



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΩΡΟΧΡΟΝΙΚΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΩΝ RabGTPασων ΣΤΗ
ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΓΚΕΚΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΩΡΟΧΡΟΝΙΚΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΩΝ RabGTPασων ΣΤΗ
ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΓΚΕΚΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γκέκα Δέσποινας: 15-1-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 759^α/14-2-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Χριστοφορίδης Σάββας, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Carol Murphy, ερευνήτρια Β' ΙΒΕ-ΙΤΕ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-3-2014

«Μελέτη της χωροχρονικής οργάνωσης των RabGTPασών στη ρυθμιζόμενη έκκριση στα ενδοθυλιακά κύτταρα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 867^α/25-9-2018

Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μιχαηλίδης Θεολόγος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεονταρίτης Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Murphy Carol	Ερευνήτρια Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)
Fachelmayer Frank,	Ερευνητής Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-1-2019

Ιωάννινα 6-2-2019

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο Φεβρουάριος 2014-Ιανουάριος 2019 στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) του τμήματος Βιοϊατρικών Ερευνών στα Ιωάννινα, καθώς και στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην ερευνητική του ομάδα, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του όλα αυτά τα χρόνια. Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε μέσω των ερευνητικών προγραμμάτων ARISTEIA II, IKY και ΕΔΒΜ34.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Θ. Φώτση και την Ερευνήτρια Β' κ. C. Murphy, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Κούκλη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Λεονταρίτη, τον Ερευνητή Β' κ. F. Fackelmayer και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θ. Μιχαηλίδη για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες τα μέλη του εργαστηρίου μου, Σοφία Ζωγράφου, Λαζάνη Βασιλική, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, Ευαγγελία Γούλα, Κατερίνα Γαλανοπούλου και Καραμάνη Βάλια καθώς και όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών και της Βιολογικής Χημείας.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς μου, τους γονείς μου, τα αδέρφια μου και τους φίλους μου για τη συνεχή συμπαράσταση, αγάπη και κατανόηση σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Ενδοθήλιο	7
1.1.1 Λειτουργίες του ενδοθηλίου	8
1.1.2 Δυσλειτουργίες του ενδοθηλίου	10
1.2 Weibel Palade Bodies (WPBs).....	11
1.2.1 Κυρίαρχο φορτίο των WPBs ο παράγοντας von Willebrand (vWF)	13
1.2.2 Βιογένεση και ωρίμανση των WPBs.....	17
1.2.3 Ενεργοποιητές της έκκρισης των WPBs	21
1.3 Μοριακός μηχανισμός και σκοπός της κυστιδιακής μεταφοράς	22
1.4 RabGTPάσες	24
1.4.1 RabGTPάσες, κατάταξη και δομή	24
1.4.2 Ανακύκλωση των Rab πρωτεϊνών μεταξύ μεμβρανικών διαμερισμάτων.....	26
1.4.3 Ο ρόλος των Rabs στην κυστιδιακή μεταφορά	28
1.4.4 Οι Rabs ως οριστές της ταυτότητας των μεμβρανικών διαμερισμάτων	30
1.4.5 Πιθανοί μηχανισμοί ενορχηστρωμένης στόχευσης διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο	32
1.4.6 Οι Rabs των εκκριτικών κυστιδίων	34
1.5 Μηχανισμοί έκκρισης των WPBs	36
1.6 Σκοπός της εργασίας	38
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1 Υλικά.....	39
2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας και χειρισμού κυττάρων	40
2.2.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου.....	40
2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων	40
2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA ή siRNAs	41
2.2.4 Ενεργοποίηση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων με PMA προς εξωκυττάρωση των προϋπαρχόντων WPBs.....	42

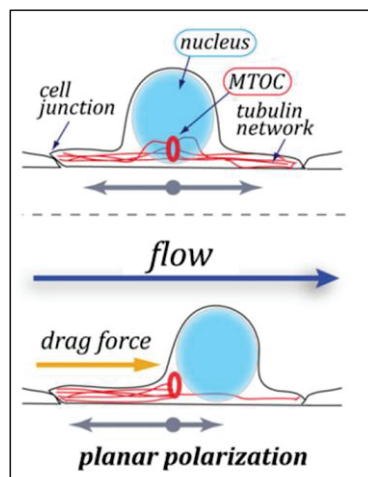
2.2.5 Σύγκριση της βαθμού εξωκυττάρωσης των WPBs έπειτα από ενεργοποίηση κυττάρων HUVE με ATP, Thrombin, PMA, VEGF.....	42
2.2.6 Μέτρηση του εκκρινόμενου vWF, μετά από την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με PMA.....	43
2.3 Μοριακές μέθοδοι.....	43
2.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) – PCR.....	43
2.3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές cDNA.....	45
2.3.3 Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του DNA.....	46
2.4 Βιοχημικές μέθοδοι.....	47
2.4.1 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	47
2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	48
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (Western blotting).....	48
2.5 Μορφολογικές μέθοδοι.....	50
2.5.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	50
2.5.2 Συνεστιακή μικροσκοπία.....	50
2.5.3 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photo bleaching, FRAP).....	51
2.5.4 Μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο (time-lapse video microscopy).....	52
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
3.1 Η προσθήκη του προσδέματος mCherry στις Rabs 3a, 15, 27a, 33, 37 δεν επηρεάζει τον εντοπισμό τους στα WPBs.....	53
3.2 Μελέτη της σειράς και του χρόνου στρατολόγησης των Rabs στη μεμβράνη των WPBs.....	57
3.2.1 Χρήση του προπεπτιδίου του vWF ως δείκτη ανίχνευσης των νεοσυντιθέμενων WPBs.....	57
3.2.2 Ανίχνευση των νεοσυντιθέμενων WPBs μετά από αφαίρεση των προϋπαρχόντων εκκριτικών οργανιδίων με χρήση PMA.....	60
3.2.3 Οι Rabs των WPBs (3a, 15, 27a, 33, 37) στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs μία ώρα μετά τη δημιουργία τους.....	65

3.2.4 Οι Rab27a και Rab33a στρατολογούνται στην πρόιμη φάση της ζωής WPBs	73
3.2.5 Η Rab15 στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μετά την Rab27a.....	77
3.2.6 Η Rab3a στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μετά την Rab27a.....	80
3.2.7 Η Rab37 συνεντοπίζεται με την Rab27a ήδη από τα πρώιμα στάδια της ζωής των WPBs.....	83
3.2.8 Σε ορισμένα WPBs, οι Rab27a και Rab37 φαίνεται να στρατολογούνται σε διαφορετικές υποπεριοχές	86
3.3 Μελέτη της δυναμικής των WPB-Rabs (σύγκριση του ρυθμού ανακύκλωσής τους).....	87
3.4 Διερεύνηση του ρόλου της Rab27a στην στρατολόγηση των άλλων Rabs στα WPBs	91
3.4.1 Η Rab27a δεν επηρεάζει τη στρατολόγηση των άλλων Rabs στα ώριμα WPBs	91
3.4.2 Στα νεοσυντιθέμενα WPBs, η Rab27a καθυστερεί τη στρατολόγηση των Rab3a, Rab15, Rab37, ενώ επιταχύνει την στρατολόγηση της Rab33a	93
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
Περίληψη.....	115
Summary	117
Βιβλιογραφία.....	119

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ενδοθήλιο

Το ενδοθήλιο είναι μια μονήρης στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων. Πρόκειται για ένα όργανο πάχους 2-3 μm που στεγανοποιεί την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων. Στο μέσο ενήλικα έχει βάρος 2 κιλά, και αποτελείται από 1-2 τρισεκατομμύρια κύτταρα που ονομάζονται ενδοθηλιακά κύτταρα (1). Πρόκειται για πολυλειτουργικά, πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα με μήκος 25-50 μm και πλάτος 10-15 μm τα οποία έρχονται σε επαφή με το αίμα (2). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν μία κορυφαία περιοχή (apical membrane), που εκτίθεται στον αυλό των αγγείων, μία βασεοπλευρική (basolateral membrane), που βρίσκεται σε επαφή με τα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, και μία βασική περιοχή (basal membrane), που εφάπτεται με τη βασική μεμβράνη προς την πλευρά του υποκείμενου ιστού. Η περιοχές αυτές έχουν διαφορετικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η κορυφαία περιοχή αποσκοπεί στην προστασία της ενδοθηλιακής επιφάνειας (π.χ. κροσσοί, απομάκρυνση βλέννας), ενώ η βασεοπλευρική περιοχή διαθέτει συνδετικά συμπλέγματα και μόρια προσκόλλησης με σκοπό την πρόσδεση των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με τη βασική μεμβράνη. Σημαντική ιδιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί η πολικότητά τους. (Εικόνα 1.1). Λόγω της υδροδυναμικής πίεσης του αίματος, ο πυρήνας μετακινείται από την κεντρική περιοχή του κυττάρου προς τη μία άκρη του σύμφωνα με το άνυσμα της πίεσης. Με αυτόν τον τρόπο, το κύτταρο αποκτά πολικότητα αφού ο πυρήνας βρίσκεται στο ένα άκρο του, ενώ τα υπόλοιπα οργάνοι και το κυτταρόπλασμα βρίσκονται στον υπόλοιπο χώρο (3).



Εικόνα 1.1. Πολικότητα ενδοθηλιακού κυττάρου που προκαλείται από την υδροδυναμική πίεση του αίματος (3).

Αρχικά, το ενδοθήλιο θεωρούταν ως «περιτύλιγμα σελοφάν» που διαχωρίζει το αίμα που κυκλοφορεί στα αγγεία από το κυρίως τοίχωμά τους χωρίς άλλες ειδικές λειτουργίες, πέρα από τη ρύθμιση της διαπερατότητας του αγγειακού τείχους (4). Ωστόσο, οι τεράστιες προόδους από τη δεκαετία του '80 κι έπειτα οδήγησαν στην κατανόηση των πολύπλοκων λειτουργιών αυτού του μεγάλου ενδοκρινικού οργάνου. Έτσι, είναι πλέον γνωστό ότι το ενδοθήλιο είναι ένα εκτεταμένο εκκριτικό όργανο με κυρίαρχο ρόλο στην ομοιόσταση του αγγειακού συστήματος (5,6).

1.1.1 Λειτουργίες του ενδοθηλίου

Το ενδοθήλιο παίζει καίριο ρόλο στην ομαλή λειτουργία των αγγείων, καθώς ρυθμίζει βασικές αγγειακές λειτουργίες, όπως:

1) Ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο μέσω απελευθέρωσης αγγειοδιασταλτικών (προστακυκλίνη, βραδυκινίνη, μονοξειδίου του αζώτου) και αγγειοσυσταλτικών ουσιών (ενδοθηλίνη-1, θρομβοξάνη A₂, προσταγλανδίνη H₂, αγγειοτενσίνη, ανιόντα υπεροξειδίου). Οι παραπάνω ουσίες ενεργούν τροποποιητικά στο αγγειακό τοίχωμα, ελαττώνοντας ή αυξάνοντας τον τόνο, για την εξασφάλιση της ομαλής ροής του αίματος (7).

2) Έλεγχος της πήξης του αίματος. Το ενδοθήλιο έχει ένα θρομβορυθμιστικό ρόλο. Από τη μια, το ενδοθήλιο αποτρέπει την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (αναστολή του σχηματισμού θρόμβων), αλλά και συμβάλει στην καταστροφή σχηματισμένων θρόμβων, μέσω παραγωγής αντιθρομβωτικών ουσιών (όπως Ενδοθηλιογενής αγγειοχαλαρωτικός παράγων, Προστακυκλίνη, Ιστικός ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου, Θρομβομοδουλίνη, Παρεμποδιστές ινωδόλυσης, Αναστολέας του ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου). Από την άλλη, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι δυνατό μετά από κατάλληλη ενεργοποίηση να επάγουν το σχηματισμό θρόμβου μέσω έκκρισης προθρομβωτικών παραγόντων (Von Willebrand, Θρομβοξάνη A₂, Προσταγλανδίνη H₂, Ιστικός παράγοντας) (8).

3) Μεσολάβηση στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το ενδοθήλιο ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω παραγωγής αυξητικών παραγόντων (Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγων, Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγων, Αυξητικός παράγων ινοβλαστών, Αγγειοτενσίνη-II, Ενδοθηλίνη-1,

Ιντερλευκίνη-1, Αυξητικός παράγων ανάλογος της ινσουλίνης-1) ή αντιαυξητικών παραγόντων (Μετατρεπτικός αυξητικός παράγων β, Θεϊκή ηπαρίνη) που παράγονται από το ενδοθήλιο. Οι παραπάνω παράγοντες πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία, ώστε να επιτευχθεί η ρύθμιση της μορφής των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος και να αποτραπεί η υπερπλασία και η υπερτροφία τους.

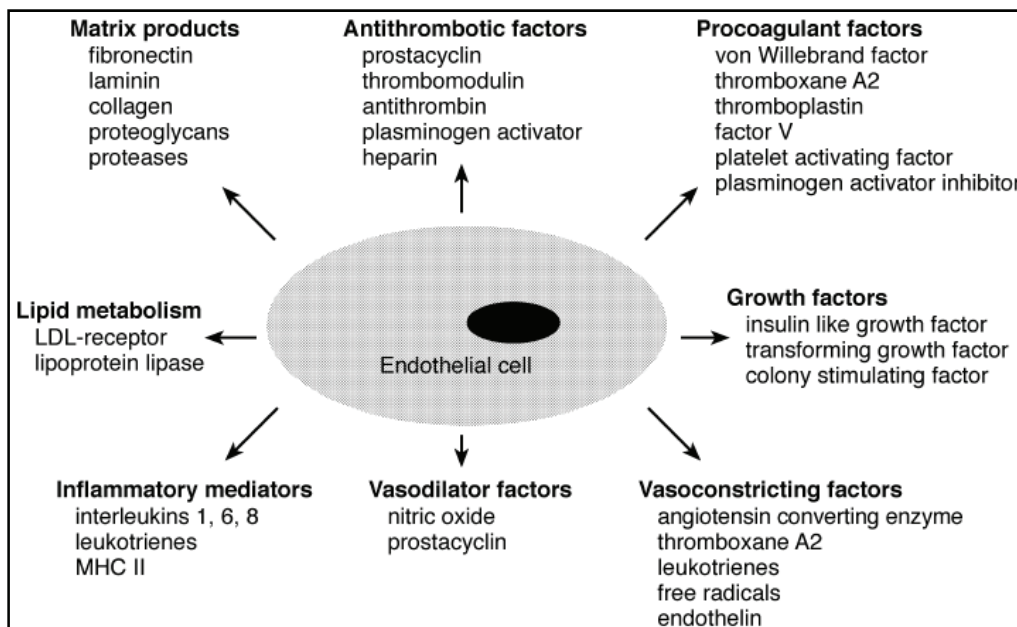
4) Φλεγμονώδης απάντηση. Η δράση αυτή του ενδοθηλίου επιτυγχάνεται μέσω ρύθμισης της μετακίνησης λεμφοκυττάρων και λευκοκυττάρων στους ιστούς. Συγκεκριμένα, το ενδοθήλιο έχει την ικανότητα να παράγει κυτταροκίνες (ιντερλευκίνες 1, 6, 8), αλλά και ουσίες προσκόλλησης των λευκοκυττάρων (ICAM, VCAM, σελεκτίνες L, P) που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι οποίες ρυθμίζουν και κατευθύνουν τις φλεγμονώδεις διεργασίες. Έτσι, με την παραγωγή των μορίων των σελεκτινών προσελκύνονται τα λευκοκύτταρα στο ενδοθήλιο και με τη βοήθεια κυτταροκινών και ιντεγκρινών επέρχεται ισχυρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στην ενδοθηλιακή επιφάνεια (9).

5) Ρύθμιση της ροής των θρεπτικών συστατικών, μακρομορίων και κυττάρων του αίματος. Η δράση αυτή των ενδοθηλιακών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω του φραγμού διαπερατότητας, του ελέγχου δηλαδή της μεταφοράς και της επιλεκτικής διόδου μορίων διαμέσου πολλαπλών διαμεμβρανικών υποδοχέων για πολυάριθμα μόρια (10). Ρόλο στην επιλεκτική διαπερατότητα διαδραματίζουν και πρωτεΐνες των κυτταρικών συνδέσεων (tight junctions) αλλά και εγκοιλώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (caveolae) με ρόλο στην κυστιδιακή μετακίνηση.

Τέλος το ενδοθήλιο συμβάλει στην παραγωγή εξωκυττάρων δομικών ουσιών (κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη, πρωτεογλυκάνες) καθώς και στην πρόσληψη και οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) που μεταφέρονται μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα.

Συγκεντρωτικά (Εικόνα 1.2), τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση μιας αντιθρομβωτικής επιφάνειας που ρυθμίζει τη θρόμβωση, τη θρομβόλυση, την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, τον αγγειακό τόνο και το αίμα. Το ενδοθήλιο είναι απαραίτητο για την ομοιόσταση του σώματος καθώς μια ανεξέλεγκτη ανταπόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων εμπλέκεται σε πλήθος ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της υπέρτασης, της πνευμονικής υπέρτασης,

της σηψαιμίας και των αναπνευστικών συνδρόμων. Αυτές οι ασθένειες σχετίζονται με την ενδοθηλιακή βλάβη και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου που θα αναπτυχθεί στην επόμενη ενότητα (8).

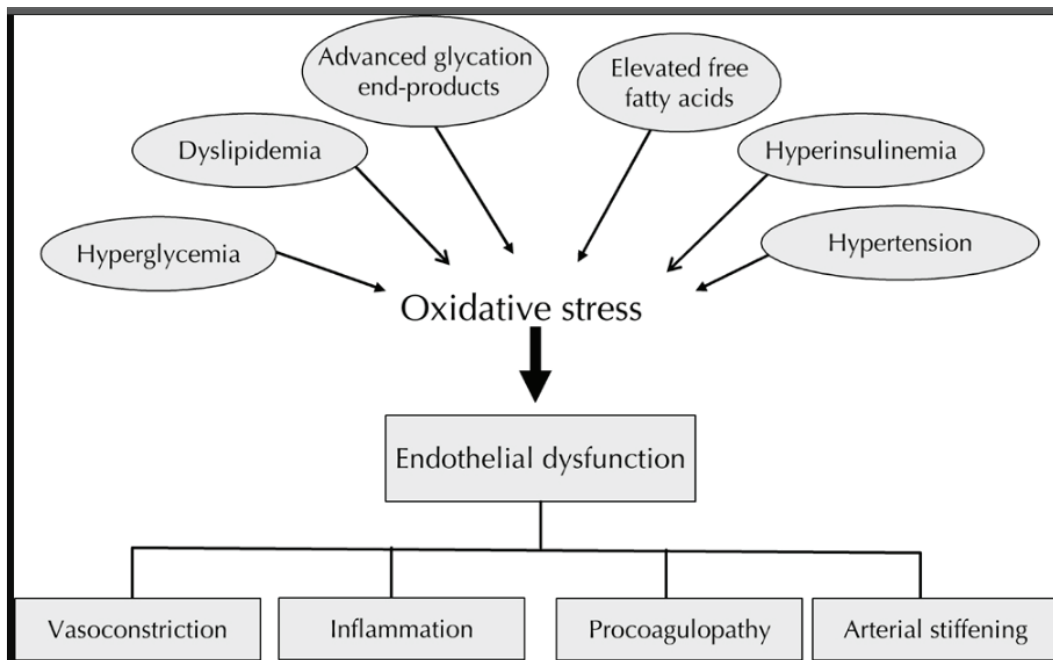


Εικόνα 1.2. Μεταβολικές και συνθετικές λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μέσω της έκκρισης μιας μεγάλης ποικιλίας μεσολαβητών, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σε θέση να επηρεάσουν την κυτταρική λειτουργία σε όλο το σώμα (8).

1.1.2 Δυσλειτουργίες του ενδοθηλίου

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηρίζεται από την απώλεια αγγειοδιασταλτικών και αντιθρομβωτικών παραγόντων, ή την αύξηση σε αγγειοσυσταλτικές και προθρομβωτικές ουσίες (11). Διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η υπέρταση, οι λοιμώξεις, η αιμοδυναμική αστάθεια μετά από αιμορραγία, έμφραγμα, διαταραχές μεταβολισμού, όπως σακχαρώδης διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, οι διαταραχές της ανοσολογικής απάντησης, όπως στα αυτοάνοσα νοσήματα ή στην απόρριψη μοσχεύματος, και διάφορα τοξικά αίτια όπως τοξίνες, ιοί, υποξία επηρεάζουν δυσμενώς την ενδοθηλιακή λειτουργία.

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του αγγειακού τόνου, τη δημιουργία μιας προθρομβωτικής και προφλεγμονώδους κατάστασης καθώς και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα (12) (Εικόνα 1.3). Έτσι, εμπλέκεται στις πιο απειλητικές για τη ζωή ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές και φλεγμονώδης παθήσεις και η αγγειογένεση στους όγκους (13,14).



Εικόνα 1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το ενδοθήλιο και συνέπειες της ενδοθηλιακής δυσλειτουργία (15).

