 2.8). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.12, ποσότητα της ACAT2 (26,4 μM) προστέθηκε στον θάλαμο των δειγμάτων, ενώ αντίστοιχη ποσότητα της Rab5a:GDP (264 μM) προστέθηκε στη σύριγγα τιτλοδότησης. Η προσθήκη της Rab5a:GDP στην ACAT2, στο πείραμα αυτό, οδηγεί στην εμφάνιση σήματος το οποίο είναι ενδεικτικό της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 3.12). Προκειμένου να ελεγχθεί η εξειδίκευση του σήματος που παρατηρήθηκε στην πειραματική διάταξη αυτή, πραγματοποιήθηκε θερμιδομετρική ανάλυση της προσθήκης GST-Rab5:GDP σε διάλυμα από το οποίο απουσιάζει η ACAT2 (το διάλυμα ήταν ίδιο με αυτό στο οποίο ήταν διαλυμένες οι GST-Rab5 και ACAT2). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.13, όταν η GST-Rab5a:GDP (960 μM , στη σύριγγα τιτλοδότησης) προστέθηκε σε διάλυμα αναφοράς προκλήθηκε ένα ενδόθερμο φαινόμενο διάχυσης (Εικ. 3.13), εντελώς αντίθετο από αυτό που προκλήθηκε από την προσθήκη της Rab5a:GDP στην ACAT2 (Εικ. 3.12). Η σταδιακή μείωση του μετρήσιμου σήματος στο παραπάνω πείραμα θερμιδομετρίας (Εικ. 3.13) οφείλεται στο γεγονός ότι με την πάροδο του χρόνου τα δύο διαλύματα (το ένα στη σύριγγα τιτλοδότησης και το άλλο στον θάλαμο αναφοράς) αποκτούν την ίδια σύσταση. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν, με μια ανεξάρτητη βιοφυσική μεθοδολογία, ότι η Rab5a:GDP αλληλεπιδρά με την ACAT2 σε συνθήκες *in vitro*. Ωστόσο, δεν ήταν εφικτός ο υπολογισμός της στοιχειομετρίας της αλληλεπίδρασης και της εντροπίας της, εξαιτίας του γεγονότος ότι στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν δεν επιτεύχθηκε κορεσμός σχηματισμού του συμπλόκου (η τεχνική βρίσκεται σε στάδιο βελτιστοποίησης). Παρά ταύτα, είναι σαφές ότι η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών είναι εξώθερμη, δηλαδή απελευθερώνεται ενέργεια υπό μορφή θερμότητας στο περιβάλλον κατά την πρόσδεση της ACAT2 επάνω στην Rab5a:GDP, και ότι πρόκειται για μία ασθενή αλληλεπίδραση, καθώς οι μεταβολές του μετρήσιμου σήματος μεταξύ των τιτλοδοτήσεων είναι σχετικά μικρές (Εικ. 3.12).



Εικ. 3.12: Η ασθενής αλληλεπίδραση της Rab5a:GDP με την ACAT2 είναι εξώθερμο φαινόμενο. Στα πειράματα της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης η ποσότητα της Rab5a:GDP (264 μM) τοποθετήθηκε στη σύριγγα και πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές τιτλοδοτήσεις (2 μl/τιτλοδότηση) στον θάλαμο των δειγμάτων, που περιείχε την ACAT2 (26,4 μM) σε θερμοκρασία 25°C, υπό συνεχή ανάδευση (1000 rpm). **(επάνω):** Μετρήσιμο σήμα (μcal/sec) της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5a:GDP και ACAT2. **(κάτω):** Μετατροπή του μετρήσιμου σήματος σε kcal/mol τιτλοδότη με σκοπό τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της αλληλεπίδρασης.



Εικ. 3.13: Η τιτλοδότηση της GST-Rab5a:GDP στο διαλύτη των δύο πρωτεϊνών δημιουργεί ένα ενδόθερμο φαινόμενο. Σε επόμενο πείραμα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης μία ποσότητα του διαλύτη των δύο πρωτεϊνών τοποθετήθηκε στον θάλαμο των δειγμάτων και, στη συνέχεια, τιτλοδοτήθηκε με 960 μM GST-Rab5a:GDP που βρισκόταν στην σύριγγα. Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη σε θερμοκρασία 25°C, υπό συνεχή ανάδευση (1000 rpm). Το σήμα μετρήθηκε σε $\mu\text{cal/sec}$. Παρατηρήθηκε πως το μοτίβο του σήματος αντιστοιχούσε σε ενδόθερμη αντίδραση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μικρή GTPάση Rab5, στην GTP μορφή της, αλληλεπιδρά με πάνω από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες, μέσω των οποίων ελέγχει σημαντικά στάδια του μονοπατιού της ενδοκυττάρωσης. Ωστόσο, είναι περιορισμένος ο αριθμός πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με την GDP μορφή της Rab5. Στις πρωτεΐνες αυτές συγκαταλέγονται οι πρωτεΐνες RabGDI (η οποία αλληλεπιδρά με όλες τις Rabs, στην GDP μορφή τους), και οι Rabex5 και Rin1, οι οποίες είναι GEFs της Rab5. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ανέδειξαν μια νέα πρωτεϊνική αλληλεπίδραση της Rab5GDP, την σύνδεσή της με το κυτταροπλασματικό ένζυμο ακετοακετυλο-CoA θειολάση (για συντομία, στην παρούσα μελέτη ονομάζεται ACAT2). Ωστόσο, επειδή τα πειράματα αυτά είχαν πραγματοποιηθεί με χρήση εκχυλίσματος από ιστό, δεν ήταν σαφές αν η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι απευθείας ή αν παρεμβάλλεται άλλη πρωτεΐνη στο σύμπλοκο μεταξύ Rab5 και ACAT2. Στην παρούσα μελέτη αποδείξαμε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ Rab5 και ACAT2 πραγματοποιείται ακόμη και όταν οι δύο πρωτεΐνες παρασκευάζονται και απομονώνονται από βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση μεταξύ Rab5 και ACAT2 είναι μια άμεση αλληλεπίδραση, δηλαδή δεν απαιτεί τη συμμετοχή άλλης ενδιάμεσης πρωτεΐνης. Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι το σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών διασπάται από το EDTA, έναν χηλικό παράγοντα που αφαιρεί τα ιόντα Mg^{2+} από την Rab5 και έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του GDP νουκλεοτιδίου. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η ACAT2 συνδέεται εξειδικευμένα με την GDP διαμόρφωση της Rab5.

Σε πειράματα συγκατακρήμνισης όπου μετρήθηκε με ακρίβεια η ποσότητα της ACAT2 που συνδέθηκε στη στήλη της GST-Rab5, προσδιορίστηκε πως η ποσότητα της ACAT2 που συνδέεται με την Rab5 κυμαίνεται μεταξύ 40 και 50% της συνολικής διαθέσιμης ποσότητας της ACAT2 (σημειώνεται ότι η GST-Rab5 βρίσκονταν σε περίσσεια σε σχέση με την ACAT2). Επιπλέον, η συγκριτική ανάλυση των διαδοχικών εκλουσμάτων (EDTA, γλουταθειόνη και SDS) με ανοσοαποτύπωση κατά Western απέδειξε πως το μεγαλύτερο ποσοστό της προσδεμένης ACAT2 (~99%) εκλούστηκε με EDTA, ενώ ποσοστό μικρότερο από 1% της συνολικής ποσότητας ACAT2 δημιούργησε μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις είτε με την GST-Rab5 (έκλουση με γλουταθειόνη) είτε με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (έκλουση με SDS).

Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν την αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση της σύνδεσης μεταξύ Rab5 και ACAT2.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε πιθανό ανταγωνισμό της ACAT2 και της 6xHis-GDI για τις θέσεις πρόσδεσης στην GST-Rab5a:GDP, καθώς και οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μόνο με την ανενεργή διαμόρφωση της Rab5. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα πειράματα συγκατακρήμνισης δεν κατέστησαν εφικτά, διότι η Rab5 απαιτείται να βρίσκεται στην πρενυλιωμένη μορφή της, για να αλληλεπιδράσει με την GDI (τα βακτήρια δεν διαθέτουν σύστημα της συγκεκριμένης μετα-μεταφραστικής τροποποίησης). Μελλοντικά πειράματα με χρήση πρενυλιωμένης Rab5 αναμένεται να δώσουν απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα.

Τα πρωταρχικά πειράματα θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη υποδεικνύουν πως η αλληλεπίδραση μεταξύ της Rab5:GDP και της ACAT2 είναι ασθενής και εξώθερμη. Η Rab5 αλληλεπιδρά με πλειάδα άλλων πρωτεϊνών, ακολουθώντας ένα διαρκή κύκλο μεταξύ της GDP και της GTP μορφής της. Συνεπώς, η Rab5 πραγματοποιεί πολύπλοκα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μικρής χρονικής διάρκειας, ώστε να είναι εφικτός ο συνεχής κύκλος εναλλαγών μεταξύ της GTP και GTP διαμόρφωσης. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις διαχωρίζονται σε εξώθερμες και ενδόθερμες, γεγονός που έχει αντίκτυπο στη λειτουργία τους. Η αλληλεπίδραση μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2, που πραγματεύεται η παρούσα διπλωματική εργασία, φαίνεται να ανήκει στις εξώθερμες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες κατέχουν την πλειοψηφία των συνολικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Επιπλέον, οι ασθενείς δεσμοί που διέπουν την αλληλεπίδραση έχουν ουσιώδη σημασία αναφορικά με τον βιολογικό ρόλο της ACAT2 στα πρώιμα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης (βλ. παρακάτω). Η ασθενής σύνδεση μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 είναι πιθανό να έχει ρυθμοκαθοριστικό ρόλο στα πρώιμα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης, όπου η ACAT2 πιθανά ρυθμίζει την λειτουργία της κύριας πρωτεΐνης-ρυθμιστή των παραπάνω γεγονότων (Rab5), ελέγχοντας έτσι έμμεσα τη διάρκεια των πρώιμων γεγονότων της ενδοκυττάρωσης. Ωστόσο, η μεθοδολογία της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 βρίσκεται ακόμη σε στάδιο βελτιστοποίησης, οπότε, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα προκειμένου να προσδιορισθούν οι θερμοδυναμικές ιδιότητες και η