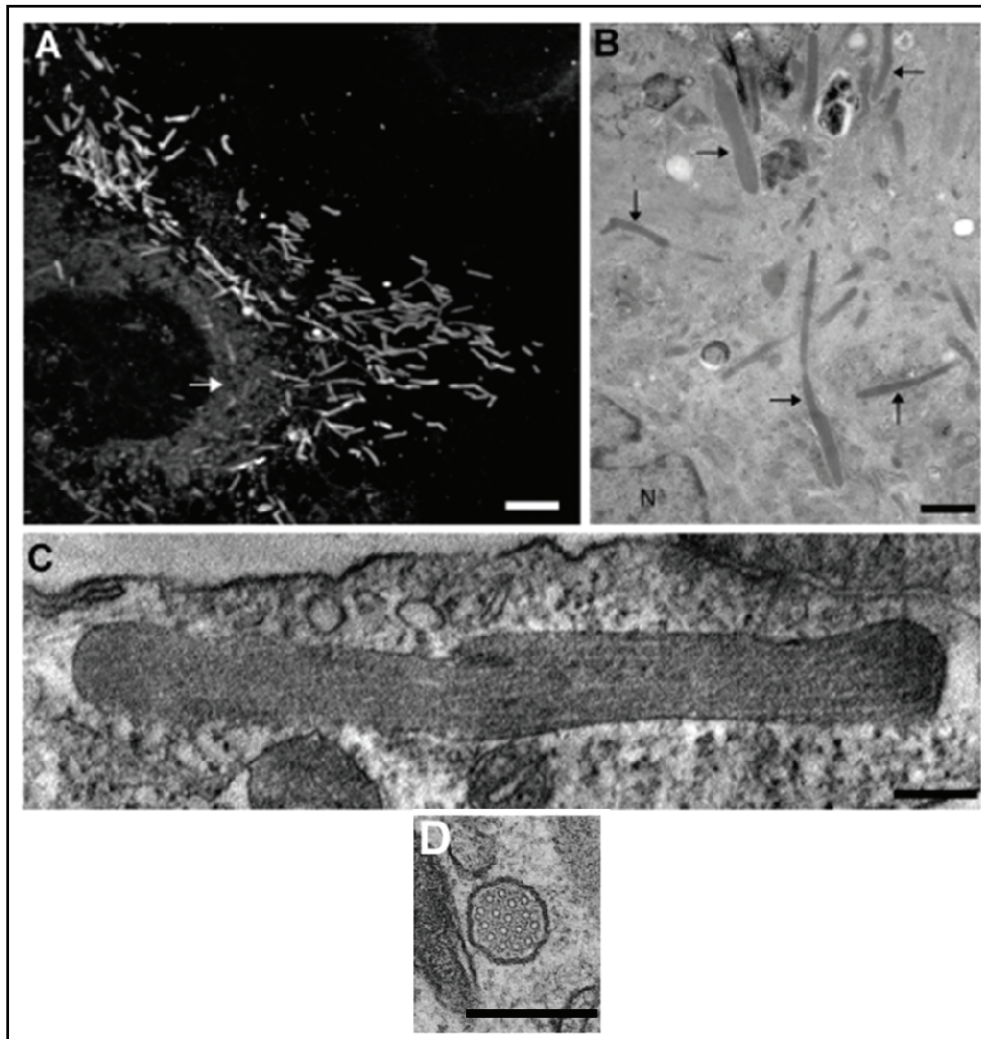
1.2 Weibel Palade Bodies (WPBs)

Πολλά ενδοθηλιακά μόρια, που παίζουν σημαντικό ρόλο στις πιο πάνω παθοφυσιολογικές διαδικασίες, αποθηκεύονται σε εξειδικευμένα οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα Weibel Palade bodies (WPBs) (16-18). Τα εξειδικευμένα αυτά οργανίδια περιλαμβάνουν ως φορτίο ένα πλήθος πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την θρόμβωση (παράγοντας von Willebrand, και παράγοντας XIIIa), την φλεγμονή (P-σελεκτίνη, Ιντερλευκίνη-8, Εοταξίνη-3, Ωστεοπροτεγερίνη), την ινοδάλυση (Ιστικός πλασμινογόνο παράγοντας), την κυτταρική πρόσφυση/μετανάστευση (CD63), την αγγειοσύσπαση (Ενδοθυλίνη-1, Ένζυμο μετατροπής Ενδοθηλίνης), την αγγειοδιαστολή (Πεπτίδιο σχετιζόμενο με το γονίδιο της Καλσιτονίνης) και την αγγειογένεση (Αγγειοποιητίνη-2) (19) (Εικόνα 1.4).

WPB cargoes	
WBP component	Function
VWF	Mechano-sensitive binding platform involved in many WPB functions, including haemostasis/thrombosis, inflammation, angiogenesis
Tissue plasminogen activator	Fibrinolysis
P-selectin	Leucocyte receptor
IL-8	Inflammation
CD63	P-selectin co-factor
Eotaxin-3	Inflammation
Endothelin	Vascular tonicity
Endothelin-converting enzyme	Vascular tonicity
Calcitonin gene-related peptide	Vascular tonicity
Angiopoietin-2	Angiogenesis
Osteoprotegerin	Vascular homeostasis
FUT6	Glycosylation
IGFBP7	Angiogenesis
IL-6	Inflammation
MCP-1	Inflammation
CXCL1	Inflammation

Εικόνα 1.4. Φορτία που απαντώνται στα WPBs με τις αντίστοιχες λειτουργίες τους (19).

Τα WPBs, περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1964 από τους Ewald R. Weibel και George E. Palade. Είναι εξειδικευμένα εκκριτικά κυστίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων που αποθηκεύουν βιομόρια με σκοπό την έκκρισή τους έπειτα από ερέθισμα. Έχουν επίμηκες σχήμα (cigar-shaped) με πλάτος 0,1-0,3 μm και μήκος 1-5 μm. Με παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Εικόνα 1.5), το περιεχόμενο των WPBs διακρίνεται σε διαμήκη διατομή ως ραβδώσεις που διατρέχουν παράλληλα τον επιμήκη άξονά τους, ενώ σε εγκάρσια τομή έχουν σχήμα σωλήνα. Οι σωλήνες συγκροτούνται από τον παράγοντα **von Willebrand** (vWF), το **κυρίαρχο φορτίο των WPBs** που έχει σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση και την πήξη του αίματος (20). Μάλιστα, ο vWF είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία των WPBs (21). Τα WPBs σχηματίζονται στο δίκτυο trans-Golgi (TGN) και στη συνέχεια υπόκεινται μία διαδικασία ωρίμανσης, με το πέρας της οποίας αποθηκεύονται στο κυτταρόπλασμα έτοιμα να ανταποκριθούν σε κατάλληλο ερέθισμα με σκοπό την έκκρισή τους.



Εικόνα 1.5. Μορφολογία των WPBs. (A) Εικόνα ανοσοφθορισμού κυττάρων HUVE, επισημασμένα με αντίσωμα έναντι του ενδογενή vWF, αποκαλύπτοντας τα πολυάριθμα επιμήκη WPBs σε όλο το κύτταρο. Με το λευκό βέλος απεικονίζεται το ER (scale bars = 5 μ m). (B) Εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ενός κυττάρου HUVE που περιλαμβάνει αρκετά WPBs (απεικονίζονται με βέλη, N=πυρήνας, scale bar = 1 μ m). (C) Ψηφιακή τομή ενός WPB μέσω ηλεκτρονικής τομογραφίας που παρουσιάζει το επίμηκες σχήμα του οργανιδίου και τις εσωτερικές ραβδώσεις (scale bars=200 nm). (D) Εγκάρσια διατομή ενός WPB μέσω ηλεκτρονικής τομογραφίας που δείχνει την σωληνοειδή φύση των ραβδώσεων (20).

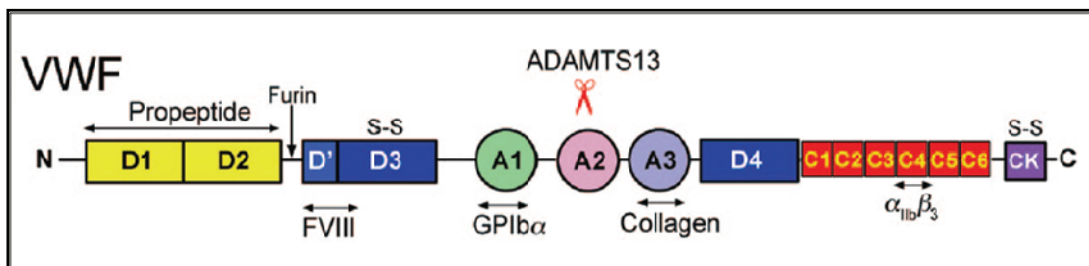
1.2.1 Κυρίαρχο φορτίο των WPBs ο παράγοντας von Willebrand (vWF)

Η πρώτη αναφορά στον παράγοντα von Willebrand (vWF) έγινε το 1924, όταν ο Φιλανδός γιατρός Erik von Willebrand περιέγραψε μία κληρονομική αιμορραγική διαταραχή, μελετώντας μία οικογένεια, που τα τρία της παιδιά είχαν αποβιώσει στην ηλικία των τεσσάρων ετών, λόγω αιμορραγιών από τη στιγμή της γέννησής τους, ενώ το τέταρτο παιδί της οικογένειας, είχε επηρεαστεί επίσης σοβαρά (22). Ο von Willebrand είχε θεωρήσει ως πιθανές αιτίες της αιμορραγίας κάποια διαταραχή στη λειτουργία των

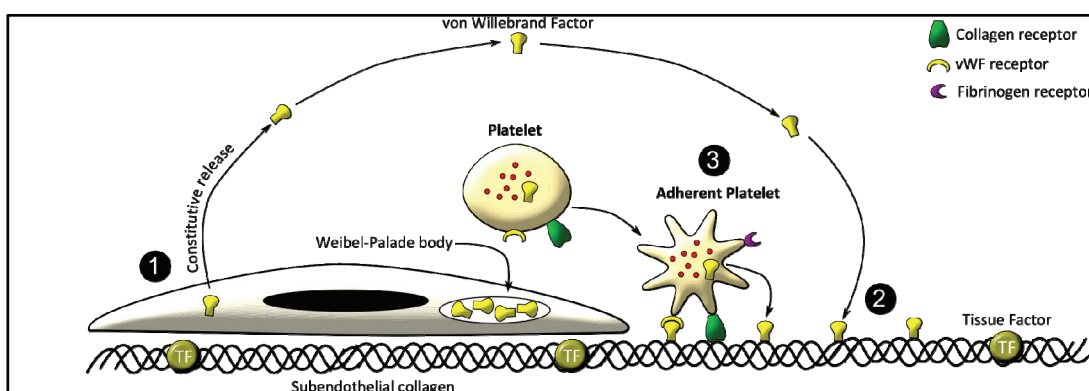
αιμοπεταλίων ή αγγειακό ελάττωμα. Από τότε, η ασθένεια έχει μελετηθεί εκτενώς και στα μέσα της δεκαετίας του 1950 αποδείχθηκε ότι η εξασθενημένη αιμόσταση οφείλεται στην έλλειψη ή στην ανωμαλία ενός πλασματικού παράγοντα - του παράγοντα von Willebrand - ο οποίος είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική αιμόσταση (23,24).

Ο vWF είναι μια πολυμερή γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται αποκλειστικά από τα μεγακαρυοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι απαραίτητη για την συγκέντρωση και την πρόσφυση των αιμοπεταλίων στα σημεία αγγειακής διαταραχής. Επίσης, δρα και στην προστασία του συμπαραγόντα πήξης VIII (FVIII), από την πρωτεολυτική του αποικοδόμηση στο πλάσμα, δημιουργώντας σύμπλοκο μαζί του. Όταν ο παράγοντας VIII δεν είναι δεσμευμένος στον vWF, ο χρόνος ημιζωής του στο πλάσμα μειώνεται σημαντικά.

Ο vWF συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως προ-προ-vWF, που αποτελείται από: το σηματοδοτικό πεπτίδιο με 22 κατάλοιπα, το προπεπτίδιο του vWF με 751 κατάλοιπα και τον ώριμο vWF με 2.050 κατάλοιπα. Η αλληλουχία του vWF χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες περιοχές ή μοτίβα (A-D). Το προπεπτίδιο περιέχει 2D περιοχές (D1 και D2), που είναι απαραίτητες για τον πολυμερισμό, την ενδοκυττάρια μετακίνηση καθώς και την έκκριση του (25). Η ώριμη πρωτεΐνη του vWF αρχίζει από την περιοχή D' και συνεχίζει έως το καρβόξυ-τελικό του άκρο (Εικόνα 1.6) και περιλαμβάνει διαφορετικές θέσεις δέσμευσης μορίων που μεσολαβούν στις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις που απαιτούνται για τη χορήγηση «πρώτων βοηθειών» στα αγγεία. Συγκεκριμένα, ο εκκρινόμενος vWF έπειτα από κατάλληλο ερέθισμα (αγγειακή διαταραχή) απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος (Εικόνα 1.7) και προσδένεται στις ίνες κολλαγόνου μέσω της A3 περιοχής του. Η πρόσδεση αυτή, επάγει την έκθεση της A1 περιοχής του, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση με τη γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλίων GPIIb. Έπειτα, τα αιμοπετάλια προσφύονται στον υποενδοθηλιακό χώρο μέσω των υποδοχέων κολλαγόνου που διαθέτουν, και αρχίζει η συσσώρευσή τους μέσω αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και της C1 περιοχής του vWF. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν μεσολαβητές, όπως η Θρομβοξάνη A2 (TXA2) και η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), που ενεργοποιούν άλλα κοντινά αιμοπετάλια παρεμποδίζοντας έτσι την αιμορραγία (26).



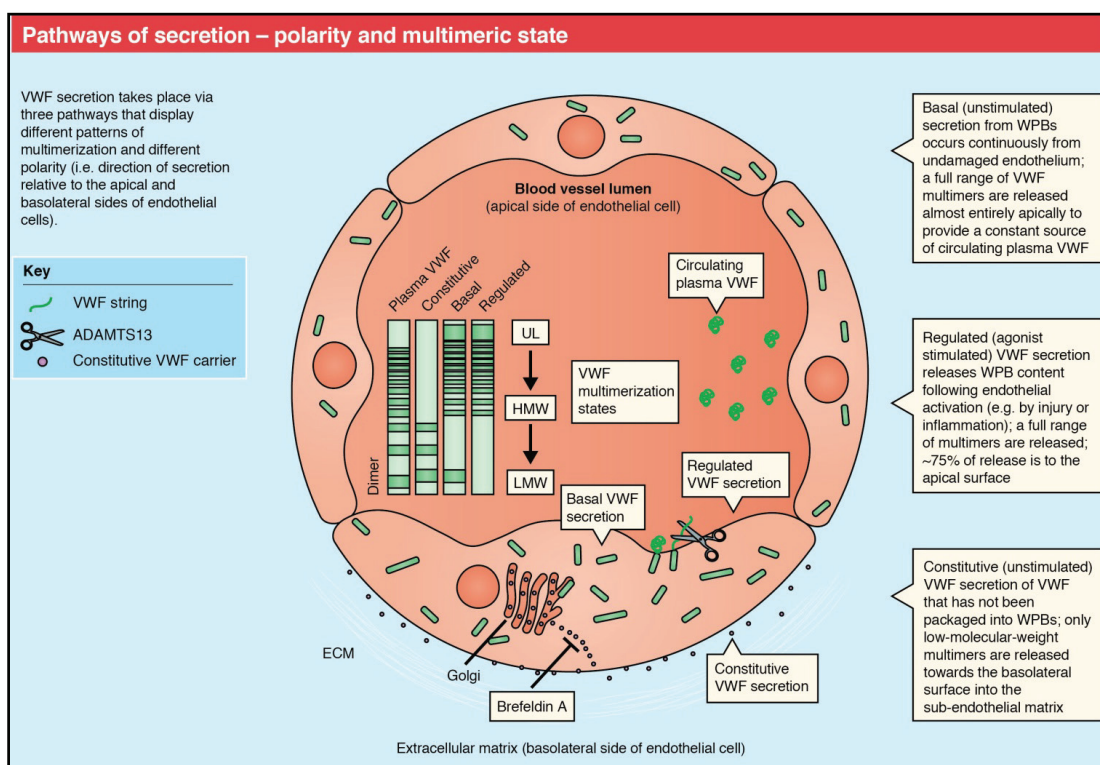
Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών του vWF, καθώς και των θέσεων πρόσδεσης των φυσιολογικών προσδετών του. Στις D' και D3 περιοχές του vWF γίνεται η δέσμευση του FVIII, στην A1 γίνεται η πρόσδεση με τον υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPIIb α , η A2 περιοχή πρέπει μερικώς να ξεδιπλωθεί για να αποκαλύψει τη θέση που θα δράσει η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13, στην A3 περιοχή προσδένεται το κολλαγόνο, και στην C1 προσδένεται η ιντεγρίνη των αιμοπεταλίων $\alpha_{IIb}\beta_3$. Παρουσιάζονται, επίσης, οι θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών για το σχηματισμό διμερών και πολυμερών, καθώς και η θέση όπου η φουρίνη πέπτει το μόριο για το σχηματισμό του προπεπτιδίου και της ώριμης υπομονάδας (27).



Εικόνα 1.7. Έκκριση του vWF μετά από βλάβη του ενδοθηλίου. Μετά από βλάβη στο ενδοθήλιο, ο vWF συνδέεται με το κολλαγόνο και τους υποδοχείς του vWF στα αιμοπετάλια, προκαλώντας την προσκόλλησή τους στο σημείο βλάβης και ξεκινώντας τη διαδικασία ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (26).

Ο vWF εκκρίνεται στο αίμα και τον υποενδοθηλιακό χώρο, μέσω τριών οδών (28) (Εικόνα 1.8). Η ρυθμιζόμενη και η βασική έκκριση απελευθερώνει τον vWF των WPBs και παρέχει υψηλού βαθμού πολυμερισμένο vWF. Η ρυθμιζόμενη έκκριση πραγματοποιείται λόγω της ενεργοποίησης του ενδοθηλίου από κάποιο επαγωγέα της έκκρισης. Αντίθετα, η βασική έκκριση συμβαίνει συνεχώς, χωρίς βλάβη στο ενδοθήλιο, με σκοπό την παροχή μιας συνεχούς διαθέσιμης πηγής vWF. Τέλος, η τρίτη οδός συμβαίνει με την ιδιοσυστατική απελευθέρωση του vWF που βρίσκεται σε κυστίδια που παράγονται στο Golgi, διαφορετικά από τα WPBs, και ο οποίος δεν έχει υποβληθεί σε υψηλά επίπεδα πολυμερισμού. Η ιδιοσυστατική έκκριση διατηρεί τη συγκέντρωση vWF στο πλάσμα στις φυσιολογικές τιμές.

Η απελευθέρωση του vWF είναι επίσης πολωμένη (Εικόνα 1.8), καθώς το μεγαλύτερο μέρος του άκρως πολυμερισμένου φορτίου που παραδίδεται από τα WPBs μέσω της βασικής ή ρυθμιζόμενης έκκρισης απελευθερώνεται από την κορυφαία επιφάνεια του ενδοθηλίου στον αυλό των αγγείων, όπου μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα αιμοπετάλια. Εντούτοις, η ιδιοσυστατική έκκριση του vWF χαμηλού μοριακού βάρους συμβαίνει από τη βασεοπλευρική επιφάνεια του ενδοθηλίου. Από εκεί, ο vWF μεταφέρεται στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου είναι πιθανό να δεσμεύεται στο κολλαγόνο μέσω της A3 περιοχής του (29).



Εικόνα 1.8. Ο vWF εκκρίνεται μέσω τριών μονοπατιών. Από τα διαφορετικά μονοπάτια έκκρισης απελευθερώνεται vWF διαφορετικής έκτασης πολυμερισμού. Διαφορετικά είδη κυστιδίων με διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού του εκκρινόμενου vWF συντήκονται με την κορυφαία και την βασεοπλευρική πλευρά της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων (19).

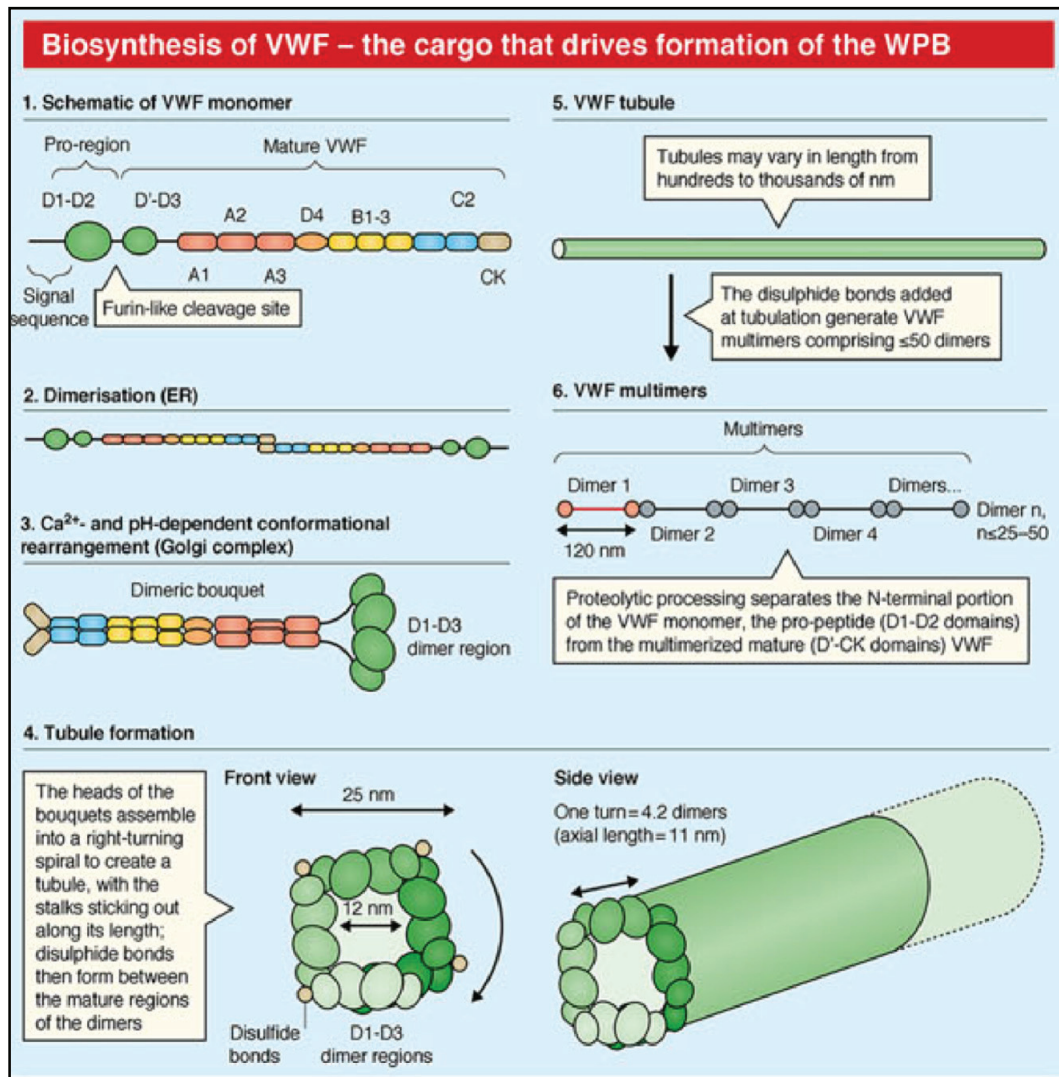
Ανεξάρτητα, όμως από την κυτταρική του πηγή, η δραστηκότητά του vWF εξαρτάται από την έκταση του πολυμερισμού του. Η έκκριση πολύ μεγάλων πολυμερών του vWF, από τα WPBs, στην κυκλοφορία του αίματος είναι θρομβογενετική. Λόγω αυτής της θρομβογενετικής ιδιότητας, τα μεγάλα πολυμερή θα πρέπει να απομακρύνεται γρήγορα από το πλάσμα των υγιών ατόμων (30). Η ρύθμιση του μεγέθους του vWF γίνεται μέσω ειδικής πρωτεολυτικής διαδικασίας από τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13, η οποία πέπτει τα πολύ μεγάλα πολυμερή σε μικρότερα, αμέσως μετά την έκκρισή τους (31).