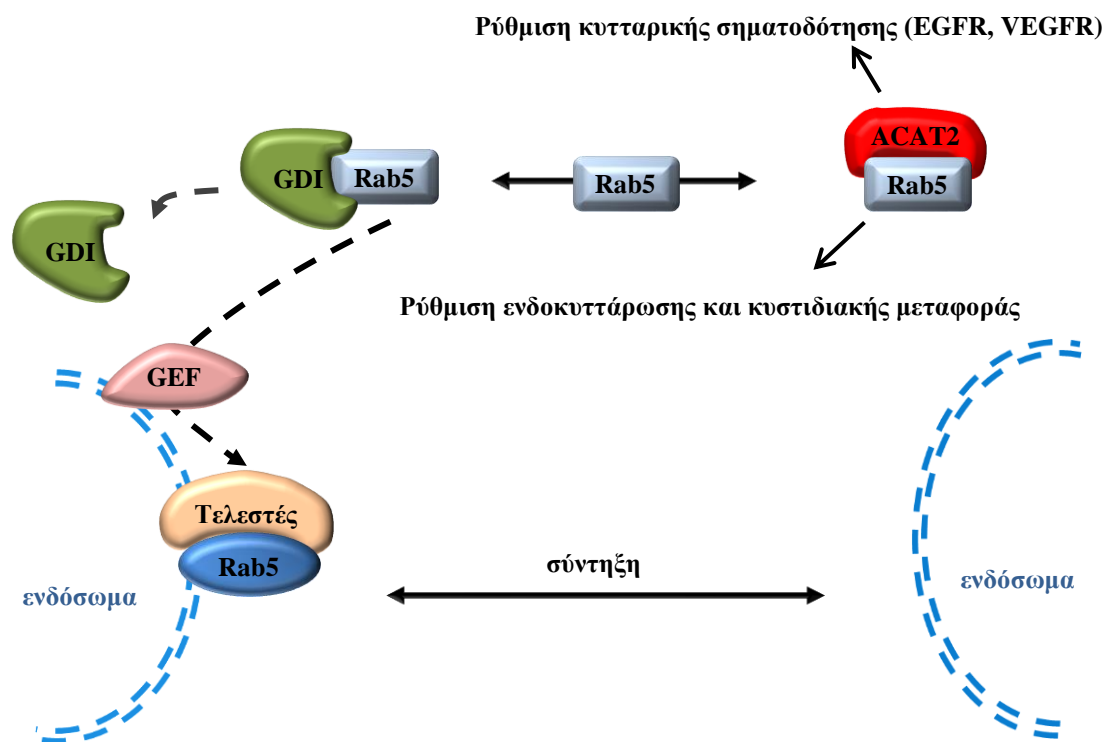
στοιχειομετρία της αλληλεπίδρασης καθώς και οι σταθερές σχηματισμού (K_a) και αποδέσμευσης (K_d) του συμπλόκου.

4.1 Πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 στα πρώιμα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης

Η ανενεργή μορφή της Rab5 (Rab5:GDP) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη GDI, η οποία έχει διττό ρόλο. Αρχικά, η GDI αλληλεπιδρά με την πρενυλιωμένη Rab5:GDP και την εξάγει από την μεμβράνη σύντηξης, αφού εκείνη έχει ολοκληρώσει τον κύκλο λειτουργίας της. Στη συνέχεια, βοηθάει στην μεταφορά της Rab5:GDP στην επόμενη μεμβράνη-στόχο, διαμέσου του κυτταροπλάσματος. Ο κύκλος της GDI ολοκληρώνεται με την ενσωμάτωση της πρενυλιωμένης Rab5:GDP στην καινούργια μεμβράνη-στόχο (Pfeffer S. R., *et.al.*, 1995; Dransart E., *et.al.*, 2005; Dovas A. and Couchman J. R., 2005). Στον παραπάνω κύκλο, η ACAT2 θα μπορούσε να ανταγωνίζεται τη σύνδεση μεταξύ Rab5:GDP και GDI. Εναλλακτικά, θα μπορούσε η ACAT2 να συνδέεται στην Rab5GDP παράλληλα με την GDI, δημιουργώντας ένα τριμερές σύμπλοκο ACAT2–Rab5:GDP–GDI με νέο λειτουργικό ρόλο. Συμπερασματικά, η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή Rab5:GDP, η οποία συμμετέχει στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων κατά τα πρώιμα γεγονότα της ενδοκυττάρωσης. Με αυτόν τον τρόπο η ACAT2, ένα ένζυμο των πρώτων σταδίων βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέος με άμεσο ρόλο στα γεγονότα του μεταβολισμού, είναι πιθανό να συμμετέχει ταυτόχρονα, έμμεσα, στη ρύθμιση γεγονότων ενδοκυττάρωσης και κυστιδιακής μεταφοράς. Στην περίπτωση αυτή, η ACAT2 πιθανά συνδέει τα μονοπάτια του μεταβολισμού της χοληστερόλης με την ενδοκυττάρωση.

Πρόσφατα *in vitro* πειράματα του εργαστηρίου απέδειξαν ότι η ACAT2 προκαλεί αναστολή της σύντηξης των ενδοσωμάτων. Είναι πιθανό η δράση αυτή της ACAT2 να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της με την Rab5, εμποδίζοντας έτσι την συμμετοχή της Rab5 στην διαδικασία της μεμβρανικής σύντηξης. Επιπλέον, σύμφωνα με αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου, η ACAT2 καθυστερεί την αποικοδόμηση τόσο του EGFR όσο και του VEGFR2. Οι παραπάνω μελέτες καθώς και τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας υποδεικνύουν μία νέα λειτουργία της κυτταροπλασματικής ACAT2 εκτός του πρωτεύοντα ρόλου που κατέχει στον μεταβολισμό. Η κύρια υπόθεση αναφορικά με τον βιολογικό ρόλο της ACAT2 διαμέσου της αλληλεπίδρασής της με την Rab5:GDP είναι η εξής και

παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 4.1: Η κυτταροπλασματική ACAT2 αποδείχθηκε ότι αλληλεπιδρά με την ανενεργή μορφή της Rab5:GDP, σταθεροποιώντας την στην ανενεργή στερεοδιαμόρφωση αποτρέποντάς την να επιτελέσει τις λειτουργίες της με αποτέλεσμα, πιθανά, να μειώνεται ο ρυθμός της ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης των υποδοχέων EGFR και VEGFR2, επηρεάζοντας έτσι την σηματοδότησή τους.



Εικ. 4.1: Υποθετικό μοντέλο για την βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ ACAT2 και Rab5.

Η σύνδεση της Rab5 με την GDI οδηγεί την Rab5 στην μεμβράνη του ενδοσώματος, όπου συμβαίνει ενεργοποίηση της Rab5 (μετατροπή στην GTP μορφή). Η ενεργός μορφή της Rab5 αλληλεπιδρά με μόρια τελεστής, οδηγώντας σε σύντηξη των ενδοσωμάτων. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την μεταφορά πρωτεϊνικού φορτίου (όπως EGFR) στα ενδοσώματα και λυσοσώματα. Η σύνδεση της ACAT2 στην Rab5 πιθανά ανταγωνίζεται τη σύνδεση της Rab5 με την GDI, αναστέλλοντας έτσι την μεταφορά της Rab5 στην μεμβράνη του ενδοσώματος. Κατά συνέπεια, μέσω σύνδεσής της με την Rab5, είναι πιθανό η ACAT2 να ελέγχει την μεταφορά πρωτεϊνικού φορτίου στο ενδόσωμα.

Πρόσφατα αδημοσίευτα αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας του εργαστηρίου απέδειξαν ότι η ACAT2 ακετυλιώνει την Rab5:GDP σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης *in vitro* (διδασκτορική εργασία Γαλανοπούλου Αικατερίνης). Όπως είναι

ευρέως γνωστό, η ακετυλίωση αποτελεί μία αναστρέψιμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών, η οποία, συνήθως, λαμβάνει χώρα στα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ακετυλιωμένης πρωτεΐνης με λειτουργικό ρόλο αποτελεί η τουμπουλίνη του δικτύου των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού. Διαφορετικές μελέτες απέδειξαν ότι οι ακετυλιωμένοι μικροσωληνίσκοι παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αξονική μεταφορά των νευρώνων (Hammond W. J., *et.al.*, 2010) καθώς και σε δυναμικά φαινόμενα διολίσθησης ολόκληρου του ενδοπλασματικού δικτύου με σκοπό την διεπικοινωνία του με άλλα οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια και τα ενδοσώματα (Friedman R. J., *et.al.*, 2010). Επιπλέον, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως η ακετυλίωση στο N-τελικό άκρο των μικρών GTPασών τις στοχεύει για πρόσδεση στις μεμβράνες (Jackson Catherine L., 2004). Αν και η σημασία της ακετυλίωσης της Rab5:GDP από την ACAT2 δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη, μια πιθανότητα είναι η ακετυλιωμένη Rab5:GDP να σταθεροποιείται περαιτέρω στην ανενεργή της μορφή, ή/και τα ακετυλιωμένα πρωτεϊνικά μόρια Rab5:GDP να εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τους τελεστές τους συγκριτικά με τα απακετυλιωμένα μόρια.