Η σημασία του vWF για την αιμόσταση γίνεται εμφανής από τις σοβαρές αιμορραγίες που λαμβάνουν χώρα όταν αυτός απουσιάζει εντελώς (νόσος του vWF τύπου III) μία ομόζυγη διαταραχή της σύνθεσης του vWF στην οποία δεν υπάρχει vWF, ή υπάρχει πολύ λίγος, στην κυκλοφορία του αίματος. Οι νόσοι του vWF τύπου I (μειωμένη ποσότητα vWF) και τύπου II (υπάρχει αρκετός vWF, αλλά δεν είναι λειτουργικός) εκδηλώνονται επίσης με αιμορραγίες από το δέρμα και τους βλεννογόνους. Ωστόσο, η ένταση των αιμορραγιών αυτών είναι γενικά ηπιότερη, και ποικίλει λόγω της παρουσίας διαφορετικών ποσοτήτων λειτουργικού vWF στο πλάσμα και στην υποενδοθηλιακή θεμέλια ουσία (32).

1.2.2 Βιογένεση και ωρίμανση των WPBs

Όπως αναφέρθηκε, το κυρίαρχο φορτίο των WPBs είναι ο παράγοντας vWF, ο οποίος εκτός από την μεγάλη σημασία που έχει στον εξωκυτταρικό χώρο για τη διατήρηση της φυσιολογίας των αγγείων, παίζει πολύ σημαντικό ενδοκυτταρικό ρόλο στο σχηματισμό των WPBs. Έχει δειχθεί πως η υπερέκφραση του vWF σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ψευδο-WPBs, όμοιων με αυτά των ενδοθηλιακών κυττάρων (33,34). Έτσι, η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη και για την ίδια τη δημιουργία των WPBs. Όμως, η σχέση του vWF με τα WPBs είναι αμφίδρομη, αφού ο μηχανισμός που ελέγχει τον σχηματισμό αυτών των οργανιδίων επηρεάζει επίσης τη δομική διάταξη του vWF (35-37). Για να γίνει, όμως, σαφής ο ρόλος αυτός πρέπει να αναλυθεί το μονοπάτι σύνθεσης και μεταφοράς του vWF.

Στην τμήμα 1 της εικόνας 1.9 δίνεται η σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών του μονομερούς vWF, που, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελείται από το σηματοδοτικό πεπτίδιο (22 κατάλοιπα), το προπεπτίδιο του vWF (751 κατάλοιπα) και τον ώριμο vWF (2050 κατάλοιπα), ο οποίος υπόκειται σε εκτεταμένες ενδοκυτταρικές τροποποιήσεις.

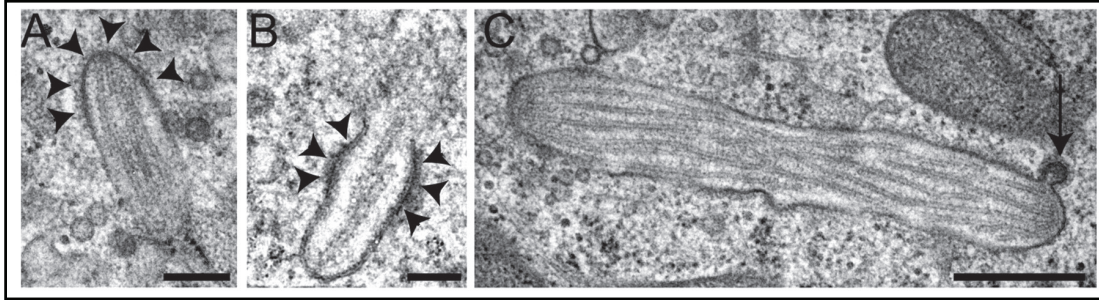


Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων που συμβαίνουν κατά το σχηματισμό των πολυμερών και των σωληνοειδών του vWF, καθώς επίσης και τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα στα οποία αυτά πραγματοποιούνται (19).

Όπως όλες οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω του εκκριτικού μονοπατιού, ο vWF μεταφράζεται στα ριβοσώματα που εντοπίζονται στην επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Το σηματοδοτικό πεπτίδιο, στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, κατευθύνει το νεο-σχηματιζόμενο πολυπεπίδιο στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου. Εκεί, το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόπτεται, ομάδες σακχάρων προστίθενται και η πρωτεΐνη διμερίζεται (Εικόνα 1.9, τμήμα 2) μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών της καρβόξυ-τελικής περιοχής, και η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται. Ο vWF είναι πλούσιος σε κυστεΐνες (234 κατάλοιπα). Μια πρόσφατη μελέτη (38) έδειξε ότι αυτές οι ελεύθερες κυστεΐνες είναι απαραίτητες για την σωστή αναδίπλωση και έκκριση

της πρωτεΐνης. Έπειτα, η ορθά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη συσκευάζεται σε κυστίδια καλυμμένα με τις πρωτεΐνες του καλύμματος COP II, τα οποία την μεταφέρουν στη συσκευή Golgi. Εκεί, το διμερές υφίσταται τροποποίηση της γλυκοζυλίωσης και μεταφέρεται στο TGN, όπου συμβαίνουν οι τελικές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν τα εξής:

- Κατά την άφιξη στο περιβάλλον του Golgi (όξινο pH, ιόντα Ca^{+2}), τα διμερή αναδιατάσσονται στις λεγόμενες «διμερείς ανθοδέσμες» στις οποίες οι καρβόξυ-τελικές περιοχές τους συνδέονται στενά μεταξύ τους σε μία σπειρωμένη δομή που μοιάζει με σωλήνες, με τις αμινο-τελικές περιοχές D1-D3 να έχουν μια πιο σφαιρική διαμόρφωση σχηματίζοντας δομή «λουλουδιού» (39,40) (Εικόνα 1.9, τμήμα 3). Στη συνέχεια, επάγεται ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνών στις αμινο-τελικές περιοχές D'-D3, μια διαδικασία η οποία καταλύεται από το προπεπτίδιο (Εικόνα 1.9, τμήμα 4). Έτσι, το περιβάλλον ευνοεί την παραγωγή πολυμερών, που περιλαμβάνουν μέχρι και 50 διμερή (Εικόνα 1.9, τμήμα 5).
- Ταυτόχρονα, ακόμα στον αυλό του Golgi, ο vWF υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από την πρωτεάση φουρίνη, δημιουργώντας δύο τμήματα, το προπεπτίδιο (D1-D2 περιοχές), και τον ώριμο vWF (41-44). Μετά τη διάσπαση, το προπεπτίδιο συνεχίζει να αλληλεπιδρά με τις D'-D3 περιοχές της ώριμης πρωτεΐνης (Εικόνα 1.9, τμήμα 6), και είναι απαραίτητο για την τελική αναδίπλωση των πολυμερών σε δομές που μοιάζουν με σωλήνες. Η σωληνοειδής αναδίπλωση επιτρέπει στο vWF να συμπιέζεται 100 φορές· χωρίς αυτή την ιδιότητα, η ενδοκυττάρια αποθήκευσή του θα ήταν αδύνατη (44).
- Στη συνέχεια, το νεοσχηματιζόμενο WPB υπόκειται μία διαδικασία ωρίμανσης, όπου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η κλαθρίνη, η οποία είναι γνωστό πως εμπλέκεται στη δημιουργία των WPBs (45). Υποστηρίζεται πως η κλαθρίνη έχει διπλό ρόλο, να παρέχει στήριξη, προωθώντας την κάμψη της μεμβράνης στην άκρη του WPB (Εικόνα 1.10-A), ή οργανώνεται στη μεμβράνη του WPB σε περιοχές, όπου οι σωλήνες του vWF είναι αποδιοργανωμένοι (Εικόνα 1.10-B). Ακόμη, έχει ευθύνη και στη δημιουργία κυστιδίων που αποκόπτονται από το WPB, απομακρύνοντας έτσι από αυτό πρωτεΐνες που δεν προορίζονται για ρυθμιζόμενη εξωκυττάρωση μέσω των WPBs (Εικόνα 1.10-C).

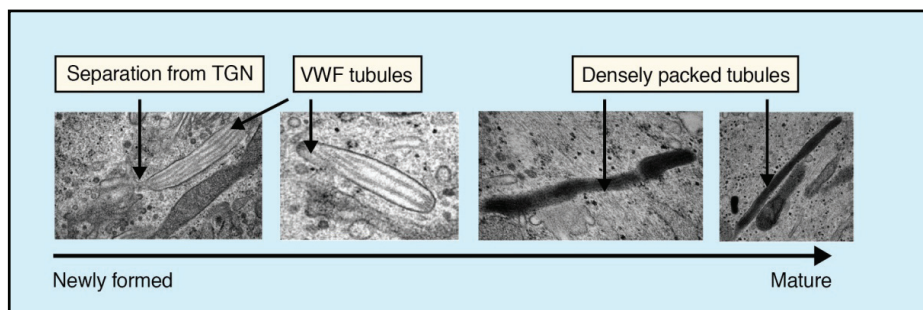


Εικόνα 1.10. Διπλός ρόλος της κλαθρίνης στην ωρίμανση των WPBs. (A, B). Στηρικτικός ρόλος κλαθρίνης, στη μεμβράνη γύρω από το WPB παρατηρείται το κάλυμμα κλαθρίνης (βέλη) Bar, 200 nm. (C) Η κλαθρίνη ευθύνεται για τη δημιουργία κυστιδίων που αποκόπτονται από το WPB, με σκοπό να απομακρύνει πρωτεΐνες που δεν πρέπει να εκκριθούν, ανώριμο WPB, από το οποίο αποκόπτεται κυστίδιο καλυμμένο με κλαθρίνη (βέλος) Bar, 500 nm (45).

Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, το κάλυμμα κλαθρίνης χάνεται και το WPB μεταφέρεται στην περιφέρεια του κυττάρου όπου έχει αυξημένη ηλεκτρονική πυκνότητα, που οφείλεται στο πυκνό πακετάρισμα των σωλήνων του vWF (Εικόνα 1.11-δεξιά).

Φαίνεται, λοιπόν, πως η συμπίεση και η οργάνωση του vWF είναι μία συνεχής διαδικασία που αρχίζει με τη διαμόρφωση σωλήνων και τον πολυμερισμό στο TGN, συνεχίζεται με επιπλέον πολυμερισμό στο εσωτερικό των WPBs, καταλήγοντας στη συμπίεση των σωλήνων καθώς το οργανίδιο ωριμάζει.

Η ρυθμιζόμενη έκκριση των WPBs, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του vWF στην κυκλοφορία, με τη μορφή ινών. Οι ίνες δημιουργούνται κατά το ξετύλιγμα του πολυμερούς του vWF, λόγω απομάκρυνσης του προπεπτιδίου, καθώς το pH στο εσωτερικό του WPB από όξινο γίνεται ουδέτερο (εκτίθεται στο περιβάλλον της κυτταροπλασματικής μεμβράνης). Στις ίνες του vWF προσδένονται αιμοπετάλια, τα όποια στη συνέχεια αρχίζουν να συσσωρεύονται, με σκοπό τη δημιουργία αιμοστατικού θρόμβου.



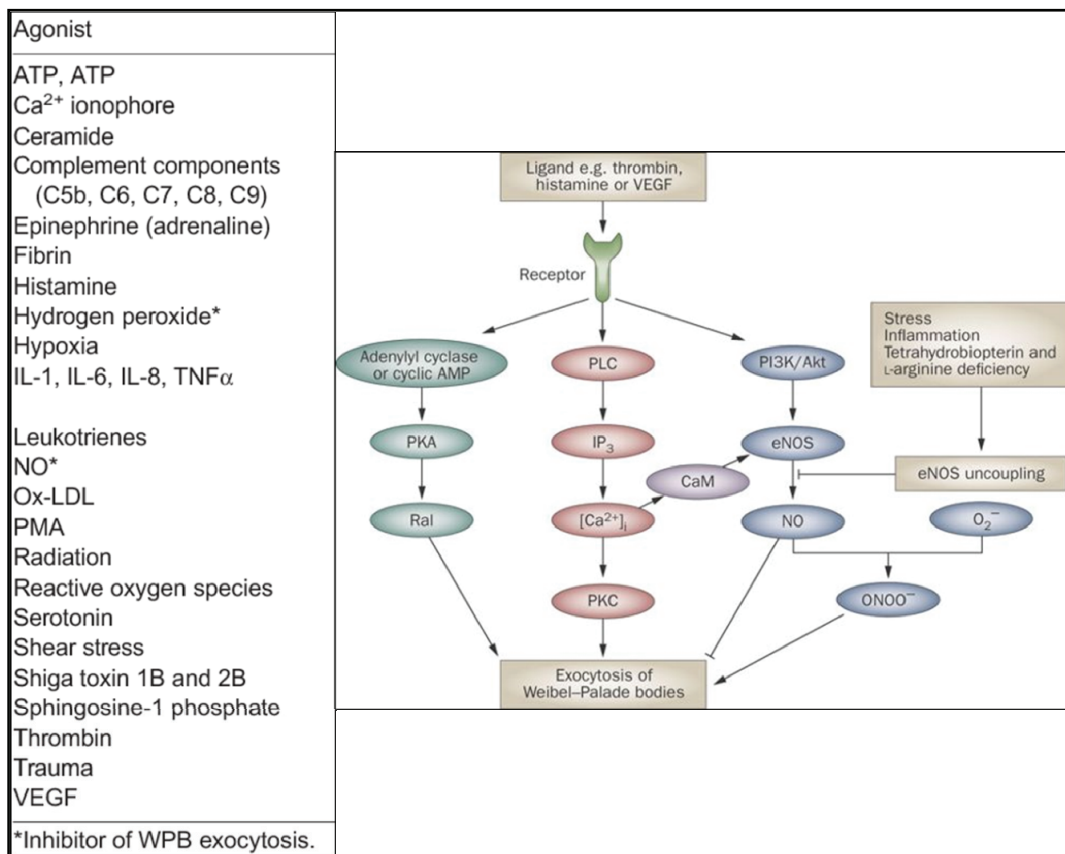
Εικόνα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση της βιογένεσης ενός WPB. Εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει την αποκοπή ενός νεοσχηματιζόμενου WPB από το TGN (αριστερά), την διαμόρφωση του vWF σε σωλήνες (κέντρο), και το πυκνό πακετάρισμα του vWF σε ένα ώριμο WPB (δεξιά) Bar, 200 nm (19).

Πιο πάνω περιγράφηκε η βασική διαδικασία παραγωγής και ωρίμανσης του vWF. Ωστόσο δεν αποθηκεύονται όλες οι μορφές του vWF στα WPBs. Πραγματοποιείται επιλεκτική αποθήκευση των μορίων που είναι περισσότερο πολυμερισμένα, ενώ οι μικρότερου μοριακού βάρους μορφές συσκευάζονται σε κυστίδια μικρότερου μεγέθους τα οποία εκκρίνονται ιδιοσυστατικά.

1.2.3 Ενεργοποιητές της έκκρισης των WPBs

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν από ένα εύρος αγωνιστών, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν καθοδικές οδούς σηματοδότησης. Θεωρείται γενικά ότι οι αγωνιστές δρουν μέσω δύο κύριων μονοπατιών, που αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα είτε του Ca^{2+} , είτε της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) (Εικόνα 1.12). Τέτοιοι ενεργοποιητές είναι η θρομβίνη, που δρα μέσω του Ca^{2+} , και η επινεφρίνη (επίσης γνωστή ως αδρεναλίνη), η οποία σηματοδοτεί μέσω της cAMP (19). Οι παράγοντες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο προκαλούν καταστροφή του αγγειακού φραγμού και εκτεταμένη έκκριση των WPBs. Αντίθετα, οι παράγοντες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο cAMP προκαλούν ισχυροποίηση του αγγειακού φραγμού και μικρής έκτασης έκκριση, κατά την οποία εκκρίνονται μόνο τα περιφερειακά WPBs, ενώ ένας υποπληθυσμός των WPBs συγκεντρώνεται περιπυρηνικά, αποφεύγοντας την έκκριση (17).

Η εκκριτική διαδικασία ελέγχεται επίσης από ανασταλτικά μονοπάτια. Στους αναστολείς της έκκρισης των WPBs κατατάσσονται το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), που επιδρούν στον παράγοντα NSF (συστατικό του μηχανισμού μεμβρανικής σύντηξης), που ελέγχει τις πρωτεΐνες SNAREs (βλέπε επόμενη παράγραφο).



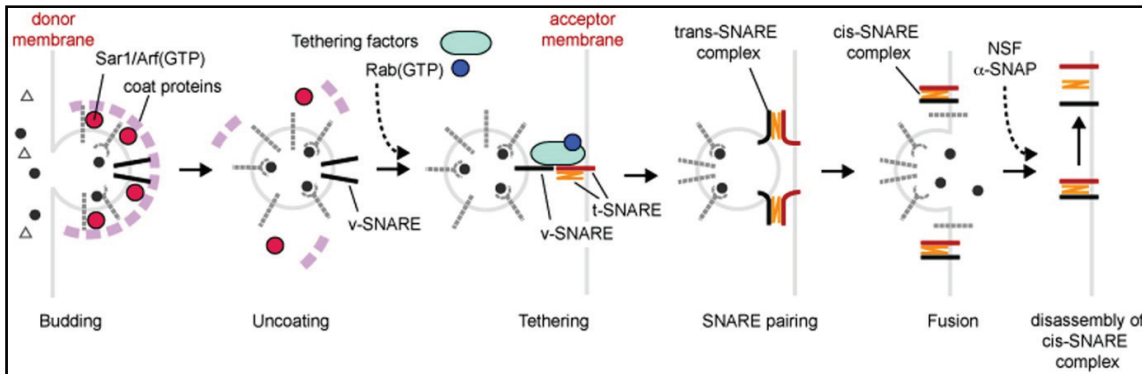
Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση των ενεργοποιητών της έκκρισης των WPBs, και των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν. Το κυρίαρχο μονοπάτι που επάγει την έκκριση περιλαμβάνει την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, ενεργοποίηση της καλμοδουλίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ένα εναλλακτικό επαγωγικό μονοπάτι περιλαμβάνει αύξηση του κυκλικού AMP (cAMP) και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και της πρωτεΐνης Ral (GTPάση που έχει συνδεθεί με αναδιάταξη του κυτταροσκελετού) (19,46).

1.3 Μοριακός μηχανισμός και σκοπός της κυστιδιακής μεταφοράς

Για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που διέπουν το σχηματισμό και την έκκριση των WPBs πρέπει να λάβουμε υπόψη μας, ότι κάθε μονοπάτι κυστιδιακής μεταφοράς έχει ως στόχο τη μεταφορά φορτίων από ένα μεμβρανικό οργανίδιο-δότη (π.χ. Golgi) προς ένα άλλο οργανίδιο-δέκτη (π.χ. κυτταροπλασματική μεμβράνη). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με το σχηματισμό ενδιάμεσων κυστιδίων (π.χ. WPBs), που αναλαμβάνουν τη μεταφορά των φορτίων. Ο μοριακός μηχανισμός της κυστιδιακής μεταφοράς περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Εικόνα 1.13):

- Σχηματισμός του κυστιδίου (π.χ. WPB) από τη μεμβράνη δότη (π.χ. Golgi)
- Μεταφορά του προς τη μεμβράνη στόχο (π.χ. πλασματική μεμβράνη)
- Σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη στόχο

Αυτή η διαδικασία είναι θεμελιώδης για την ομοίωση και την ύπαρξη των ευκαρυωτικών κυττάρων (47).



Εικόνα 1.13. Στάδια κυστιδιακής μετακίνησης. Τα κυστίδια σχηματίζονται από τη μεμβράνη δότη, διαδικασία που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες Arf/Sar και από τις πρωτεΐνες του καλύμματος. Η μετακίνηση του κυστιδίου γίνεται πάνω στις ίνες του κυτταροσκελετού. Για τη σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη-στόχο απαιτούνται οι πρωτεΐνες Rabs, SNAREs, SNAP και NSF. Οι Rab GTPases στρατολογούν παράγοντες πρόσδεσης, που βοηθούν τα v-SNAREs (των κυστιδίων) να ζευγαρώσουν με συγκεκριμένα t-SNAREs (της μεμβράνης δέκτη). Στη συνέχεια, τα v-SNAREs και t-SNAREs δημιουργούν ισχυρά συμπλέγματα, μεσολαβώντας την επιλεκτική σύντηξη των κυστιδίων με τη σωστή μεμβράνη δέκτη. Μετά τη σύντηξη, τα σύμπλοκα SNAREs αποσυναρμολογούνται με τη μεσολάβηση των πρωτεϊνών NSF και α-SNAP και χρησιμοποιούνται σε νέους κύκλους κυστιδιακής μετακίνησης (48).

Πιο συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του κυστιδίου μεσολαβείται κυρίως από τη δράση των πρωτεϊνών Sar1/ARF και των πρωτεϊνών του καλύμματος. Η μετακίνηση του κυστιδίου πραγματοποιείται πάνω στις ίνες του κυτταροσκελετού. Η σύντηξη του κυστιδίου με την μεμβράνη-στόχο γίνεται μέσω των πρωτεϊνών Rabs, SNAREs, α-SNAP και NSF, όπως αναλύεται παρακάτω.

Κεντρικό ρόλο στην σωστή ροή του φορτίου έχουν οι πρωτεΐνες Rabs, οι οποίες είναι μικρές GTPάσες που είναι απαραίτητες για τη στόχευση των κυστιδίων στην κατάλληλη μεμβράνη στόχο (49). Οι Rabs στρατολογούνται στη μεμβράνη του κυστιδίου και αλληλεπιδρούν με τελεστές στις μεμβράνες-στόχους. Η δέσμευση της Rab-GTP σε έναν τελεστή οδηγεί στην πρόσδεση και στον ελλιμενισμό του κυστιδίου στην κατάλληλη μεμβράνη-στόχο.

Οι SNAREs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, υπεύθυνες για τη σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη στόχο. Οι v-SNAREs, που βρίσκονται στις επιφάνειες των κυστιδίων μεταφοράς, αλληλεπιδρούν με τις t-SNAREs, της μεμβράνης στόχου, σχηματίζοντας μία δομή που φέρει σε στενή επαφή τις δύο μεμβράνες, για να επιτευχθεί η σύντηξη. Έτσι, οι v-SNAREs «συνδέονται» με τις t-SNAREs όταν το κυστίδιο έχει φτάσει στο σωστό προορισμό και μπορεί με ασφάλεια να συντηχθεί με τη μεμβράνη του οργανιδίου-στόχου

και να παραδώσει το περιεχόμενό του. Τέλος, ανακύκλωση των SNAREs επιτυγχάνεται με τη δράση των NSF και α -SNAP, που αποσυναρμολογούν το σύμπλοκο των SNAREs ώστε να επιτευχθεί νέος κύκλος κυστιδιακής μεταφοράς.