4.2 Πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 στον μεταβολισμό, ή σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθώς και παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου (αδημοσίευτα αποτελέσματα από Christoforidis Savvas) αποδεικνύεται πως η ACAT2, ένα κεντρικό ένζυμο του μεταβολισμού, αλληλεπιδρά με την Rab5, την κύρια πρωτεΐνη ρυθμοκαθοριστή των πρώιμων γεγονότων της ενδοκυττάρωσης. Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή διαμόρφωση της GTPάσης που εξαρτάται από το GDP νουκλεοτίδιο. Επομένως, πέρα από τον ρόλο της στον μεταβολισμό, η ACAT2 φαίνεται να κατέχει και έναν ακόμη λειτουργικό ρόλο, όπως είναι η ενδοκυττάρωση. Συνεπώς, συγκαταλέγεται στις λεγόμενες «moonlighting proteins», ένας όρος που αποδίδεται σε πρωτεΐνες που επιτελούν περισσότερες από μία λειτουργίες μέσα στο κύτταρο (Ribeiro DM, *et al.* 2018, *Nucleic Acids Res.* 2018 Oct 29. doi: 10.1093/nar/gky1039, <http://moonlightingproteins.org>). Ο αριθμός των «moonlighting» πρωτεϊνών συνεχώς αυξάνεται καθώς ανακαλύπτονται καινούργιες λειτουργίες των πρωτεϊνών, εντελώς διαφορετικές από εκείνες με τις οποίες είναι καταχωρημένες. Δύο χαρακτηριστικά

παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό είναι: η ακονιτάση και η κινάση ERK2. Η ακονιτάση πρόκειται για ένα μεταβολικό ένζυμο που κωδικοποιείται σε δύο ισομορφές: το μιτοχondριακό ένζυμο και το κυτταροπλασματικό ένζυμο. Το κυτταροπλασματικό «moonlighting» ένζυμο έχει δύο διακριτές λειτουργίες, μία στον μεταβολισμό (μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε κιτρικό οξύ στον κύκλο του κιτρικού οξέος) και μία στην ομοιόσταση του σιδήρου ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων τα οποία περιέχουν στοιχεία απόκρισης στον σίδηρο (IRE) στα mRNA τους (Philpott C. C., *et al.* 1994). Από την άλλη, η ERK2 ανήκει στην κατηγορία των MAP κινασών, οι οποίες φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες στον καταρράκτη των σηματοδοτικών γεγονότων. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η ERK2, εκτός από τον ήδη γνωστό λειτουργικό της ρόλο ως κινάση, λειτουργεί και ως μεταγραφικός ρυθμιστής και πιο συγκεκριμένα ως παράγοντας αποσιώπησης της μεταγραφής (repressor) των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση της ιντερφερόνης- γ (Hu S., *et al.* 2009). Παρατηρεί κανείς, λοιπόν, ότι πολλές πρωτεΐνες του κυττάρου συμμετέχουν σε παραπάνω από μία διαδικασίες και πολλές φορές ακόμη με νέους λειτουργικούς ρόλους.

Στην προηγούμενη ενότητα παρουσιάστηκε ένα υποθετικό μοντέλο για την βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5:GDP και ACAT2 στην ενδοκυττάρωση. Ωστόσο, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση να έχει ρόλο στον μεταβολισμό (από την οπτική γωνία της ACAT2). Αρχικά, η αλληλεπίδραση Rab5-ACAT2 μπορεί να επηρεάσει άμεσα την ποσότητα του διαθέσιμου, ελεύθερου ενζύμου ACAT2 για την συμμετοχή του στα γεγονότα του μεταβολισμού και, πιο συγκεκριμένα, στην κατάλυση της αντίδρασης που αναφέρθηκε στην «Εισαγωγή» (ενότητα 1.4) επηρεάζοντας τα επίπεδα του ακετυλο-CoA, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ισορροπία της αντίδρασης. Επιπλέον, ένα ενδιαφέρον ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι το πώς η αλληλεπίδραση επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της ACAT2. Αναμένεται σε μελλοντικά πειράματα να αποσαφηνιστεί αν η ενζυμική δραστηριότητα της ACAT2 μετά την αλληλεπίδραση με την Rab5:GDP μειώνεται ή παραμένει σταθερή σε φυσιολογικές συνθήκες. Ύστερα, λαμβάνοντας υπόψη το ενεργειακό προφίλ του κυττάρου, είναι γνωστό ότι η υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση GTP αντικατοπτρίζει μία κατάσταση υψηλής ενέργειας, ενώ τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου είναι χαμηλά όταν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση

GDP. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δηλαδή ότι η ACAT2 αλληλεπιδρά με την Rab5 στην διαμόρφωση που εξαρτάται ειδικά από το GDP νουκλεοτίδιο, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αλληλεπίδραση μπορεί να συνδέεται, με άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό, με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου. Τέλος, υπάρχει πιθανότητα κατά την αλληλεπίδραση με την Rab5:GDP η ACAT2 να μεταβάλλει τη δομή της στο χώρο και να μην λειτουργεί πλέον ως ένζυμο του μεταβολισμού, αλλά να επιτελεί ξεχωριστές, άγνωστες μέχρι σήμερα λειτουργίες («moonlighting» πρωτεΐνη).