Η εξειδίκευση στις διαδικασίες μεταφοράς, πρόσδεσης και σύντηξης του κυστιδίου με την κατάλληλη μεμβράνη στόχο είναι κρίσιμη για την ορθή ροή του φορτίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Το κύτταρο συντονίζει τις παραπάνω διαδικασίες με τη βοήθεια των πρωτεϊνών Rabs και SNAREs. Τα μέλη της οικογένειας Rab εντοπίζονται σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και αλληλεπιδρούν με συστατικά του καλύμματος, πρωτεΐνες κινητήρες και SNAREs, λειτουργώντας ως οργανωτές όλων σχεδόν των σταδίων μεμβρανικής μεταφοράς των ευκαρυωτικών κυττάρων (50).

1.4 RabGTPάσες

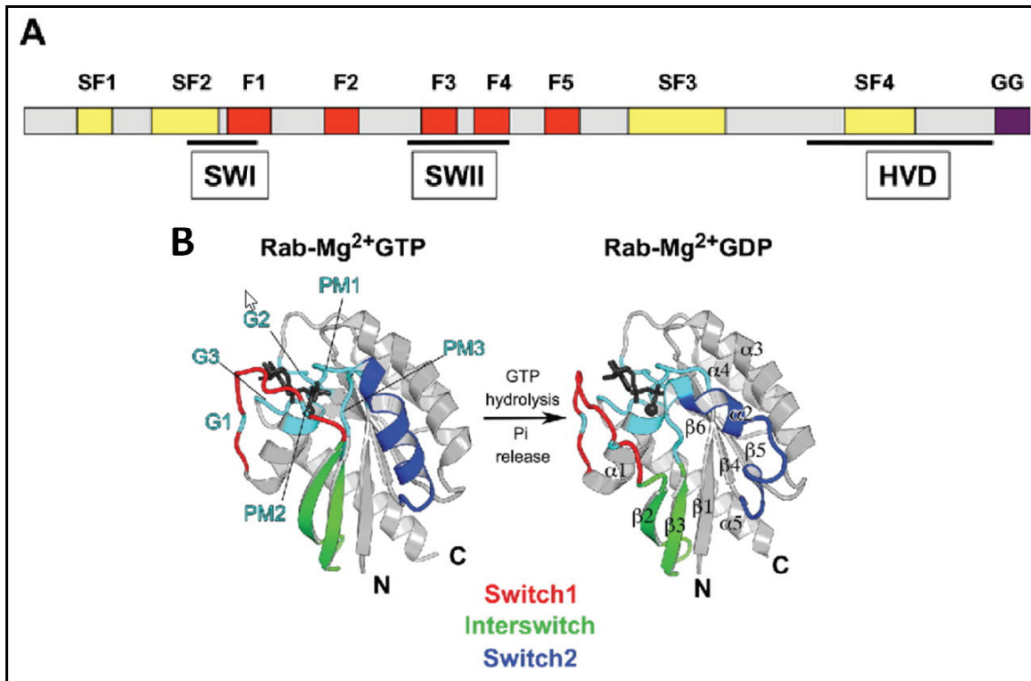
1.4.1 RabGTPάσες, κατάταξη και δομή

Οι πρωτεΐνες Rabs αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια μικρών GTPασών που ανήκουν στην υπεροικογένεια Ras (51), με περίπου 70 μέλη ταυτοποιημένα στους ανθρώπους. Οι Rabs πλέον έχουν αναδειχθεί ως η μεγαλύτερη και πιο ποικίλη οικογένεια που καθορίζουν την ταυτότητα των κυστιδίων και των οργανιδίων (49-53).

Οι Rab GTPases αρχικά βρέθηκαν στους ζυμομύκητες και από τότε έχουν βρεθεί σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα που έχουν μελετηθεί, συμπεριλαμβανομένου του σακχαρομύκητα (11 μέλη), του *C. Elegans* (29 μέλη) και της *Drosophila melanogaster* (26 μέλη). Αυτός ο μεγάλος αριθμός και η ευρεία κατανομή τους υπογραμμίζουν την τεράστια σημασία τους στη βιολογία των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε αρκετές περιπτώσεις μάλιστα, μια Rab των θηλαστικών μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά την αντίστοιχη της στο ζυμομύκητα, επιδεικνύοντας τη διατήρηση των λειτουργιών των πρωτεϊνών εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων (54). Είναι αξιοσημείωτο πως 5 Rabs (Rab1, Rab5, Rab6, Rab7 και Rab11) βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα, καταδεικνύοντας την ιδιαίτερη σημασία των μελών αυτών (55).

Οι Rabs αποτελούνται από έξι β -πτυχωτές επιφάνειες, περιστοιχιζόμενες από πέντε α -έλικες. Στη δομή αυτή υπάρχουν συντηρημένες περιοχές που εμπλέκονται στην πρόσδεση νουκλεοτιδίου γουανίνης και ιόντων μαγνησίου, G1-G3 και PM1-PM3, αντίστοιχα. Υπάρχουν ακόμη δύο περιοχές, οι switch I και switch II, που υπόκεινται σημαντική αλλαγή διαμόρφωσης μετά από πρόσδεση ή υδρόλυση του GTP (56). Ακόμη, στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο διαθέτουν μοτίβο πρενυλίωσης που περιλαμβάνει 2 κατάλοιπα

κυστεΐνης (CC), το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση των Rabs στη μεμβράνη (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14. Δομή των Rab GTPασών. (A) Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών μιας Rab. (B) Κρυσταλλική δομή της Rab Sec4 στον ζυμομόκητα, όταν προσδένει GTP ή GDP (55).

Μερικά δομικά χαρακτηριστικά της πρωτοταγούς δομής των Rabs συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και των μεμβρανών (57,58). Οι περιοχές δέσμευσης του GTP διατηρήθηκαν σε μεγάλο βαθμό στην εξέλιξη και καθιστούν τις Rabs αδρανείς, όταν είναι δεσμευμένες με το GDP, και ενεργές όταν προσδένουν GTP. Στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο, υπάρχει μία περιοχή που ονομάζεται Hypervariable Region, αποτελείται από 35-40 αμινοξέα, και εμφανίζει μικρό βαθμό ομοιότητας μεταξύ των μελών της οικογένειας των Rabs (54,59). Η υπερμεταβλητή περιοχή επιτρέπει τη στόχευση των Rabs σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες - τελεστές και θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για τον διακριτό ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους (60).

Επιπλέον, έχουν αναγνωριστεί στις Rabs οι περιοχές RabF (Rab family regions, RabF1-RabF5) που είναι συντηρημένες μόνο μεταξύ των Rabs και χρησιμεύουν για τη διαφοροποίηση τους από άλλα μέλη της υπεροικογένειας Ras. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται γύρω από τις περιοχές switch, και εμπλέκονται στη πρόσδεση γενικών ρυθμιστών (πρωτεΐνες GDI και REP) της λειτουργίας των Rabs. Αυτοί οι ρυθμιστές προσδένονται στη Rab με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από το νουκλεοτίδιο και αναγνωρίζουν όλες τις Rabs, χωρίς να παρουσιάζουν κάποια εξειδίκευση.

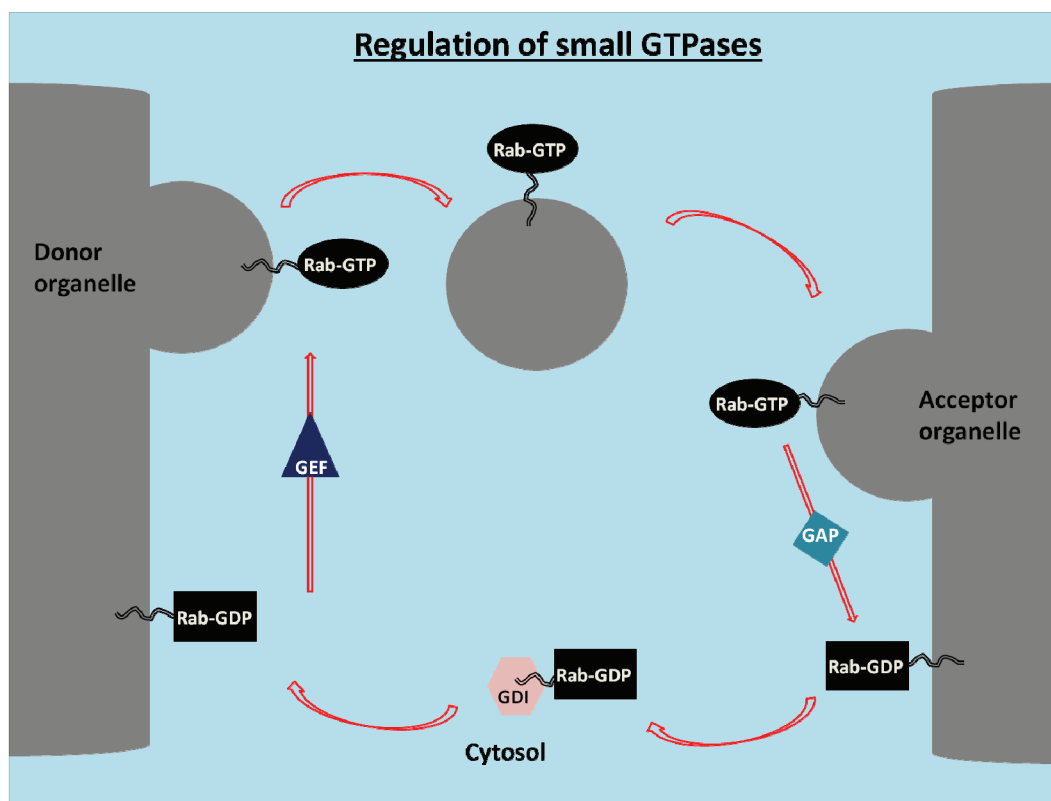
Οι πρωτεΐνες Rabs ακόμη, χρησιμοποιούν τις περιοχές switch μαζί με άλλες περιοχές για τον προσδιορισμό της εξειδίκευσης της δέσμευσης με πρωτεΐνες τελεστές, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες Ras, όπου η ειδικότητα της δέσμευσης καθορίζεται κυρίως από τις περιοχές switch. Αυτές οι περιοχές καθορισμού της ειδικότητας ονομάστηκαν περιοχές RabSF (Rab subfamily, RabSF1-RabSF4) (57). Έρευνες που μελέτησαν την κρυσταλλική δομή διαφόρων Rabs, έδειξαν πως οι περιοχές αυτές σχηματίζουν επιφάνειες υπεύθυνες για την πρόσδεση διαφορετικών τελεστών (61).

Τέλος, μελέτες κατέδειξαν πως οι περιοχές RabF και RabSF είναι σημαντικές για συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με τελεστές αλλά και με τις μεμβράνες (62). Θεωρείται, λοιπόν, ότι οι τελεστές προσδένονται στις RabF περιοχές, αναγνωρίζοντας τη GTP διαμόρφωση, και στις RabSF περιοχές για να προσδώσουν την ειδικότητα στη λειτουργία της Rab.

1.4.2 Ανακύκλωση των Rab πρωτεϊνών μεταξύ μεμβρανικών διαμερισμάτων

Οι Rabs λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες που εναλλάσσονται μεταξύ των διαμορφώσεων "on" και "off" που αντιστοιχούν στις καταστάσεις GTP και GDP, αντίστοιχα (63). Οι Rab GTPάσες προσδένοντας GDP βρίσκονται στην ανενεργό, ενώ προσδένοντας GTP στην ενεργό μορφή τους, σε αυτή δηλαδή που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες τελεστές. Η ανταλλαγή νουκλεοτιδίου είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον εντοπισμό των Rabs μεταξύ κυτταροπλάσματος και μεμβράνης (Εικόνα 1.15). Για τον εντοπισμό τους στη μεμβράνη, είναι απαραίτητη η πρενυλίωση. Έτσι, οι Rabs μετά τη σύνθεσή τους στα ριβοσώματα αναγνωρίζονται, στη GDP μορφή τους, από την πρωτεΐνη συνοδό των Rabs (Rab escort protein – REP). Μέσω του συμπλόκου αυτού η Rab παρουσιάζεται στο ένζυμο μεταφοράση II του γερανυλ γερανυλίου (geranylgeranyl transferase II – GGTaseII), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ομάδας 20 ανθράκων (γερανυλ-γερανύλιο) στις δύο κυστεΐνες του καρβόξυ-τελικού άκρου του μορίου. Η REP είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της πρενυλιωμένης Rab στην κατάλληλη μεμβράνη. Η μετατόπιση αυτή καταλύεται από τον παράγοντα εκτόπισης GDI (GDI displacement factor, GDF). Η μεμβρανική μετατόπιση ακολουθείται από ανταλλαγή του προσδεμένου GDP με GTP, διαδικασία που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες GEFs (Guanine Nucleotide – exchange Factors). Η σύνδεση της ενεργού μορφής της Rab (GTP μορφή) με κατάλληλες πρωτεΐνες - τελεστές επιτρέπει τη μεταφορά των κυστιδίων προς τη σωστή κατεύθυνση, δηλαδή προς το οργανίδιο-προορισμό.

Η μετάβαση της Rab από την ενεργή στην ανενεργή μορφή καταλύεται από την πρωτεΐνη GAP (GTPase Activating Protein), η οποία επάγει την ενεργότητα GTPάσης της Rab προκαλώντας έτσι την υδρόλυση του GTP από την Rab και την μετάβασή της στην GDP-ανενεργή μορφή. Στη συνέχεια, η Rab εξάγεται από τη θέση της στη μεμβράνη με την βοήθεια της πρωτεΐνης GDI (GDP Dissociation Inhibitor) και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, όπου παραμένει προσωρινά ως σύμπλοκο με την GDI. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο GDI-Rab στρατολογείται ξανά στην μεμβράνη, όπου διασπάται το σύμπλοκο και πραγματοποιείται η ενσωμάτωση της Rab στην μεμβράνη μέσω της πρενυλίωσής της. Έτσι, οι Rabs υπόκεινται σε διαδοχικούς κύκλους μεμβρανικής εισαγωγής και εξαγωγής (63-66).



Εικόνα 1.15. Σχηματική αναπαράσταση της ανακύκλωσης των Rabs μεταξύ μεμβρανικών διαμερισμάτων. Η Rab είναι συνδεδεμένη στη μεμβράνη μέσω μίας λιπιδιακής ουράς. Ένας παράγοντας GEF στην μεμβράνη δότη ενεργοποιεί τη Rab, καταλύοντας την απελευθέρωση του GDP, γεγονός που οδηγεί στην πρόσληψη του GTP. Στη συνέχεια, η Rab συσκευάζεται σε ένα εκκολλητόμονο κυστίδιο προκειμένου να διαμεσολαβήσει στην στόχευσή του στο οργανίδιο δέκτη και στην σύντηξή του με αυτό. Μετά τη σύντηξη, η GAP προκαλεί την απενεργοποίηση της Rab, μέσω επαγωγής της υδρόλυσης του GTP. Τέλος, η Rab, στην ανενεργή της πλέον μορφή, εξάγεται από τη μεμβράνη από την GDI, η οποία την μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα και την επανατοποθετεί στην μεμβράνη προέλευσής της, για να ολοκληρωθεί ο κύκλος.

Η ικανότητά τους να εναλλάσσονται μεταξύ αυτών των δυο διαμορφώσεων συμβάλλει στη χωρική και χρονική ρύθμιση της κυστιδιακής μεταφοράς (67).

1.4.3 Ο ρόλος των Rabs στην κυστιδιακή μεταφορά

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι Rabs είναι κύριοι ρυθμιστές της ενδοκυττάριας μεμβρανικής μεταφοράς (50,68). Διαφορετικές Rabs εντοπίζονται σε διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα προκειμένου να ελέγξουν την εξειδίκευση και την κατεύθυνση της κυστιδιακής μεταφοράς. Έτσι, οι Rabs συμβάλλουν στην αναγνώριση της ταυτότητας της μεμβράνης δέκτη (69) και εξασφαλίζουν ότι τα φορτία της μεμβράνης δότη μεταφέρονται στο σωστό προορισμό. Αν και ο πιο καλά μελετημένος ρόλος των Rabs είναι η εξειδικευμένη στόχευση των κυστιδίων στο οργανίδιο δέκτη και η σύντηξή τους με αυτό, έχει αναφερθεί ότι οι Rabs εμπλέκονται και στα υπόλοιπα στάδια της μεμβρανικής μετακίνησης που προηγούνται της στόχευσης, όπως στην επιλογή του μεταφερόμενου φορτίου, στη δημιουργία του κυστιδίου και στην απώλεια του καλύμματος του κυστιδίου. Το σύνολο των παραπάνω δράσεων των Rabs επιτελούνται μέσω της αλληλεπίδρασης τους με συγκεκριμένους τελεστές (60). Πιο κάτω παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι διαφορετικές δράσεις των Rabs (Εικόνα 1.16).

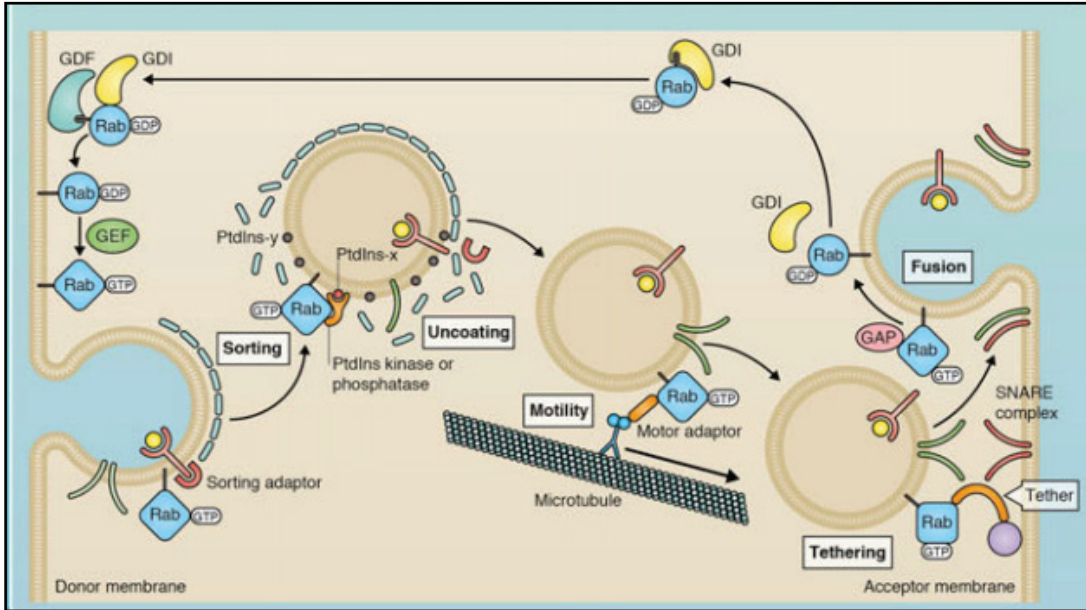
Διαλογή φορτίου: Η διαλογή του φορτίου στα εξειδικευμένα κυστίδια μεταφοράς είναι βασικός μηχανισμός της κυστιδιακής μεταφοράς. Έρευνες έχουν δείξει πως η διαλογή μεσολαβεί από αλληλεπιδράσεις διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (μεταφερόμενο πρωτεϊνικό φορτίο ή υποδοχείς του) με κυτταροπλασματικά συμπλέγματα των πρωτεϊνών του καλύμματος. Η Rab συνδεδεμένη με GTP ενεργοποιεί τον υποδοχέα διαλογής και το φορτίο μεταφέρεται σε ένα νεοσχηματιζόμενο κυστίδιο (70). Στη διασφάλιση της αυτής διαδικασίας περιλαμβάνονται και άλλοι παράγοντες όπως, η συνεργασία μεταξύ των Arf πρωτεϊνών και των ρυθμιστών των Rab GTPασών, η μεμβρανική καμπυλότητα και η λιπιδιακή σύσταση (68).

Απώλεια καλύμματος: Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν πως οι Rabs εμπλέκονται στην απώλεια του καλύμματος των κυστιδίων (49). Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι οι Rabs είναι βασικοί ρυθμιστές της κυστιδιακής μεταφοράς και μπορούν να ‘συνδέσουν’ την απώλεια του καλύμματος του κυστιδίου με την πρόσδεση και τη σύντηξη του με τη μεμβράνη στόχο. Συγκεκριμένα, το κάλυμμα σταθεροποιείται στην μεμβράνη με μια σειρά αλληλεπιδράσεων. Η ικανότητα των Rabs ή των αντίστοιχων GEFs να ανταγωνίζονται αλληλεπιδράσεις που συμμετέχουν στην σταθεροποίηση του καλύμματος μπορεί να διεγείρει την απελευθέρωση του καλύμματος. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση των Rabs

με κινάσες ή φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων αλλάζει τη σύσταση σε φωσφοϊνοσιτίδια του μεταφερόμενου κυστιδίου, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του καλύμματος που αλληλεπιδρούν με αυτά (71).

Μετακίνηση: Η κατεύθυνση της κυστιδιακής μεταφοράς μεσολαβείται, μερικώς, από τα ινίδια ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους, που είναι υπεύθυνοι για την τοπική και μεγάλο μήκους μεταφορά των κυστιδίων, αντίστοιχα. Η κινητήριος δύναμη για την μετακίνηση των κυστιδίων, παρέχεται από τις πρωτεΐνες-κινητήρες (motor proteins). Οι κινητήριες πρωτεΐνες συμμετέχουν στην κυστιδιακή μεταφορά, καθώς συνδέονται με κυστίδια, τα οποία αναγνωρίζουν ως φορτίο, και τα μεταφέρουν είτε προς την περιφέρεια ή προς το εσωτερικό του κυττάρου. Η πρόσδεσή τους στα κυστίδια απαιτεί αυστηρή ρύθμιση, για να επιτευχθεί η σωστή ροή του φορτίου. Οι Rabs, είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω των τελεστών τους, φαίνεται να ρυθμίζουν αυτή τη διαδικασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Rab27 που, μέσω του τελεστή της - MyRIP, διαμεσολαβεί τη σύνδεση των κυστιδίων με την πρωτεΐνη-κινητήρα myosin Va (72,73).

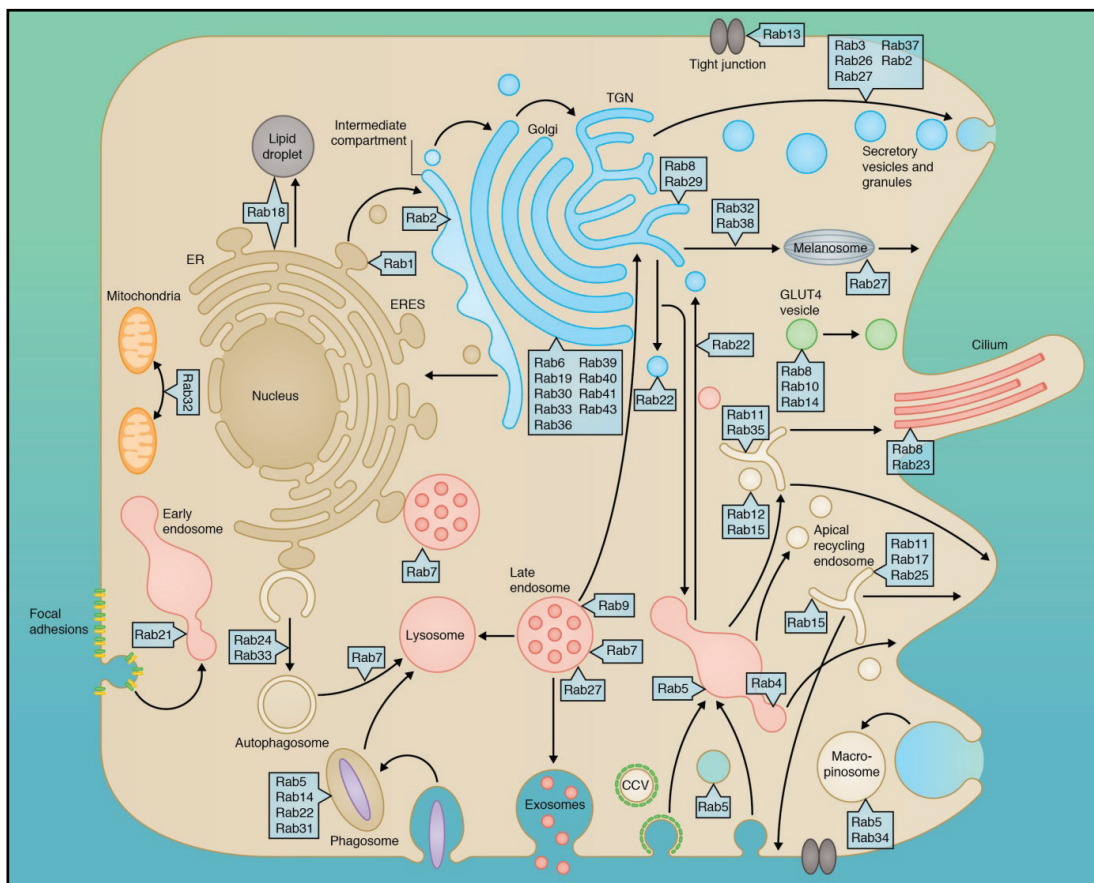
Ελλιμενισμός: Για να εξασφαλιστεί η πιστότητα της κυστιδιακής μεταφοράς, απαιτούνται παράγοντες που «προσδέουν» τα κυστίδια (παράγοντες ελλιμενισμού) στην μεμβράνη στόχο, πριν γίνει η σύντηξη. Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν οι τελεστές των Rabs, που περιλαμβάνουν κυρίως κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες αλλά και πρωτεϊνικά σύμπλοκα που στρατολογούνται στην μεμβράνη. Η Rab, δηλαδή, μπορεί να βρίσκεται στη μία μεμβράνη (κυστίδιο-δότη) και, μέσω του παράγοντα ελλιμενισμού/τελεστή (τον οποίο στρατολογεί στην μεμβράνη) αλληλεπιδρά με μία μεμβρανική πρωτεΐνη ή λιπίδιο της άλλης μεμβράνης, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο εξειδίκευση στην στόχευση του κυστιδίου. Εναλλακτικά, η Rab μπορεί να βρίσκεται και στις δύο μεμβράνες, οπότε ο τελεστής αποτελεί γέφυρα μεταξύ των δύο διαμερισμάτων (74). Επιπλέον, μέσω αυτών των τελεστών, η Rabs συνεργάζονται με τις SNAREs και τους ρυθμιστές τους για να επάγουν τη μεμβρανική **σύντηξη** (75).



Εικόνα 1.16. Ο ρόλος των Rabs στη διαδικασία της κυστιδιακής μεταφοράς. (Διαλογή/Sorting). Σε ένα νεοσχηματιζόμενο κυστίδιο, η Rab (στην ενεργό μορφή της) ενεργοποιεί τον υποδοχέα διαλογής. **(Απώλεια καλύμματος/Uncoating)** Η αλληλεπίδραση των Rabs με κινάσες και φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων αλλάζει τη σύσταση σε φωσφοϊνοσιτιδία του μεταφερόμενου κυστιδίου, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του καλύμματος που αλληλεπιδρούν με αυτά. **(Μετακίνηση/Mobility)** Οι Rabs, αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες-κινητήρες, μεσολαβούν τη μεταφορά των κυστιδίων κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και των ινιδίων ακτίνης. **(Ελλιμενισμός/Tethering)** Οι Rabs αλληλεπιδρούν με παράγοντες ελλιμενισμού (τελεστές/effectors/tethers), οι οποίοι διαμεσολαβούν ώστε να το κυστίδιο να προσδεθεί (ελλιμενισθεί) στην μεμβράνη στόχο. **(Σύντηξη)** Το σύμπλοκο Rab/τελεστής συνεργάζεται με τις SNAREs και τους ρυθμιστές τους ώστε να επιτευχθεί η σύντηξη του κυστιδίου με την μεμβράνη δέκτη. Με την ολοκλήρωση της σύντηξης, η Rab μετατρέπεται στην ανενεργό μορφή της και, σε σύμπλοκο με τη GDI, μεταφέρεται πρώτα στο κυτταρόπλασμα και έπειτα στην μεμβράνη-δότη, για ένα νέο κύκλο μεταφοράς (70).

1.4.4 Οι Rabs ως οριστές της ταυτότητας των μεμβρανικών διαμερισμάτων

Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον ότι τα διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα έχουν διακριτές Rabs στην επιφάνειά τους (76). Η παρατήρηση αυτή συντέλεσε στη διατύπωση της θεωρίας πως οι Rabs ίσως ορίζουν την ταυτότητα των διαμερισμάτων. Παραδείγματος χάρη, η Rab1 εντοπίζεται στο ER, η Rab2 εντοπίζεται στο ER–Golgi ενδιάμεσο διαμέρισμα, η Rab5 στα πρώιμα ενδοσώματα και η Rab7 στα όψιμα (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17. Σχηματική αναπαράσταση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των Rabs σε ένα επιθηλιακό κύτταρο Η Rab1 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και μεσολαβεί την κυστιδιακή μεταφορά μεταξύ ER–Golgi. Η Rab2 εντοπίζεται στο ER–Golgi ενδιάμεσο διαμέρισμα και ρυθμίζει την Golgi–ER μεταφορά. Στο Golgi εντοπίζονται οι Rab6, Rab19, Rab30, Rab33, Rab36, Rab39, Rab40, Rab41 και Rab43 και μεσολαβούν τη μεταφορά κυστιδίων μεταξύ των διαμερισμάτων του Golgi. Οι Rab24 και Rab33 ρυθμίζουν το σχηματισμό αυτό-φαγοσωμάτων. Η Rab8 ρυθμίζει την ιδιοσυστατική μεταφορά από το TGN στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, και συμμετέχει στη μετατόπιση των κυστιδίων του μεταφορέα GLUT4 μαζί με τις Rab10 και Rab14. Οι Rab2, Rab3, Rab26, Rab27 και Rab37 ρυθμίζουν διάφορες μορφές ρυθμιζόμενης έκκρισης, ενώ η Rab27 είναι υπεύθυνη και για τη μετατόπιση των μελανοσωμάτων στην περιφέρεια του κυττάρου. Οι Rab32 και η Rab38 συμμετέχουν στη βιογένεση των μελανοσωμάτων, ενώ η Rab32 ρυθμίζει και τη μιτοχονδριακή σχάση. Η Rab13 ρυθμίζει τη συγκρότηση των πυκνών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, και η Rab18 ρυθμίζει το σχηματισμό σταγονιδίων λίπους. Η Rab22 μεσολαβεί στη μεταφορά από το TGN στα πρώιμα ενδοσώματα αλλά και αντίστροφα, ενώ η Rab5, που εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, τα φαγοσώματα, τα καβεοσώματα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση, τη σύντηξη ενδοσωμάτων με κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη (clathrin-coated vesicles, CCVs), τη μακροπνοκυττάρωση (συμμετέχει και η Rab34) και την ωρίμανση των πρώιμων φαγοσωμάτων (συμμετέχουν και οι Rab14, Rab21 και Rab22). Η Rab21 ρυθμίζει ακόμη την ενδοκυττάρωση ιντεγκρινών. Οι Rab11 και Rab35 μεσολαβούν στην ανακύκλωση από τα ενδοσώματα ανακύκλωσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η Rab4 μεσολαβεί στην ανακύκλωση από τα πρώιμα ενδοσώματα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η Rab15 συμμετέχει στη μεταφορά από τα πρώιμα ενδοσώματα στα ενδοσώματα ανακύκλωσης και τη μεταφορά των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης από την κορυφαία στη βασεοπλευρική μεμβράνη. Οι Rab11, Rab17 και Rab25 ρυθμίζουν τη μεταφορά των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης στην κορυφαία μεμβράνη. Η Rab7 ρυθμίζει την ωρίμανση των όψιμων ενδοσωμάτων και φαγοσωμάτων και τη σύντηξή τους με τα λυσοσώματα, ενώ, η Rab9, ρυθμίζει τη μεταφορά από τα όψιμα ενδοσώματα στο TGN. Τέλος οι Rab8 και Rab23 συμμετέχουν στη ρύθμιση της λειτουργίας των βλεφαρίδων (70).

Τι είναι όμως αυτό που κάνει μία Rab να εντοπίζεται σε ένα συγκεκριμένο μεμβρανικό διαμέρισμα και όχι σε κάποιο άλλο και με ποιο μηχανισμό επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη στόχευση των διαφορετικών Rabs στα ξεχωριστά μεμβρανικά διαμερίσματα;

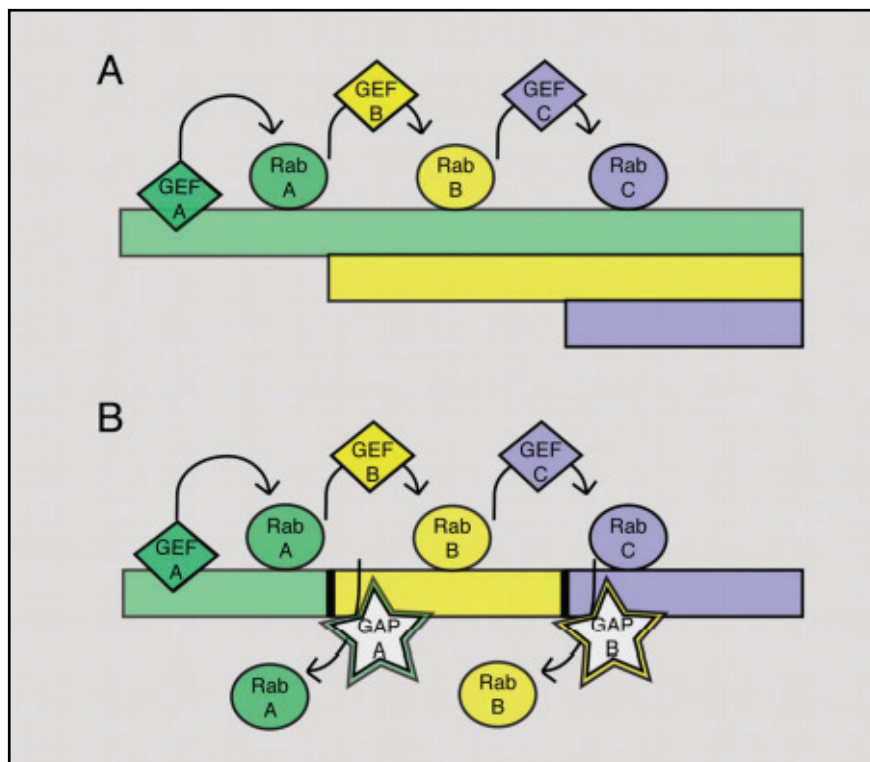
Οι πρώτες έρευνες σχετικά με τον εντοπισμό των Rabs (77-79) αναφέρουν πως οι υπερμεταβλητές περιοχές στο καρβο-τελικό άκρο τους είναι υπεύθυνες για τον διακριτό εντοπισμό τους, παρατήρηση η οποία απορρίφθηκε, καθώς μεταγενέστερες μελέτες από τους Ali et al. (64) έδειξαν ότι αρκετές Rabs εντοπίζονται στο σωστό ενδοκυττάριο διαμέρισμα, παρά τις σημαντικές μεταλλάξεις που είχαν στις υπερμεταβλητές περιοχές τους. Επόμενες μελέτες (80) αναφέρουν ότι οι τελεστές των Rabs είναι υπεύθυνοι για τον εντοπισμό τους, δείχνοντας πως η μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων ενός τελεστή της Rab9 (TIP47) προκάλεσε αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης σε σημαντικό βαθμό. Αναφορικά με τα παραπάνω, μελέτη των Aivazian et al. (81) δείχνει ότι η αλληλεπίδραση της Rab9 με τον τελεστή της TIP47 είναι υπεύθυνη για τη εξειδικευμένη στόχευση της Rab σε κατάλληλο μεμβρανικό διαμέρισμα. Συγκεκριμένα, χημικά μόρια των πρωτεϊνών Rab1 και Rab5 που διέθεταν την υπερμεταβλητή περιοχή της Rab9 (η οποία αλληλεπιδρά με τον TIP47) μπορούν να μετατοπιστούν από το Golgi (κανονική θέση της Rab1) ή από το πρώιμο ενδόσωμα (κανονική θέση της Rab5) στο όψιμο ενδόσωμα (θέση της Rab9) έπειτα από υπερέκφραση του τελεστή TIP47 (81). Αυτή η μελέτη υποδεικνύει τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rabs και τελεστών τους στον προσδιορισμό της κατάλληλης θέσης εντοπισμού τους.

1.4.5 Πιθανοί μηχανισμοί ενορχηστρωμένης στόχευσης διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο.

Παρά το ότι οι Rabs εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς το οργανίδιο που εντοπίζονται, είναι δυνατό να συνυπάρχουν πολλαπλές Rabs στο ίδιο κυτταρικό διαμέρισμα ή κυστίδιο (82). Στην περίπτωση αυτή, είναι δυνατό οι Rabs να κατανέμονται σε διαφορετικές υποπεριοχές της μεμβράνης. Η ύπαρξη των διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει τους διαφορετικούς στόχους που μπορεί αυτό να έχει (82). Έτσι, στο μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης βρέθηκε πως η Rab4, η Rab5 και η Rab11 στρατολογούνται σε διαφορετικές υποπεριοχές των πρώιμων ενδοσωμάτων, ρυθμίζοντας την ανακατανομή συγκεκριμένων μεμβρανικών περιοχών τους (82). Αυτή η ασύμμετρη κατανομή των Rabs φαίνεται πως δίνει τη δυνατότητα στις Rabs να εκδηλώνουν

διαφορετικό ρόλο στη λειτουργία των κυστιδίων, καθώς η Rab5 υποδέχεται τα ενδοκυτταρωμένα κυστίδια, ενώ οι Rab4 και Rab11 καθορίζουν την σύντομη και την αργή ανακύκλωση φορτίου προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα φέρουν σε πέρας σύνθετες μετακινήσεις φορτίου μεταξύ των διαφορετικών υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Ακόμη, η ύπαρξη στενά συγγενικών Rabs στα ίδια οργανίδια και η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με κάποιους κοινούς τελεστές αποτελεί μηχανισμό εφεδρείας του κυττάρου, που σε περίπτωση απώλειας της μιας Rab να διασφαλίζεται η ολοκλήρωση της μεταφοράς (83). Συνεπώς, ειδικοί συνδυασμοί Rabs μπορεί να συνιστούν έναν "κώδικα Rab", ορίζοντας τις ταυτότητες των ενδοκυττάρων μεμβρανικών οργανιδίων (84).

Τέλος, για την ενορχηστρωμένη στόχευση, διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο, έχουν προταθεί δύο μοντέλα. Το πρώτο, προτείνει πως μία Rab μπορεί να ρυθμίζει την ενεργοποίηση της επόμενης Rab, στρατολογώντας τον GEF της. Έτσι, πολλαπλές Rabs μπορούν να βρίσκονται ταυτόχρονα στο ίδιο οργανίδιο, όπως και οι τελεστές τους (74). Το δεύτερο μοντέλο προσθέτει στον παραπάνω μηχανισμό και τις GAPs, οι οποίες απενεργοποιούν και απομακρύνουν την προηγούμενη δραστική Rab. Συγκεκριμένα η δευτερογενώς ενεργοποιημένη Rab μπορεί να στρατολογήει ένα σύμπλεγμα τελεστών που να περιλαμβάνει μία GAP για την πρώτη Rab. Έτσι, η παρουσία των GAP μπορεί να οξύνει τα όρια μεταξύ των επιμέρους υποπεριοχών των Rabs στο ίδιο οργανίδιο (Εικόνα 1.18). Ο μηχανισμός αυτός έχει προταθεί στην περίπτωση μετατροπής των πρώιμων Rab5-θετικών ενδοσωμάτων σε Rab7-θετικά όψιμα ενδοσώματα (50, 85).



Εικόνα 1.18. Πιθανά μοντέλα ενορρηστρωμένης στόχευσης διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο. (A) Ο GEF της RabA, ενεργοποιεί τη RabA, η οποία στρατολογεί τον GEF της RabB, η οποία στη συνέχεια στρατολογεί τον GEF της RabC με σκοπό την ενεργοποίησή της. Σε αυτό το μοντέλο οι RabA, RabB, RabC μπορούν να βρίσκονται και οι τρεις ταυτόχρονα στο ίδιο οργανίδιο. (B) Στο δεύτερο μοντέλο, προσθέτονται στον παραπάνω μηχανισμό και οι GAPs, που απομακρύνουν τις προηγούμενες δραστικές Rabs. Συγκεκριμένα, η 2^η Rab στρατολογεί ένα σύμπλοκο τελεστών που περιλαμβάνει μια GAP για την πρώτη Rab, προκαλώντας έτσι την απενεργοποίησή της. Έτσι, η παρουσία των GAP οξύνει τα όρια μεταξύ των επιμέρους υποπεριοχών των Rabs στο ίδιο οργανίδιο (86).

1.4.6 Οι Rabs των εκκριτικών κυστιδίων

Η εκκριτική οδός είναι μια διαδικασία χαρακτηριστική των κυττάρων που εξειδικεύονται στην έκκριση, όπως τα ενδοκρινικά κύτταρα και οι νευρώνες. Αποτελείται από διαφορετικά στάδια που εξαρτώνται από την ειδική μεταφορά πρωτεϊνών σε εκκριτικά κυστίδια. Οι βιοχημικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει μια σειρά πρωτεϊνικών οικογενειών που προσδίδουν ταυτότητα στα κυστίδια αυτά και ειδικότητα στη μεταφορά τους. Μεταξύ αυτών είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών Rab.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί πολλές Rab πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Rab3, Rab11, Rab18 και Rab27, που ρυθμίζουν την εξωκυττάρωση σε νευροενδοκρινικά κύτταρα, με απευθείας αλληλεπίδραση τους με εκκριτικά οργανίδια. Συγκεκριμένα, η Rab27 προωθεί την διεγερμένη έκκριση στα κύτταρα PC12, ενώ οι Rab3, Rab11 και η Rab18 έχουν αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν αρνητικά την έκκριση στους νευρώνες. Η Rab3 έχει

επίσης αναφερθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά την έκκριση και στα παγκρεατικά β-κύτταρα και στα κύτταρα επινεφριδίων χρωμαφίνης Εντούτοις, αν και η Rab3 και η Rab18 συν-εκφράζονται σε νευροενδοκρινικά κύτταρα και φαίνεται να εμφανίζουν παρόμοιες λειτουργίες περιορίζοντας την απελευθέρωση των εκκριτικών οργανιδίων, δεν συνυπάρχουν στην επιφάνεια του ίδιου πληθυσμού των εκκριτικών κυστιδίων, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι δρουν σε διαφορετικά στάδια της εκκριτικής διαδικασίας (87).

Πιο ειδικά, η Rab3 έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με εκκριτικά κυστίδια που βρίσκονται σε στενή τοποθέτηση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, υποδεικνύοντας ένα ρόλο γ'αυτήν στα τελικά στάδια της εξωκυττάρωσης των κυστιδίων (δηλαδή: ελλιμενισμό και σύντηξη) (88,89). Ωστόσο, η ανάλυση των εκκριτικών κυστιδίων που έχουν Rab18 αποκάλυψε ότι βρίσκονται σε απόσταση από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, γεγονός που δεν συνάδει με εκκριτικά κυστίδια στο στάδιο ελλιμενισμού, πράγμα που υποδηλώνει ότι η Rab18 δρα σε προηγούμενα στάδια της εκκριτικής διαδικασίας (87).

Τέλος, η Rab3 μαζί με τις Rab15 και Rab27 έχουν βρεθεί να ρυθμίζουν την έκκριση σε ενδοθηλιακά κύτταρα (90). Επιπλέον, η Rab26, η Rab27 και η Rab37 εντοπίζονται αποκλειστικά σε εκκριτικά κυστίδια, και η Rab3 μαζί με τις 3 παραπάνω Rabs, συγκροτούν ένα μικρό κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο και αναφέρονται ως εκκριτικές Rabs (91). Από 'όλα τα παραπάνω γίνεται σαφές πως η ρύθμιση της έκκρισης των εξειδικευμένων κυστιδίων είναι υπόθεση αρκετών Rabs.

Προκειμένου να βρεθούν οι Rabs που σχετίζονται με την έκκριση, πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες πρωτεομικής εκκριτικών κυστιδίων (92-94) και μέθοδοι μικροσκοπίας (90) (Πίνακας 1.1). Ωστόσο, για τις περισσότερες Rabs αυτών των κυστιδίων, ο ρόλος τους παραμένει ακόμη ασαφής.