4.3 Μελλοντικές προοπτικές

Επόμενα πειράματα πρόκειται να βελτιστοποιήσουν τις συνθήκες της θερμομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ACAT2 και Rab5a:GDP. Τα πειράματα αυτά θα οδηγήσουν στον ακριβή προσδιορισμό των θερμοδυναμικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων της αλληλεπίδρασης, καθώς και την ισχύ και στοιχειομετρία της. Επίσης, σε μελλοντικές μελέτες θα αποσαφηνιστεί ο πιθανός ανταγωνιστικός ρόλος της ACAT2 στην αλληλεπίδραση μεταξύ Rab5:GDP και GDI. Τα πειράματα αυτά θα βοηθήσουν στην κατανόηση της σημασίας της σύνδεσης της ACAT2 με την Rab5:GDP στα μονοπάτια της ενδοκυττάρωσης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B. *et al.* *Essential Cell Biology: 2nd edition*. 633-636, 647-652 (2006).
- Alberts B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell: 6th edition*. 695-710, 730-741 (2015).
- Alejandro Barbieri, M. *et al.* Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* **273**, 25850–25855 (1998).
- Antonenkov, V. D., Croes, K., Waelkens, E., Van Veldhoven, P. P. & Mannaerts, G. P. Identification, purification and characterization of an acetoacetyl-CoA thiolase from rat liver peroxisomes. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2981–2990 (2000).
- Apodaca, G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**, 149–159 (2001).
- Barbieri, M. A., Li, G., Mayorga, L. S. & Stahl, P. D. Characterization of Rab5: Q79L-Stimulated Endosome. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 64–72 (1996).
- Bennett, M. J., Hosking, G. P., Smith, M. F., Gray, R. G. F. & Middleton, B. Biochemical investigations on a patient with a defect in cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase, associated with mental retardation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **7**, 125–128 (1984).
- Bernards, A. & Settleman, J. GAP control: Regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* **14**, 377–385 (2004).
- Bucci, C. *et al.* Co-operative regulation of endocytosis by three RAB5 isoforms. *FEBS Lett.* **366**, 65–71 (1995).
- Bucci, C. *et al.* The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715–728 (1992).
- Casey, P. J. & Seabra, M. C. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **271**, 5289–5292 (1996).
- Caswell, P. & Norman, J. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends Cell Biol.* **18**, 257–263 (2008).
- Caswell, P. T. & Norman, J. C. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic* **7**, 14–21 (2006).

- Caswell, P. T. *et al.* Rab25 Associates with $\alpha 5\beta 1$ Integrin to Promote Invasive Migration in 3D Microenvironments. *Dev. Cell* **13**, 496–510 (2007).
- Chang, T., Li, B., Chang, C. C. Y. & Urano, Y. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, 1–9 (2009).
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. & Zerial, M. Localization of Low-Molecular-Weight Gtp Binding-Proteins to Exocytic and Endocytic Compartments. *Cell* **62**, 317–329 (1990).
- Cheng, K. W. *et al.* The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat. Med.* **10**, 1251–1256 (2004).
- Christoforidis, S. & Zerial, M. Purification and identification of novel rab effectors using affinity chromatography. *Methods* **20**, 403–410 (2000).
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. & Zerial, M. The rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621–625 (1999).
- Clinkenbeard K. D., Sugiyama T., Moss J., Reed W. D., L. M. D. Molecular and Catalytic Properties of Cytosolic Acetoacetyl Coenzyme A Thiolase from Avian Liver*. *J. Biol. Chem.* **248**, 2275–2284 (1973).
- Colaluca, I. N. *et al.* NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature* **451**, 76–80 (2008).
- Cooper G. M. & Hausman R. E. *To Κύτταρο: 1^η έκδοση (ελληνική)*. 613-626, 824-837 (2011).
- Deinhardt, K. *et al.* Rab5 and Rab7 Control Endocytic Sorting along the Axonal Retrograde Transport Pathway. *Neuron* **52**, 293–305 (2006).
- Dovas, A. & Couchman, J. R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* **390**, 1–9 (2005).
- Dransart, E., Olofsson, B. & Cherfils, J. RhoGDIs revisited: Novel roles in Rho regulation. *Traffic* **6**, 957–966 (2005).
- Falk, J., Konopacki, F. A., Zivraj, K. H. & Holt, C. E. Rab5 and Rab4 Regulate Axon Elongation in the Xenopus Visual System. *J. Neurosci.* **34**, 373–391 (2014).
- Feliciano, W. D., Yoshida, S., Straight, S. W. & Swanson, J. A. Coordination of the Rab5 Cycle on Macropinosomes. *Traffic* **12**, 1911–1922 (2011).

- Freire, E. & Leavitt, S. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 560–566 (2001).
- Freyer, M. W. & Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **84**, 79–113 (2008).
- Friedman, J. R., Webster, B. M., Mastronarde, D. N., Verhey, K. J. & Voeltz, G. K. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**, 363–375 (2010).
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430 (1990).
- Greenspan, M. D. *et al.* The inhibition of cytoplasmic acetoacetyl-CoA thiolase by a triyne carbonate (L-660,631). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 548–553 (1989).
- Hu S. *et al.* Profiling the Human Protein-DNA Interactome Reveals ERK2 as a Transcriptional Repressor of Interferon Signaling. *Cell* **139**, 610–622 (2009).
- Igual, J. C., González-Bosch, C., Dopazo, J. & Pérez-Ortín, J. E. Phylogenetic analysis of the thiolase family. Implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *J. Mol. Evol.* **35**, 147–155 (1992).
- Jackson, C. L. N-terminal acetylation targets GTPases to membranes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 379–380 (2004).
- Jones, M. C., Caswell, P. T. & Norman, J. C. Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 549–557 (2006).
- Kim, S. *et al.* Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- β CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **21**, 707–716 (2016).
- Kursula, P., Sikkilä, H., Fukao, T., Kondo, N. & Wierenga, R. K. High resolution crystal structures of human cytosolic thiolase (CT): A comparison of the active sites of human CT, bacterial thiolase, and bacterial KAS I. *J. Mol. Biol.* **347**, 189–201 (2005).
- Li, F. *et al.* The role of the hypervariable C-terminal domain in Rab GTPases membrane targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2572–2577 (2014).

- Li, G. & Stahl, P. D. Structure-Function Relationship of the Small GTPase rab5*. *J. Biol. Chem.* **268**, 24475–24480 (1993).
- Li, G., Barbieri, M. A., Colombo, M. I. & Stahl, P. D. Structural features of the GTP-binding defective Rab5 mutants required for their inhibitory activity on endocytosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 14631–14635 (1994).
- Lodish H. *et al.* *Molecular Cell Biology: 5th edition*. 701-718 (2003).
- Masuno, M. *et al.* Assignment of the Human Cytosolic Acetoacetyl-Coenzyme A Thiolase (ACAT2) Gene to Chromosome Assignment of the Human GRB14 Gene to Chromosome 2q22 – q24 by Fluorescence in Situ Hybridization. *Genomics* **0452**, 217–218 (1996).
- Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612 (2007).
- Mingazov, E. R. & Ugrumov, M. V. Gene expression of proteins of the vesicle cycle in dopaminergic neurons in modeling of Parkinson's disease. *Dokl. Biochem. Biophys.* **468**, 459–461 (2016).
- Modis, Y. & Wierenga, R. K. Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *J. Mol. Biol.* **297**, 1171–1182 (2000).
- Ohshiro, T. & Tomoda, H. Acyltransferase inhibitors: a patent review (2010–present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 145–158 (2015).
- Ohshiro, T. & Tomoda, H. Isoform-specific inhibitors of ACATs: Recent advances and promising developments. *Future Med. Chem.* **3**, 2039–2061 (2011).
- Palamidessi, A. *et al.* Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration. *Cell* **134**, 135–147 (2008).
- Pfeffer, S. R. Structural clues to rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.* **280**, 15485–15488 (2005).
- Pfeffer, S. R., Dirac-Svejstrup, A. B. & Soldati, T. Rab GDP dissociation inhibitor: Putting Rab GTPases in the right place. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 17057–17059 (1995).
- Philpott C. C. *et al.* The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: The role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7321-7325 (1994).

- Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein – Protein Interactions. *Methods* **19**, 213–221 (1999).
- Ribeiro DM, Briere G, Bely B, Spinelli L, Brun C., MoonDB 2.0: an updated database of extreme multifunctional and moonlighting proteins. *Nucleic Acids Res.* (2018).
- Rogers, S. L. & Gelfand, V. I. Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 57–62 (2000).
- Rossi, D. J., Jamieson, C. H. M. & Weissman, I. L. Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell* **132**, 681–696 (2008).
- Royle, S. J., Bright, N. A. & Lagnado, L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* **434**, 1152–1157 (2005).
- Rybin, V. *et al.* GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266–269 (1996).
- Salam, W. & Bloxham, D. Hypolipidemic effect of polymethylenemethane thiosulfonates: inhibitors of acetoacetyl coenzyme A thiolase. *J. Pharmacol. Exp.* **241**, 1099–1105 (1987).
- Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: Turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587–1609 (2002).
- Seabra M. C. Biochemistry of Rab Geranylgeranyltransferase. *Enzym.* **XXI**, 131–154 (2000).
- Seabra, M. C. & Wasmeier, C. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 451–457 (2004).
- Seixas, E., Barros, M., Seabra, M. C. & Barral, D. C. Rab and Arf proteins in genetic diseases. *Traffic* **14**, 871–885 (2013).
- Shin, D. *et al.* Site-specific monoubiquitination downregulates Rab5 by disrupting effector binding and guanine nucleotide conversion. *Elife* **6**, 1–26 (2017).
- Song X. -Q. *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of complementary DNA for human hepatic cytosolic acetoacetyl-coenzyme A thiolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**, 478–485 (1994).
- Sorkin, A. & Von Zastrow, M. Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 609–622 (2009).