Εκκριτικά οργανίδια	Rabs
Εκκριτικά κυστίδια νευρικών κυττάρων	Rab1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 33, 35
Ζυμογόνα κοκκία παγκρεατικών κυττάρων	Rab1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 18, 26, 27, 35
Κοκκία ινσουλίνης παγκρεατικών κυττάρων	Rab1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 27, 35, 37

Λυτικά κοκκία κυττάρων φυσικών φονέων	Rab1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 21, 27, 33, 35, 37, 39
Πυκνά κοκκία νευροενδοκρινών PC12 κυττάρων	Rab3, 18, 27, 33, 37
Weibel Palade Bodies ενδοθηλιακών κυττάρων	Rab3, 15, 27, 33, 37

Πίνακας 1.1. Rab GTPάσες των εκκριτικών κυστιδίων

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες υπήρξε μεγάλη συνεισφορά στην εξακρίβωση της εξειδικευμένης συμμετοχής κάθε πρωτεΐνης Rab στην ενδομεμβρανική οργάνωση και στην εκκριτική διαδικασία. Παρόλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλομορφία των Rabs στα θηλαστικά, και τον υψηλό αριθμό ρυθμιστών και τελεστών τους, είναι προφανές ότι υπάρχει ακόμα πολύς δρόμος μέχρι να έχουμε μια ενοποιητική άποψη για τη συμμετοχή των Rab πρωτεϊνών στη φυσιολογία του κυττάρου, υπό κανονικές και παθολογικές συνθήκες. Αφού καθοριστεί η συγκεκριμένη θέση και η πιθανή λειτουργία των Rab στην εκκριτική διαδικασία, η επόμενη πρόκληση θα είναι να προσδιοριστεί η χωροχρονική οργάνωσή τους.

1.5 Μηχανισμοί έκκρισης των WPBs

Η σύντηξη των WPBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη ευοδώνεται από τη δράση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών SNAREs, οι οποίες υπάρχουν τόσο στη μεμβράνη των WPBs όσο και στην κυτταροπλασματική. Αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους οι SNAREs φέρουν τις μεμβράνες σε στενή επαφή, γεγονός που επιφέρει τη σύντηξη. Ένας περιορισμένος αριθμός SNAREs πρωτεϊνών έχουν βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στην εξωκυττάρωση των WPBs (95, 96). Πρόκειται για τις VAMP3, VAMP8, syntaxin 4 και SNAP23. Τόσο η VAMP3 όσο η VAMP8 (των WPBs) μπορούν να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα με δύο SNAREs της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τη syntaxin 4 και τη SNAP23, απαραίτητο για τη σύντηξη των WPBs (96, 97). Η ελάττωση της SNAP23 προκαλεί σημαντική πτώση στην διεγερμένη απελευθέρωση του vWF σε κύτταρα HUVE αλλά και σε HDMVEC (ανθρώπινα δερματικά μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα) (98). Η μείωση της syntaxin 4 προκαλεί μείωση στην ποσότητα της

P-σελεκτίνης που υπάρχει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και επίσης διαταράσσει την πρόσφυση των ουδετερόφιλων, υποδηλώνοντας την αναστολή της εξωκυττάρωσης των WPBs (99).

Κάποιες πρωτεΐνες που δεσμεύουν syntaxin, και ρυθμίζουν την εξωκυττάρωση των WPBs, έχουν επίσης αναγνωρισθεί. Η STXBP5 συνδέεται με τη syntaxin 4, και ενεργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της εξωκυττάρωσης των WPBs. Η μείωση της STXBP5 αυξάνει τη διεγερόμενη έκκριση του vWF στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η αποσιώπηση της σε ποντίκια, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα του vWF στο πλάσμα (97). Αντίθετα, στα HUVECs, η STXBP1 φαίνεται να είναι θετικός ρυθμιστής της εξωκυττάρωσης των WPBs και η μείωσή της να μειώνει την διεγερμένη έκκριση (100).

Από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Rabs, η Rab27a, η Rab3a/b/d, η Rab15, η Rab33a και η Rab37 έχουν βρεθεί να εντοπίζονται στα WPBs (90, 101). Για την Rab27a, την πιο καλά μελετημένη Rab των WPBs, βρέθηκε πως ο εντοπισμός της στα WPBs εξαρτάται από το βαθμό ωρίμανσης τους, με την πρωτεΐνη να εντοπίζεται μόνο στα ώριμα οργανίδια. Η Rab27a εμποδίζει τα ανώριμα WPBs να εκκριθούν, αφού, μέσω του τελεστή MyRIP, τα εγκλωβίζει στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (102). Οι Rab3, Rab15, Rab27a και Munc13-4, γνωστή και ως UNC13D, που αποτελεί κοινό τελεστή της Rab15 και της Rab27a, έχουν αποδειχθεί ότι είναι σημαντικές για την απελευθέρωση του vWF μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με επαγωγείς της εξωκυττάρωσης (90, 101, 103, 104). Περαιτέρω, οι Rab27a και Rab3 (ισομορφές b και d) μοιράζονται επίσης έναν τελεστή, την πρωτεΐνη Slp4-a (synaptotagmin τύπου 4, γνωστή και ως SYTL4) (103). Η Slp4-a στρατολογείται στα WPBs μέσω της Rab3 και δρα ως θετικός ρυθμιστής της απελευθέρωσης του vWF (103). Η ισορροπία μεταξύ της Rab27a που δεσμεύεται στους τελεστές MyRIP ή Slp4-a μπορεί να ελέγξει την εξωκυττάρωση. Συγκεκριμένα, η δέσμευση της Rab27a στην Slp4-a δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab27a και MyRIP, διακόπτοντας έτσι την αγκυροβόληση των WPBs στον κυτταροσκελετό της ακτίνης και προάγει την έκκριση τους (102,103). Αναφορικά με τη Rab3d, βρέθηκε πως η πρωτεΐνη αυτή στην ενεργό μορφή της προκαλούσε εμφάνιση μεγαλύτερων, σφαιρικών WPBs, ενώ παρεμπόδιζε την έκκρισή τους. Αντίθετα, υπερέκφραση της ανενεργούς μορφής της Rab3d οδήγησε σε μικρότερο αριθμό WPBs στα HUVEC (101).

1.6 Σκοπός της εργασίας

Από τα παραπάνω προκύπτει πως η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την έκκριση των WPBs έχει μεγάλη σημασία, όχι μόνο για να κατανοήσουμε καλύτερα την οργάνωση του ενδοθηλιακού κυττάρου σε επίπεδο κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, αλλά και επειδή η γνώση αυτή θα επέτρεπε τον έλεγχο των λειτουργιών πήξης του αίματος, της φλεγμονής και της αγγειογένεσης, μέσω ρύθμισης της έκκρισης των WPBs.

Συνεπώς, δεδομένου ότι:

1. οι Rabs παίζουν βασικό ρόλο σχεδόν σε όλα τα στάδια της κυστιδιακής διακίνησης (σχηματισμός κυστιδίου από τη μεμβράνη «δότη», μετακίνηση, ελλιμενισμός και σύντηξη με τη μεμβράνη «δέκτη»),
2. στην μεμβράνη των WPBs στρατολογούνται πέντε Rabs, οι Rab3, 15, 27, 33 και 37 (90), των οποίων ο ρόλος παραμένει μέχρι σήμερα αδιευκρίνιστος,
3. ο χρόνος και η σειρά στρατολόγησης των Rabs είναι ενδεικτικά στοιχεία του ρόλου που αυτές διαδραματίζουν στα διάφορα στάδια της κυστιδιακής διακίνησης, αλλά και του ρόλου που η κάθε μια διαδραματίζει στην στρατολόγηση της άλλης,

προκύπτουν τα εξής κύρια ερωτήματα, η προσέγγιση των οποίων αποτέλεσε στόχο της παρούσας διατριβής:

1) Ποια είναι η σειρά και ο χρόνος στρατολόγησης των 5 Rabs των WPBs στη μεμβράνη των οργανιδίων αυτών?

2) Ποιος είναι ο ρυθμός ανακύκλωσης των Rab πρωτεϊνών μεταξύ μεμβράνης των WPBs και κυτταροπλάσματος των ενδοθηλιακών κυττάρων?

3) Ποιος είναι ο μηχανισμός ελέγχου της χωρο-χρονικής δυναμικής των WPB-Rabs?

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Τα αντιδραστήρια PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) και ATP προήλθαν από την εταιρία Sigma και χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 100 ng/ml και 100 μM, αντίστοιχα. Ο ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας VEGF ήταν της εταιρίας ImmunoTools και χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 50 ng/ml ενώ η ανθρώπινη α-θρομβίνη από την Enzyme Research Laboratories σε συγκέντρωση 1 U/ml.

Το πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι του mcherry (AB0040-200) προήλθε από την SICGEN και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:100 στους ανοσοφθορισμούς. Το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της Rab27a 4th bleed προήλθε από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (90), καθαρίστηκε από την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα (μέλος του εργαστηρίου) με χρήση sulfolink gel και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1000 στην ανοσοαποτύπωση κατά western. Το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του GFP είναι προϊόν συνεργασίας μας με το εργαστήριο της Χ. Μπολέτη (Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα) και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1.500 στους ανοσοφθορισμούς. Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ακτίνης (MAB1501) προήλθε από την εταιρία Millipore-Sigma και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:10.000 στην ανοσοαποτύπωση κατά western. Το μονοκλωνικό και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου vWF (M0616 (ποντικού), A0082 (κονίκλου)), ήταν από την εταιρία Dako cytomation και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:100 και 1:300, αντίστοιχα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του Flag (M5 F4042) ήταν της εταιρίας Sigma και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:2.000 στους ανοσοφθορισμούς. Τα δεύτερα αντισώματα, αντι-IgG κονίκλου ή ποντικού, συζευγμένα με Alexa 488, 594 ή 680, ήταν της εταιρίας Invitrogen και χρησιμοποιήθηκαν στους ανοσοφθορισμούς σε αραιώση 1:300. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) αγοράστηκαν από την εταιρεία Jackson Immunoresearch και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:5.000. Το 2^ο αντίσωμα έναντι της IgG αίγας, συζευγμένο με 568 (CFTM568, 20106) ήταν της εταιρίας Biotium και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:500. Το θρεπτικό μέσο απεικόνισης – imaging medium (Minimum Essential Medium Eagle, M3024-10X1L, οπτικά διαυγές ρυθμισμένο διάλυμα, με HEPES και pH 7,4) που χρησιμοποιήθηκε για τη μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο και για τα πειράματα FRAP

ήταν από την εταιρία Sigma-Aldrich και τοποθετήθηκε σε κατάλληλα για μικροσκοπία πιάτα της εταιρίας Ibidi (μ-Dish^{35mm, high}, 81156).

2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας και χειρισμού κυττάρων

2.2.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC), απομονώθηκαν από φρέσκο ομφάλιο λώρο, ο οποίος μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας του διατηρήθηκε στους 4°C. Μετά από ψηλάφηση, εντοπίστηκε η φλέβα του ομφάλιου λώρου. Με τη χρήση σύριγγας πλύθηκε 2 φορές με 20 ml διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffer Saline, PAA Laboratories GmbH). Ακολούθως, φράχθηκαν τα άκρα του λώρου, με τη βοήθεια βαλβίδων τριών σημείων (three way stop cocks) και δέθηκαν με χειρουργικό νήμα. Έπειτα η φλέβα διαποτίστηκε με 0.1% διάλυμα κολλαγενάσης (Collagenase type I, LS004196, Worthington) σε PBS και ο λώρος επώαστηκε σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 10 λεπτά. Για την απενεργοποίηση της κολλαγενάσης, ο λώρος πλύθηκε με 10 ml πλήρες θρεπτικό υλικό για HUVEC. Ακολούθησαν πλύσεις με διάλυμα φωσφορικών PBS, 2x20 ml. Το διάλυμα (50 ml συνολικά) συλλέχθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρησης, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 1.100 rpm και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού για HUVEC το οποίο καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο.

2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 100 mm, που έφεραν επίστρωση κολλαγόνου. Για την επίστρωση με κολλαγόνο, τα πιάτα επώαστηκαν για 20 λεπτά με κολλαγόνο αουραιίου τύπου I, σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, με 5% CO₂, και πλύθηκαν 2 φορές με PBS. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν M199 της εταιρίας Sigma εμπλουτισμένο με 20% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS, Biosera), 0,035 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) απομονωμένο από εγκέφαλο βοός (εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο απομόνωσης στο εργαστήριό μας), 0,05 IU ηπαρίνης/ml (H3149, Sigma), 1% L-γλουταμίνη (Gibco) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Antimycotic-Antibiotic, Invitrogen). Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά σε αραιώση 1:4. Στα πειράματα της παρούσας έρευνας

χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 1 και 2. Ανάλογα με τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος τα κύτταρα αναπτύχθηκαν είτε σε πιάτα 24 θέσεων, είτε σε υάλινες καλυπτρίδες, είτε σε κατάλληλα πιάτα μικροσκοπίας - *ibidi*.

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες ήταν ελεύθερα ενδοτοξίνης. Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 37°C, και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA ή siRNAs

Για τη διαμόλυνση κυττάρων HUVE με DNA χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontex). Τα κύτταρα, τη στιγμή της διαμόλυνσης, βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 60-70% και είχαν ομοιόμορφη κατανομή στο τρυβλίο. Το υλικό διαμόλυνσης αποτελούταν από το λιπίδιο METAFECTENE Pro, σε αναλογία με το DNA 3:1, μέσα σε διάλυμα M199 (χωρίς την προσθήκη εμβρυικού ορού βοός, ECGS, ηπαρίνης, L-γλουταμίνης, πενικιλίνης, και στρεπτομυκίνης). Μετά από επώαση του σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονταν σε υλικό καλλιέργειας M199, εμπλουτισμένο με 5% FCS και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο στους 37°C, 5% CO₂. Μετά από 3 ώρες, αντικαταστάθηκε με πλήρες μέσο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες μετά από 48 ώρες επώασής τους.

Οι διαμολύνσεις με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a, πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE, (τα οποία βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 20-30% και είχαν ομοιόμορφη κατανομή στο τρυβλίο) με τη χρήση του λιπιδίου RNAiMax LIPOFECTAMINE (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αραίωση των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε το χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό υλικό OptiMEM I (Gibco). Η τελική συγκέντρωση του siRNA έναντι της Rab27a ήταν 50 nM. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν, στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες, μετά από 72 ώρες επώασής τους. Το siRNA έναντι της Rab27a προήλθε από την εταιρία Ambion και Biospring, και είχε αλληλουχία στόχευσης 5'-UCUCUGUAGAACGCUGUCG-3'.

2.2.4 Ενεργοποίηση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων με PMA προς εξωκυττάρωση των προϋπαρχόντων WPBs

Κύτταρα HUVE (που είχαν καλλιεργηθεί σε τρυβλίο 24-φρεατίων) πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα HBSS (Hank's Buffered Salt Solution, Biosera) και ακολούθησε προσθήκη του PMA (100 ng/ml), σε διάλυμα HBSS (με 20% HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid, Biosera)), και 0,1% BSA για 2 ώρες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Μετά το τέλος της επώασης, αφαιρέθηκε ο ενεργοποιητής, τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με πλήρες μέσο καλλιέργειας των ενδοθηλιακών κυττάρων, και έπειτα προστέθηκε σε αυτά πλήρες θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν ξανά σε κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Για την εξακρίβωση της εξωκυττάρωσης των προϋπαρχόντων WPBs, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0 έως 8 ώρες, όπου μηδέν θεωρείται ο χρόνος που αφαιρείται το PMA) και ακολούθησε ανοσοφθορισμός έναντι του ενδογενούς vWF.

Όταν κύτταρα HUVE είχαν διαμολυνθεί με DNAs, η ενεργοποίηση με PMA πραγματοποιήθηκε αφού είχαν περάσει 48 ώρες από τη στιγμή της διαμόλυνσης τους, ενώ κατά την πειραματική διαδικασία που τα κύτταρα είχαν διαμολυνθεί πρώτα με siRNAs έναντι της Rab27a και έπειτα με DNAs, η ενεργοποίησή τους με PMA πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με τα siRNAs.

2.2.5 Σύγκριση της βαθμού εξωκυττάρωσης των WPBs έπειτα από ενεργοποίηση κυττάρων HUVE με ATP, Thrombin, PMA, VEGF

Η ενεργοποίηση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε όταν αυτά βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 100%. Ως ενεργοποιητές χρησιμοποιήθηκαν οι παράγοντες ATP (100 μM), Thrombin (1 U/ml), PMA (100 ng/ml), VEGF (50 ng/ml). Κύτταρα HUVE (που είχαν καλλιεργηθεί σε τρυβλίο 24-φρεατίων) πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα HBSS. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τον κάθε ενεργοποιητή σε διάλυμα HBSS (με 20% HEPES και 0,1% BSA), για 2 ώρες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Μετά το τέλος της επώασης, αφαιρέθηκαν οι ενεργοποιητές, τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με πλήρες μέσο καλλιέργειας των ενδοθηλιακών κυττάρων, και έπειτα προστέθηκε σε αυτά πλήρες θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν ξανά σε κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Για την εξακρίβωση της έκκρισης του vWF, τα κύτταρα

μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0 έως 2 ώρες, όπου μηδέν θεωρείται ο χρόνος που αφαιρούνται οι ενεργοποιητές) και ακολούθησε ανοσοφθορισμός έναντι του ενδογενούς vWF. (Η πειραματική διαδικασία αναφέρεται στην ενότητα 3.2.2, Εικόνα 3.4)

2.2.6 Μέτρηση του εκκρινόμενου vWF, μετά από την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με PMA

Κύτταρα HUVE (που είχαν καλλιεργηθεί σε τρυβλίο 24-φρεατίων) πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) και ακολούθησε προσθήκη του PMA (100 ng/ml), σε διάλυμα HBSS με 20% HEPES και 0,1% BSA, για 2 ώρες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Μετά του πέρασ του χρόνου, το υλικό επώασης συλλέχτηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm για 7 λεπτά και το υπερκείμενο διατηρήθηκε στους 20°C. Για την ιδιοσυστατική έκκριση του vWF, κύτταρα επώαστηκαν μόνο με διάλυμα HBSS το οποίο περιείχε 20% HEPES και 0,1% BSA απουσία PMA. Η συλλογή των δειγμάτων για τη μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του vWF των παραπάνω πηγαδιών, πραγματοποιήθηκε με λύση των κυττάρων με διάλυμα 0,5% Triton – 1 mM EDTA σε PBS, φυγοκέντρηση των δειγμάτων, για 10 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4°C, και διατήρηση των υπερκείμενων στους -20°C. Για την ποσοτικοποίηση του vWF, ακολουθήθηκε μεθοδολογία τύπου ELISA (βλέπε 2.4.1).

2.3 Μοριακές μέθοδοι

2.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) - PCR

Η PCR είναι μία τεχνική η οποία επιτρέπει την παραγωγή μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος σε πολυάριθμα αντίγραφα. Η γνώση της αλληλουχίας του γονιδίου είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA εκκινητών. Οι εκκινητές δεσμεύονται σε θέσεις συμπληρωματικές με τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.

Τα στάδια της PCR περιλαμβάνουν:

- Αποδιάταξη του DNA, όπου οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (98°C)
- Υβριδισμός των εκκινητών, όπου με μείωση της θερμοκρασίας (60°C) οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA

- Επιμήκυνση, όπου για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης KAPA HIFI (Hot Start) DNA πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού DnaStar και οι αλληλουχίες τους είναι οι ακόλουθες:

mcherry

forward: 5'- GAGGCTAGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG - 3'

reverse: 5'- GTACTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG -3'

Rab3a:

forward: 5'- GATCTCGAGATGGCTTCCGCCACAGAC -3'

reverse: 5'- GCAGAATTCTCAGCAGGCACAATCCTGATG -3'

Rab15:

forward: 5'- GATCTCGAGATGGCGAAACAGTACGATGTG -3'

reverse: 5'- GCAGAATTCTCAGCACCAGCAGGTCTTTG -3'

Rab27a:

forward: 5'- GATCTCGAGATGTCTGATGGAGATTATGAT -3'

reverse: 5'- GCAGAATTCTCAACAGCCACATGCCC -3'

Rab33a:

forward: 5'- GATCTCGAGATGGCACAGCCCATCCTGG -3'

reverse: 5'- GCAGAATTCTCAACAAGGACAGGAGGC -3'

Rab37:

forward: 5'- GATCTCGAGATGACTGGCACACCAGGAG -3'

reverse: 5'- GCAGAATTCTCACACAAAGGAGCAGCAG -3'

Tag-RFP-T:

forward: 5'- CTAGCTAGCGCCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAGGGCGAA -3'

reverse: 5'- CCGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCATTAAGT -3'

Σε ένα τελικό όγκο 25 μ l υπήρχαν: 100 ng πλασμιδίου που έφερε την αλληλουχία cDNA του γονιδίου ενδιαφέροντος, 0,3 μ M από τον κάθε εκκινητή, KAPA HIFI (Hot Start) DNA πολυμεράση (0.5U ανά αντίδραση), μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (0.3 mM) και το αντίστοιχο buffer της DNA πολυμεράσης (KAPA HIFI buffer σε συγκέντρωση 1X). Οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, για το κάθε στάδιο, σχεδιάστηκαν όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα: (ίδιες για όλα τα πλασμίδια)

<u>Στάδιο</u>	<u>Χρόνος</u>	<u>Θερμοκρασία</u>
Αρχική αποδιάταξη	2 λεπτά	95 °C
Αποδιάταξη	20 δευτερόλεπτα	98 °C
Υβριδισμός εκκινητών	30 δευτερόλεπτα	60 °C
Επιμήκυνση	30 δευτερόλεπτα	72 °C
Τελική επιμήκυνση	5 λεπτά	72 °C

Τα στάδια της αποδιάταξης του DNA (denaturation), του υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και της επιμήκυνση των εκκινητών (extension) επαναλήφθηκαν 25 φορές.

Τα τελικά προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

2.3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές cDNA

Οι πλασμιδιακές κατασκευές GFP-Rabs (3a, 15, 27a, 33a, 37) ήταν μία ευγενική προσφορά του M. Fukuda (105). Οι κατασκευές του προπεπτιδίου του vWF με τα προσδέματα m-cherry ή GFP πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Γούλα (Διδακτορική διατριβή 2019). Η πλασμιδιακή κατασκευή Flag-Rab27a παρασκευάστηκε από την Σοφία Ζωγράφου (90).

Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης CMV cassette m-cherry κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του τμήματος mCherry το οποίο παρασκευάστηκε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο ActA-FRB-FRB-mcherry και εκκινητές τους 5'-GAGGCTAGCGCCACCATGGTGAGCA AGGGCGAGG-3' και 5'-GTACTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3'. Το προϊόν της PCR υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις Nhe1/Xho1 του φορέα CMV cassette.