- Stenmark, H. *et al.* Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *EMBO J.* **13**, 575–583 (1994).
- Stenmark, H. *et al.* Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* **13**, 1287–96 (1994).
- Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 513–525 (2009).
- Thompson, H. M., Cao H., Chen J., Euteneuer U., McNiven M. A. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 335-42 (2004).
- Thompson, H. M., Skop, A. R., Euteneuer, U., Meyer, B. J. & McNiven, M. A. The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr. Biol.* **12**, 2111–2117 (2002).
- Van der Bliek, A. M. A sixth sense for Rab5. *Nat. Cell Biol.* **7**, 548–550 (2005).
- Wang, S. S. *et al.* Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent’s disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2937–2945 (2000).
- Wu, F. & Yao, P. J. Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer’s disease: An update. *Ageing Res. Rev.* **8**, 147–149 (2009).
- Xu, W., Fang, F., Ding, J. & Wu, C. Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer’s disease. *Traffic* **19**, 253–262 (2018).
- Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. & Tavitian, A. The human rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *J. Biol. Chem.* **264**, 12394–12401 (1989).
- Zeigerer, A. *et al.* Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* **485**, 465–470 (2012).
- Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organisers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
- Θωμόπουλος Γ. Ν. *Ειδικά θέματα βιολογίας κυττάρου: Ρυθμιστικοί μηχανισμοί κυτταρικής λειτουργίας.* 313-325 (2006).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά την περάτωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών στα Ιωάννινα, οι οποίες ολοκληρώθηκαν με την παραπάνω διπλωματική διατριβή, θεωρώ σημαντικό να αναγνωρίσω το έργο ορισμένων ανθρώπων και να τους ευχαριστήσω που με βοήθησαν να αποκτήσω τα απαραίτητα εφόδια για την συνέχεια της επαγγελματικής μου καριέρας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Χριστοφορίδη Σάββα που με επέλεξε να εργαστώ δίπλα στην ερευνητική του ομάδα και βοήθησε ανελλιπώς να πραγματοποιηθούν οι στόχοι που τέθηκαν εξ' αρχής. Ωστόσο, εκτός από την πολύτιμη βοήθειά του στα πλαίσια της διπλωματικής ερευνητικής εργασίας μου, ο κύριος Χριστοφορίδης στάθηκε δίπλα μου δίνοντας προσωπικές συμβουλές και λύσεις σε πολλά προβλήματα και ανησυχίες που μου προέκυψαν κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Κατόπιν, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Γαλανοπούλου Αικατερίνη, με την οποία συνεργαστήκαμε κατά το πλείστον με σκοπό την ολοκλήρωση των απαραίτητων πειραμάτων. Οι συμβουλές και καινοτόμες ιδέες της συνέβαλλαν στην προσαρμογή μου στην ερευνητική ομάδα καθώς και στην απόκτηση εργαστηριακής εμπειρίας ενός χρόνου, γεγονός που αποτελεί σημαντικό εφόδιο για τη συνέχεια της καριέρας μου. Επίσης, δεν ξεχνώ και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Χριστοφορίδη, την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα για την πολύτιμη βοήθειά της με όλες τις εργαστηριακές τεχνικές καθώς και την Βάλια Καραμάνη, την Δέσποινα Γκέκα και την Ευαγγελία Γούλα για την εξαιρετική και εποικοδομητική μας συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Χατζηαθανασιάδου από το εργαστήριο του κ. Τζάκου Ανδρέα για τη διεξαγωγή των απαραίτητων πειραμάτων θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης.

Ύστερα, θα ήθελα να επισημάνω το φιλικό εργασιακό κλίμα και την εξαιρετική συνεργασία με τα υπόλοιπα μέλη του Τμήματος Βιοϊατρικής έρευνας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές που συμμετείχαν στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία» για το υψηλό επίπεδο σπουδών που μου παρείχαν. Τέλος, θα ήθελα να κάνω προσωπική αναφορά στους συμφοιτητές του μεταπτυχιακού και

πιο συγκεκριμένα: στην Μαρία Μαυρομάτη, στην Ειρήνη Λάππα, στην Βανέσα Παπασταύρου, στην Μαρία Κλημοπούλου, στον Γιώργο Ορφανάκη και στον Παντελή Παπαθανασίου με τους οποίους μοιραστήκαμε ανεκτίμητες στιγμές κατά τη διάρκεια των δύο αυτών χρόνων. Ήταν μία αξέχαστη εμπειρία που σας γνώρισα.