Οι κατασκευές για τις mcherry-Rabs (3a, 15, 27a, 33a, 37) πραγματοποιήθηκαν με υποκλωνοποίηση των τμημάτων Rab3a, Rab15, Rab27a, Rab33a και Rab37 τα οποία παρασκευάστηκαν με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα πλασμίδια GFP-Rab3a, GFP-Rab15, GFP-Rab27a, GFP-Rab33a και GFP-Rab37 και εκκινητές τους: (Rab3a) 5'-GATCTCGAGATGGCTTCCGCC ACAGAC-3' και 5'-GCAGAATTCTCAGCAGGCACAATCCTGATG-3', (Rab15) 5'-GATCTCGAGATGGCGAAACAGTACGATGTG-3' και 5'-GCAGAATTCTCAGCACCAGCAGGTCTTTG-3', (Rab27a) 5'- GATCTCGAGATGTCTGATGGA GATTATGAT-3' και 5'-GCAGAATTCTCAACAGCCACATGCCC-3', (Rab33a) 5'-GATCTCGAGATGGCACAGCCCATCCTGG-3' και 5'-GCAGAATTCTCAAC AAGGACAGGAGGC-3', (Rab37) 5'-GATCTCGAGATGACTGGCACACCAGG AG-3' και 5'-GCAGAATTCTCACACAAAGGAGCAGCAG-3'. Τα τελικά προϊόντα των PCR υποκλωνοποιήθηκαν στις θέσεις Xho1/EcoR1 του φορέα CMV cassette m-cherry.

Οι κατασκευές για τις Tag-RFP-T-Rabs (3a, 15, 27a, 33a, 37) κατασκευάστηκαν με υποκλωνοποίηση του τμήματος Tag-RFP-T το οποίο παρασκευάστηκε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο Tag-RFP-T-EEA1 και εκκινητές τους: 5'-CTAGCTAGCGCCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAGGGCGAA-3' και 5'-CCGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCATTAAGT-3'. Το τελικό προϊόν της PCR υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις Nhe1/Xho1 του φορέα CMV cassette Rab3a, CMV cassette Rab15, CMV cassette Rab27a, CMV cassette Rab33a και CMV cassette Rab37.

Όλες οι DNA κατασκευές, που χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση κυττάρων HUVE, ήταν ελεύθερες ενδοτοξίνης. Η απομόνωση των πλασμιδίων έγινε με το Endotoxin-free plasmid midiprep kit (Sigma).

2.3.3 Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του DNA

Για την εκτίμηση της καθαρότητας και τη μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA μετρήθηκε η απορρόφηση του σε δύο μήκη κύματος, στα 260 nm και στα 280 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA βασίζεται στην εφαρμογή του νόμου Lambert-Beer. Το DNA, σε συγκεντρώσεις 5 έως 50 ng/μl, εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με την απορρόφηση στα 260 nm. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA λαμβάνουμε

υπόψη πως διάλυμα καθαρού δίκλωνου DNA που έχει απορρόφηση στα 260 nm ίση με 1, έχει συγκέντρωση 50 ng/μl. Έτσι, η συγκέντρωση ενός διαλύματος δίκλωνου DNA υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο: $C \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260\text{nm}} \times 50$

Ως προς την αξιολόγηση της ποιότητας του DNA, το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε στα 260nm και 280nm και υπολογίστηκε ο λόγος A_{260}/A_{280} . Υψηλής ποιότητας DNA θεωρήθηκε μόνο αυτό που ο λόγος A_{260}/A_{280} ήταν μεταξύ 1.6– 1.8.

2.4 Βιοχημικές μέθοδοι

2.4.1 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Η ELISA είναι μία βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα, και χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εκκρινόμενου vWF από τα ενεργοποιημένα (με PMA) HUVEC. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

- Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα (1°) έναντι του vWF αντί-human vWF κονίκλου, A0082, DakoCytomation), σε αραιώση 1:300 σε διάλυμα PBS, το οποίο προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια (τροβλίο 96-φρεατίων). Ακολούθησε επώαση υπό ανακίνηση, για 16 ώρες, στους 4°C .
- Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 200 μl/φρεάτιο με PBS + 0.1% Triton (διάλυμα πλύσης) υπό ανάδευση για 2 λεπτά και μετά έγινε επώαση με το διάλυμα δέσμευσης (PBS + 0.1% Triton + 0,2% ζελατίνη), 200 μl/φρεάτιο, υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησε η προσθήκη του δείγματος (150 μl από το υλικό που συλλέχτηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.6, στο οποίο προστέθηκαν 50 μl blocking buffer ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μl), μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο, για να γίνει η πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Έγινε επώαση για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 200 μl/φρεάτιο, με διάλυμα πλύσης.
- Κατόπιν, προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα (2°) έναντι του vWF (αντί-human vWF-HRP κονίκλου, P0226, Dako Cytomation), σε αραιώση 1:4.000 σε διάλυμα δέσμευσης, που ανιχνεύει το αντιγόνο, που είναι ήδη προσδεμένο στο 1° αντίσωμα. Έπειτα, ακολούθησαν 5 πλύσεις με διάλυμα δέσμευσης (200 μl/φρεάτιο).

- Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση υπεροξειδάσης με προσθήκη 200 μl/φρεάτιο υποστρώματος [50 ml διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών + 0,02 g o-Phenylenediamine (OPD, Benzene-1,2-diamine, Sigma) + 0,02 ml H₂O₂, όπου το διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών, pH 5, αποτελούνταν από 100 mM κιτρικό οξύ και 200 mM Na₂HPO₄, σε αναλογία 1:1,06], επώαση για 2-5 λεπτά σε σκοτάδι, που δίνει έγχρωμο σύμπλοκο, του οποίου η συγκέντρωση μετριέται στη συνέχεια.
- Προσθήκη 50 μl H₂SO₄ 2N/φρεάτιο, το οποίο τερματίζει την αντίδραση, αφού αλλάζει το pH του διαλύματος και απενεργοποιεί την υπεροξειδάση.
- Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος (φωτομέτρηση στα 492 nm, καθώς και στα 630 nm για αφαίρεση του θορύβου) και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη (η μετατροπή της οπτικής απορρόφησης σε A.U. (arbitrary units), πραγματοποιήθηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης που συσχετίζει τα δύο αυτά μεγέθη), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος του δείγματος.

2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Για τη μέτρηση συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (BCATM Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, σε 1 ml αντιδραστηρίου BCA προστέθηκε 10 % διάλυμα κυτταρικού λύματος (η λύση των κυττάρων HUVE έγινε με διάλυμα 1% SDS σε PBS) σε ddH₂O. Το μείγμα αντίδρασης επώαστηκε για 30 λεπτά στους 60⁰C και φωτομετρήθηκε σε μήκος κύματος 562 nm. Για τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA).

2.4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (Western blotting)

Οι πρωτεΐνες κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, υπό αναγωγικές συνθήκες. Στα κυτταρικά εκχυλίσματα προστέθηκε 1x διάλυμα Laemmli, προσδίδοντας τελική συγκέντρωση στα δείγματα 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2,3% SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, παρουσία 100 mM DTT. Έπειτα, τα δείγματα υπέστησαν βρασμό (5 λεπτά) στους 100⁰C

και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 13200 rpm. Το SDS (απορρυπαντικό) αποδιατάσσει τα πρωτεϊνικά μόρια. Συγκεκριμένα, τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών, διαλύοντας την τριτοταγή τους δομή, και δίνοντας ένα σύμπλεγμα του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη, το οποίο αποκτά μεγάλο αρνητικό φορτίο, που είναι ανάλογο με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, ενώ το φορτίο της αρχικής φυσικής δομής καθίσταται αμελητέο. Έτσι, η μοριακή μάζα του συμπλέγματος SDS-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με το μέγεθος και κατ' επέκταση με το μήκος της αλυσίδας. Ως αποτέλεσμα, στους πόρους του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες κινούνται προς το θετικό πόλο και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Μικρότερα μόρια κινούνται ταχύτερα από εκείνα μεγαλύτερου μοριακού βάρους, με τη μορφή χαρακτηριστικών ζωνών. Οπότε, τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45 mm, Millipore). Η παρασκευή των πηκτών, η σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης, οι συνθήκες αυτής, καθώς και οι συνθήκες κατά τις οποίες έγινε η μεταφορά και η σύσταση του ρυθμιστικού της διαλύματος, αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (106).

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (Serva, 0,1% σε οξικό οξύ) για 1 λεπτό και ακολούθησε πλύση με νερό. Οι μεμβράνες έπειτα επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western (1xPBS – 0.1% Tween 20), σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση, για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών. Ακολούθησε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα είτε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, είτε στους 4°C όλο το βράδυ σε διάλυμα Western – 2% ζελατίνη, υπό ανάδευση και στις 2 περιπτώσεις. Μετά το πέρασμα του χρόνου, πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα Western και οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα ανάλογα δευτερογενή αντισώματα, που ήταν συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Rad dish Peroxidase, HRP, 1:5.000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη, σε διάλυμα Western, με ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολούθησαν πάλι 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα Western και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Roche.

2.5 Μορφολογικές μέθοδοι

2.5.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HUVE καλλιιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες, που είχαν προ-επωαστεί με κολλαγόνο τύπου 1, και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν στις διάφορες συνθήκες, ανάλογα με τον εκάστοτε πειραματικό στόχο. Με το πέρας της επεξεργασίας, έγινε πλύση των κυττάρων 3 φορές με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3,7% για 20 λεπτά. Η παραφορμαλδεύδη εξουδετερώθηκε με διάλυμα 50 mM NH₄Cl σε PBS για 30 λεπτά και ακολούθησε επώαση με Triton 0.1% (σε PBS) για 3,5 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση των κυττάρων με PBS 3 φορές, και επώαση με 10% FBS (005-000-121, Jackson ImmunoResearch) σε PBS για 40 λεπτά, προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Στη συνέχεια, έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, και μετά από 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS, έγινε επώαση με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος για 35 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκοτάδι. Ακολούθησαν πάλι 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS. Τα αντισώματα αραιώθηκαν σε διάλυμα 10% FBS σε PBS. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με το αντιδραστήριο τοποθέτησης Prolong (ProLong™ Gold Antifade Mountant, P36930, Thermo Fisher Scientific) και παρέμειναν να στεγνώσουν στον πάγκο για 24 ώρες, έπειτα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

2.5.2 Συνεστιακή μικροσκοπία

Χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Leica TCS SP5, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser Argon/SS-561/HeNe με λογισμικό χρήσης Leica TCS. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι:

- Φακός μεγέθυνσης: 63x 1.4 NA oil UV.
- Η συχνότητα σάρωσης ήταν 400 Hz,
- Η ανάλυση της εικόνας στα 512x512pixels,
- Το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στη 1 μονάδα Airy (AU),

2.5.3 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photo bleaching, FRAP)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αναπτύχθηκε το 1970 ως μια τεχνική για τη μελέτη της κινητικότητας πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα με μέτρηση του ρυθμού ανάκτησης φθορισμού εφόσον προηγουμένως είχε επέλθει φωτοσκίαση σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενδιαφέροντος. Έτσι, σε κύτταρα HUVE, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε δισκία με πλαστική βάση (ibidi), υπερεκφράστηκαν οι πρωτεΐνες Rabs σε χιμαιρική μορφή με την πρωτεΐνη EGFP. Μετά από 48 ώρες, τα δισκία ibidi τοποθετήθηκαν στη βάση του μικροσκοπίου (η συνολική διάταξη βρίσκεται σε θάλαμο συγκεκριμένης θερμοκρασίας, που για τις ανάγκες του πειράματος ήταν 21⁰C, ή 27⁰C, ή 37⁰C) και ακολούθησε FRAP ανάλυση με τις ακόλουθες παραμέτρους:

- Φακός μεγέθυνσης: 63x 1.4 NA oil UV
- Laser ακτινοβολίας (Argon-488) με ισχύ δέσμης 6% της μέγιστης ισχύος σε όλη την διάρκεια του πειράματος, εκτός από την στιγμή της φωτοσκίασης που ήταν σε μέγιστη ισχύ (100%)
- Η μεγέθυνση (zoom) κυμάνθηκε από 20 έως 25
- Η συχνότητα σάρωσης ήταν 1000 Hz,
- Η ανάλυση της εικόνας στα 512x512pixels,
- Το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στις 1,5 μονάδες Airy (AU),
- Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 2,5 δευτερόλεπτα
- Ως μέσο απεικόνισης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα imaging medium (οπτικά διαυγές ρυθμισμένο διάλυμα, με HEPES και pH 7,4, που διατηρεί τα κύτταρα υγιή για έως και 4 ώρες), 1,5 ml σε κάθε δισκίο ibidi.

Αφού επιλέχθηκε το WPB προς ανάλυση, ορίστηκε ως η περιοχή ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) όπου προκλήθηκε η φωτοσκίαση. Συνολικά ελήφθησαν 2 εικόνες πριν τη φωτοσκίαση (pre-bleach images), ακολούθησαν 2 στιγμιαίες φωτοσκιάσεις (bleach images) και λήψη 120 εικόνων για 300 δευτερόλεπτα μετά τη φωτοσκίαση (post-bleach images). Ακόμη, ορίστηκαν άλλα 2 ROIs, ένα όμοιου μεγέθους WPB που δεν υπέστη φωτοσκίαση, καθώς και μια περιοχή στην οποία δεν εντοπίζονται WPBs, ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος (background). Οι περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των δεδομένων (data normalization).

2.5.4 Μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο (time-lapse video microscopy)

Κύτταρα HUVe, που είχαν καλλιεργηθεί σε ibidi και υπερέκφραζαν 2 Rab πρωτεΐνες (η μία Rab ήταν σε χημική μορφή με την πρωτεΐνη EGFP, ενώ η άλλη Rab ήταν συζευγμένη με Tag-RFP-T), ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml), αφού είχαν περάσει 48 ώρες από τη στιγμή της διαμόλυνσης τους. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίησή τους έγινε ως εξής: τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα HBSS και ακολούθησε προσθήκη του ενεργοποιητή σε διάλυμα HBSS (με 20% HEPES), για 2 ώρες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Μετά το τέλος της επώασης, αφαιρέθηκε ο ενεργοποιητής, τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με πλήρες μέσο καλλιέργειας των ενδοθηλιακών κυττάρων, και έπειτα, προκειμένου να ανακάμψουν, προστέθηκε σε αυτά πλήρες θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν ξανά σε κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Μετά από 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο, όπως περιγράφεται παρακάτω.

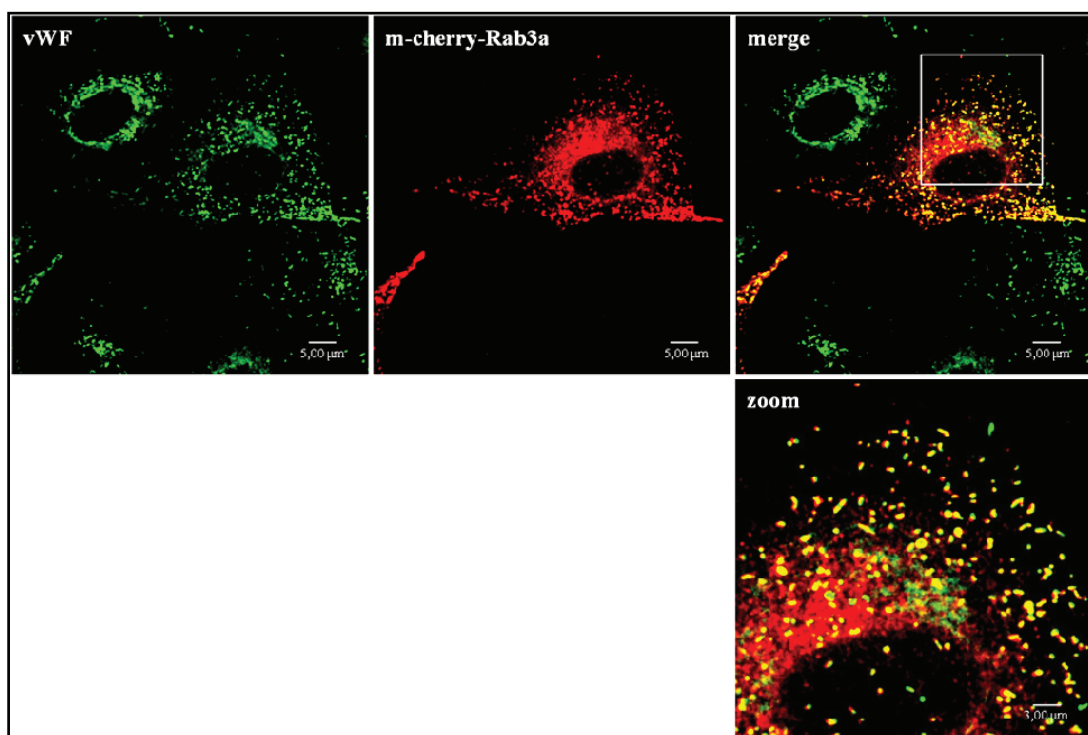
- Χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Leica TCS SP5, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561, με λογισμικό χρήσης Leica TCS.
- Φακός μεγέθυνσης: 63x 1.4 NA oil UV
- Η μεγέθυνση (zoom) κυμάνθηκε από 2,7 έως 7
- Η συχνότητα σάρωσης ήταν 400 Hz,
- Η ανάλυση της εικόνας στα 512x512pixels,
- Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν από κάθε 2,5 δευτερόλεπτα έως 23 δευτερόλεπτα
- Συνολική διάρκεια των video ήταν από 10 έως 50 λεπτά
- Ο αριθμός των πειραμάτων για κάθε μία Rab ήταν ο εξής: Rab3a:4, Rab15:3, Rab33a:3, Rab37:9
- Η θερμοκρασία ήταν σταθερά τους 21⁰C.

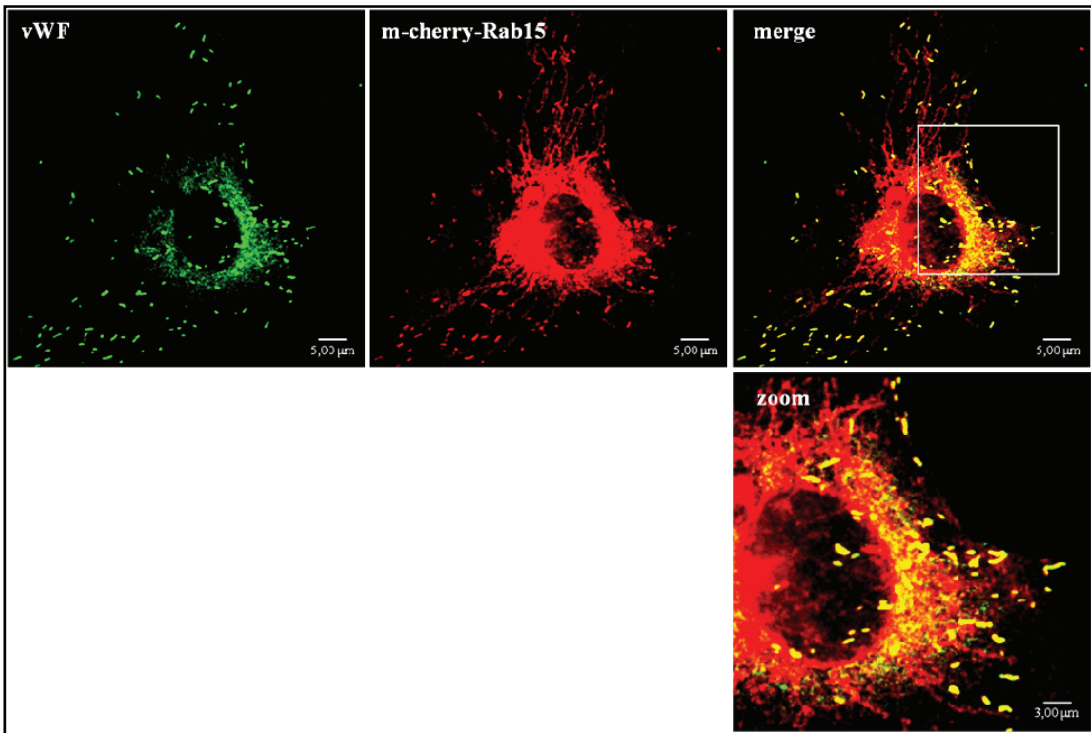
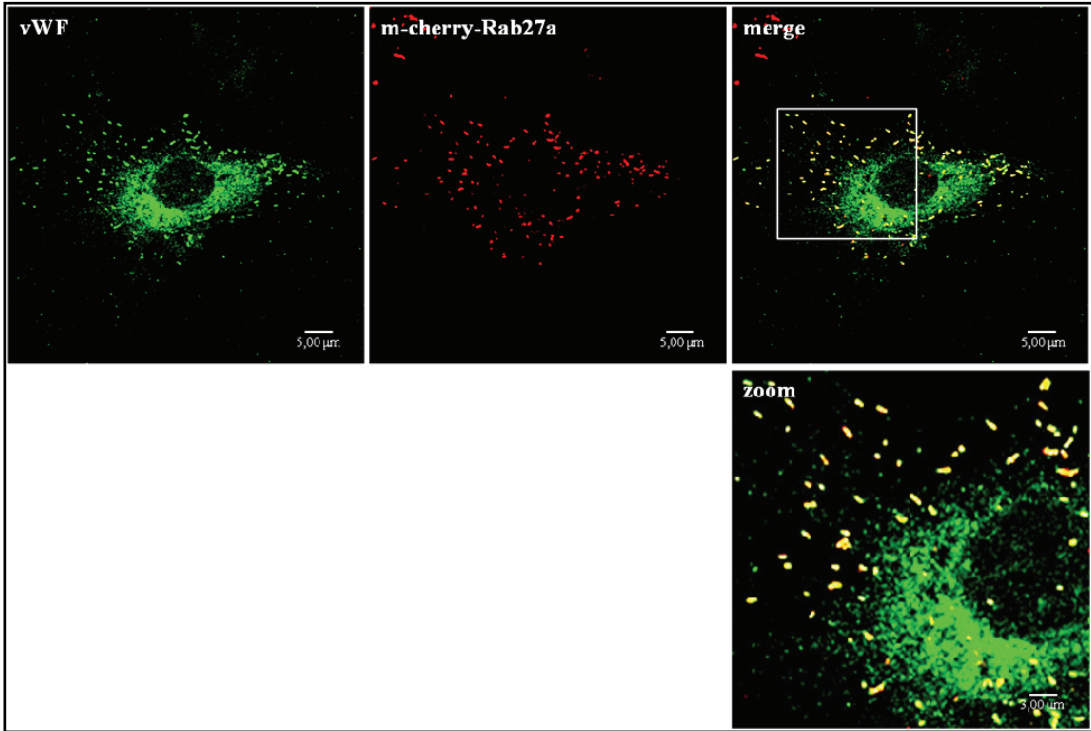
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

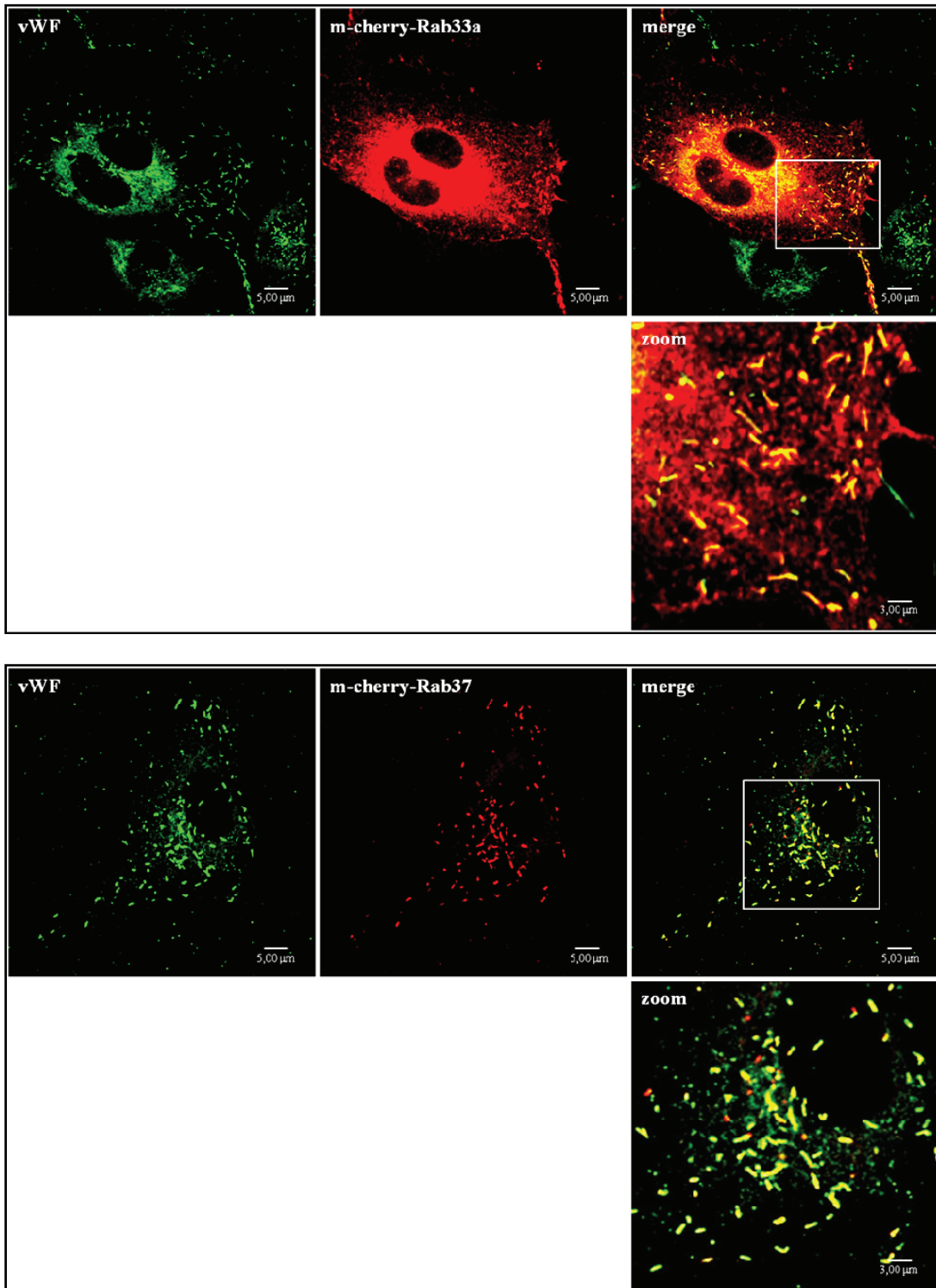
3.1 Η προσθήκη του προσδέματος mCherry στις Rabs 3a, 15, 27a, 33, 37 δεν επηρεάζει τον εντοπισμό τους στα WPBs.

Προκειμένου να μελετηθεί η σχετική χωρο-χρονική στρατολόγηση των Rabs στα WPBs, ήταν απαραίτητο να κατασκευαστούν πλασμιδιακές κατασκευές έκφρασής τους με προσδέματα που να επιτρέπουν την παρακολούθηση των Rabs ανά δύο με μικροσκοπία φθορισμού σε ζωντανά κύτταρα. Τα προσδέματα θα έπρεπε να φθορίζουν σε καλά διαχωρισμένα μήκη κύματος ώστε να αποφεύγεται η διαρροή κατά την ανίχνευση των δύο φθοριοχρωμάτων. Στο εργαστήριο μας διαθέταμε ήδη τις 5 Rabs των WPBs σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης ως χιμαιρικές πρωτεΐνες συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein-GFP) (90). Προκειμένου να είναι δυνατή η ταυτόχρονη παρακολούθηση, ανά δύο, των Rabs αυτών, δημιουργήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές έκφρασής τους με το πρόσδεμα mcherry (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη), η οποία έχει πολύ καλά διαχωρισμένα φάσματα διέγερσης και εκπομπής σε σχέση με την GFP. Τα φθορίζοντα προσδέματα GFP και mcherry είναι συζευγμένα στο άμινο-τελικό άκρο της αλληλουχίας των Rabs, καθώς στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο βρίσκεται το μοτίβο πρενυλίωσης, που είναι υπεύθυνο για την αγκυροβόλησή τους στη μεμβράνη. Επειδή, παρόλα αυτά, είναι πιθανό η προσθήκη του προσδέματος να επηρεάζει την σωστή στόχευση των πρωτεϊνών (107), αρχικά ελέγχθηκε αν επηρεάζεται ο εντοπισμός των 5 αυτών Rabs στα WPBs. Για τον σκοπό αυτό ελέγχθηκε ο συνεντοπισμός τους με τον ενδογενή vWF, το κύριο φορτίο των WPBs. Έτσι, κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με τις mcherry Rabs 3a, 15, 27a, 33a, 37. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του mcherry και μονοκλωνικό έναντι του vWF και τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1, οι mcherry-tagged Rabs (κόκκινο) εντοπίζονται σε όλα σχεδόν τα ώριμα WPBs (πράσινο). Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι το πρόσδεμα mcherry δεν επεμβαίνει στη σωστή τους στόχευση στη μεμβράνη των WPBs. Εκτός από τις Rab27a και Rab37 που απαντώνται αποκλειστικά στα WPBs, οι άλλες τρεις βρέθηκαν και σε άλλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Συγκεκριμένα η Rab3a και η Rab33a εντοπίζονται στο δίκτυο Golgi και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η Rab15 βρίσκεται στο δίκτυο Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά ίσως και στα μικροϊνίδια ακτίνης. Τα

παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που αναφέρει για τις GFP-Rabs πως απαντώνται και σε άλλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα εκτός των WPBs (90). Ακόμη, προηγούμενες εργασίες έδειξαν πως η Rab15, εκτός από τα WPBs, συνεντοπίζεται με δείκτες των πρώιμων ενδοσωμάτων (Rab4, Rab5) αλλά και τον ενδοσωμάτων ανακύκλωσης (Rab11) (108). Όπως θα δούμε παρακάτω, ο εντοπισμός των ίδιων Rabs σε διαφορετικά οργανίδια έχει σημασία για την επικοινωνία μεταξύ των οργανιδίων. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, ο εντοπισμός των mcherry-Rabs στα WPBs καταδεικνύει πως το mcherry είναι συμβατό με τους στόχους της παρούσας μελέτης.







Εικόνα 3.1. Το πρόσδεμα *mcherry* δεν επεμβαίνει στην στόχευση των *Rabs* 3a, 15, 27a, 33a, και 37 στα *WPBs*. Κύτταρα *HUVE*, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης των *mcherry-Rabs* 3a, 15, 27a, 33a και 37. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του *mcherry* (κόκκινο) και μονοκλωνικό έναντι του *vWF* (πράσινο), και τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Όπως προκύπτει από τις εικόνες, οι *Rabs* (κόκκινο) εντοπίζονται στα *WPBs* (πράσινο/*vWF*), κάτι που αποδεικνύεται από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό (κίτρινο). Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

3.2 Μελέτη της σειράς και του χρόνου στρατολόγησης των Rabs στη μεμβράνη των WPBs.

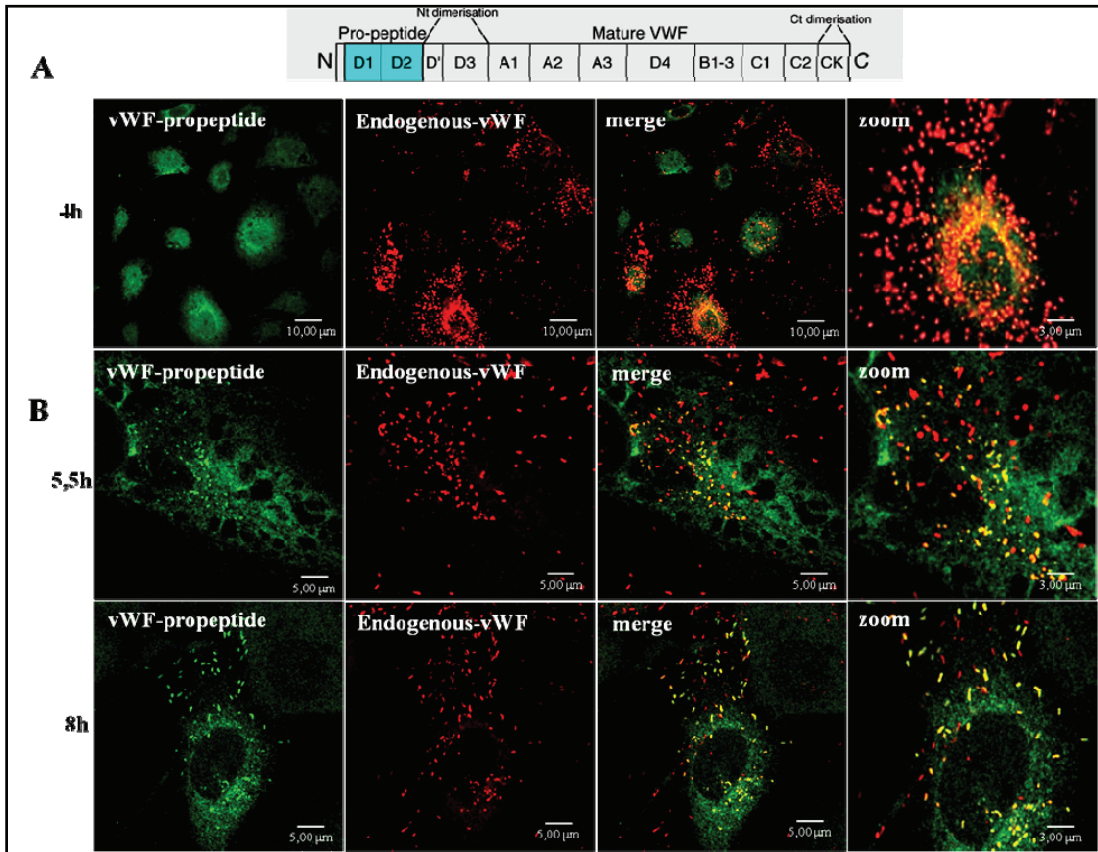
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της χωρο-χρονικής στρατολόγησης των 5 Rabs στα WPBs. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη πως και οι 5 Rabs εντοπίζονται σχεδόν σε όλα τα ώριμα WPBs του κυττάρου (90) (Εικόνα 3.1), έπρεπε καταρχάς να εγκαθιδρύσουμε τις πειραματικές συνθήκες ώστε να μελετήσουμε την στρατολόγηση των Rabs σε πιο πρώιμα στάδια της ζωής των WPBs, από την στιγμή της δημιουργίας τους από το TGN (trans-Golgi network), μέχρι τη στιγμή της ωρίμανσης και έκκρισής τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στις επόμενες δύο ενότητες (3.2.1 και 3.2.2) παρουσιάζονται οι πειραματικές προσεγγίσεις που διερευνήθηκαν για την εξειδικευμένη ανίχνευση των νεοσυντιθέμενων WPBs και την παρακολούθηση της μετέπειτα πορείας τους.

3.2.1 Χρήση του προπεπτιδίου του vWF ως δείκτη ανίχνευσης των νεοσυντιθέμενων WPBs.

Αρχικά, ως δείκτη ανίχνευσης των νεοσυντιθέμενων WPBs χρησιμοποιήσαμε το προπεπτίδιο του vWF συζευγμένο με GFP. Οι λόγοι που χρησιμοποιήθηκε μόνο το προπεπτίδιο του vWF, αντί του ώριμου vWF, είναι οι εξής:

- το πλήρες μόριο του vWF είναι αρκετά μεγάλο (>220kDa), γεγονός που δυσχεραίνει την υπερέκφρασή του μέσω διαμόλυνσης,
- όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το προπεπτίδιο ακολουθεί τον ώριμο vWF στα WPBs.

Για την εύρεση του ελάχιστου χρόνου που απαιτείται για την είσοδο του προπεπτιδίου στα νεοσυντιθέμενα WPBs, το προπεπτίδιο του vWF (Εικόνα 3.2-A) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα HUVE και προσδιορίστηκε το χρονικό διάστημα που απαιτείται ώστε το προπεπτίδιο να εισέλθει στα νεοσχηματιζόμενα WPBs, δηλαδή να συνεντοπιστεί με τον ενδογενή vWF (Εικόνα 3.2-B). Παρατηρήσαμε ότι, υπό τις πειραματικές αυτές συνθήκες, το χρονικό διάστημα των 5,5 ωρών από τη στιγμή της διαμόλυνσης είναι το μικρότερο διάστημα ώστε το νεοσυντιθέμενο προπεπτίδιο του vWF να εισέλθει στα νεοσχηματιζόμενα WPBs (συνεντοπίζεται με τον ενδογενή vWF) – και ότι μετά το πέρας του χρόνου αυτού αυξάνεται ο συνεντοπισμός, δηλαδή αυξάνεται η ποσότητα του προπεπτιδίου στα WPBs (Εικόνα 3.2-B-8h). Τα δεδομένα αυτά κατέδειξαν ότι απαιτούνται περίπου 5,5 ώρες για την είσοδο του προπεπτιδίου στα νεοσχηματιζόμενα WPBs.

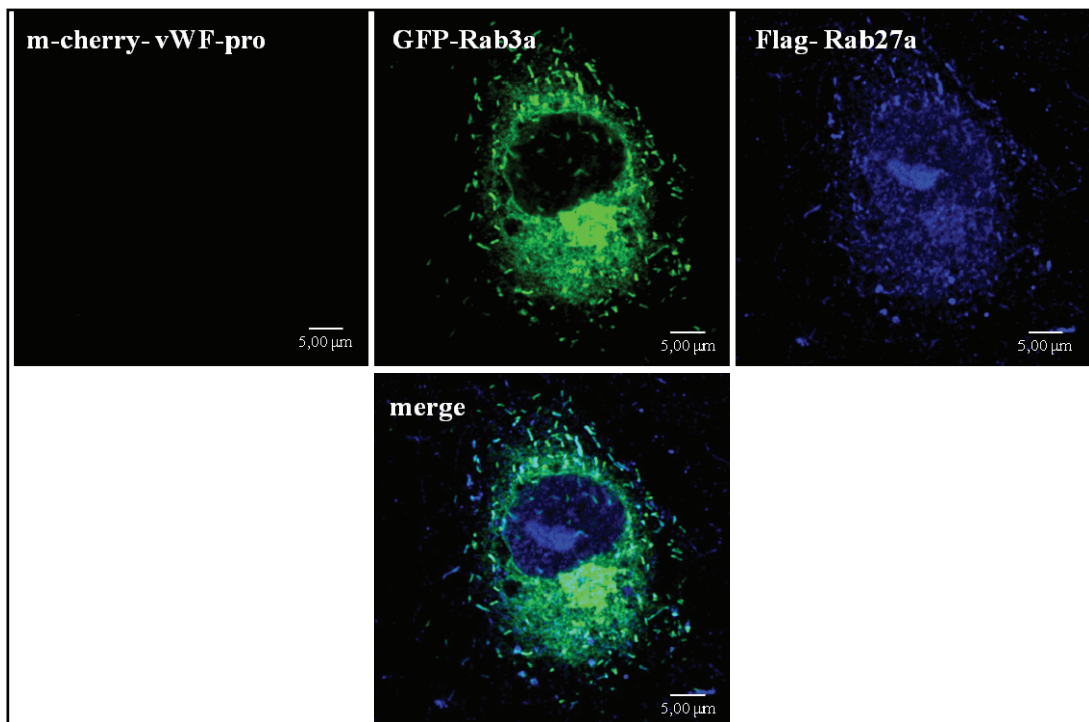


Εικόνα 3.2. Μελέτη του χρόνου εισόδου του προπεπτιδίου του vWF στα νεοσχηματιζόμενα WPBs. (A) Σχηματική αναπαράσταση της δομής του vWF. Ο vWF αποτελείται από το σηματοδοτικό πεπτίδιο (22 κατάλοιπα), από το προπεπτίδιο του vWF (751 κατάλοιπα) και από τον ώριμο vWF (2050 κατάλοιπα). (B) Διερεύνηση του χρόνου εισόδου του προπεπτιδίου στα νεοσυντιθέμενα WPBs. Κύτταρα HUVE που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμόλυνθηκαν με το PEGFPN2 vWF propeptide και ελέγχθηκε η χρονική στιγμή του συνεντοπισμού του προπεπτιδίου με τον ενδογενή vWF στα WPBs. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά τη διαμόλυνση και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP (πράσινο), και μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ενδογενή vWF (κόκκινο). Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρήθηκε ότι το προπεπτίδιο συνεντοπίζεται (κίτρινο) με τον ενδογενή vWF στις 5,5 ώρες από τη στιγμή της διαμόλυνσης, και πως ο συνεντοπισμός αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου (8h). Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

Τα πειράματα αυτά κατέδειξαν τις συνθήκες ανίχνευσης των νεοσυντιθέμενων WPBs. Οπότε, στη συνέχεια υπερεκφράστηκαν ταυτόχρονα το προπεπτίδιο του vWF (ως δείκτης νέων WPBs) και 2 Rabs, για την εύρεση της σχετικής σειράς στρατολόγησής τους στα νέα WPBs. Αξίζει να σημειωθεί ότι, από τεχνικής άποψης, δεν είναι δυνατό να ανιχνευτούν ταυτόχρονα πάνω από τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες συζευγμένες με φθοριοχρώματα, καθώς δεν είναι εφικτός ο ασφαλής διαχωρισμός τους κατά την διέγερση και εκπομπή τους. Οπότε, σύμφωνα με το παραπάνω πλάνο, ο στόχος ήταν το

ένα από τα 3 πλασμίδια να είναι του vWF (ως δείκτης των νεοσχηματιζόμενων WPBs) και τα άλλα 2 να είναι οι Rabs, σε ζεύγη ανά δύο, συνδυασμένες μεταξύ τους σε ανεξάρτητα πειράματα.

Ωστόσο, διαπιστώθηκε πως δεν ήταν δυνατό να εκφραστούν και οι τρεις πρωτεΐνες στην τριπλή αυτή διαμόλυνση. Αν και δοκιμάστηκαν αρκετοί συνδυασμοί συγκεντρώσεων μεταξύ των διαφορετικών πλασμιδίων και του λιπιδίου διαμόλυνσης, καμία δεν ήταν ικανή να οδηγήσει σε υπερέκφραση και των τριών πρωτεϊνών (ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι αυτό της Εικόνας 3.3).



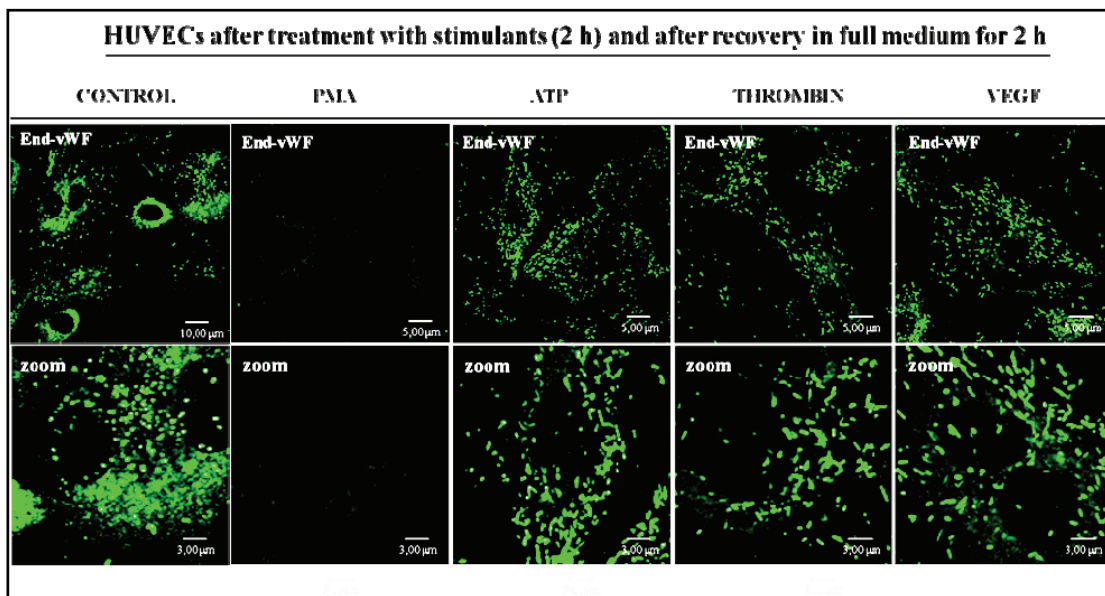
Εικόνα 3.3. Δεν είναι εφικτή η ταυτόχρονη υπερέκφραση του προπεπτιδίου του vWF και των Rab3a και Rab27a σε κύτταρα HUVE. Κύτταρα HUVE που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια έκφρασης του mcherry-vWF propeptide, της GFP-Rab3a και της Flag-Rab27a, ταυτόχρονα. Έπειτα από 48 ώρες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι του mcherry (κόκκινο), πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του GFP (πράσινο), και μονοκλωνικό αντίσωμα επίμοος έναντι του Flag (μπλε). Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείστε πως η τριπλή διαμόλυνση πλασμιδίων σε κύτταρα HUVE δεν είναι εφικτή, καθώς υπερεκφράζονται μόνο οι 2 από τις 3 πρωτεΐνες. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

Έτσι, συμπεράναμε ότι δεν ήταν εφικτό να χρησιμοποιήσουμε την παραπάνω πειραματική προσέγγιση για την μελέτη της σχετικής χωρο-χρονικής στρατολόγησης των 5 Rabs στα WPBs.

3.2.2 Ανίχνευση των νεοσυντιθέμενων WPBs μετά από αφαίρεση των προϋπαρχόντων εκκριτικών οργανιδίων με χρήση PMA.

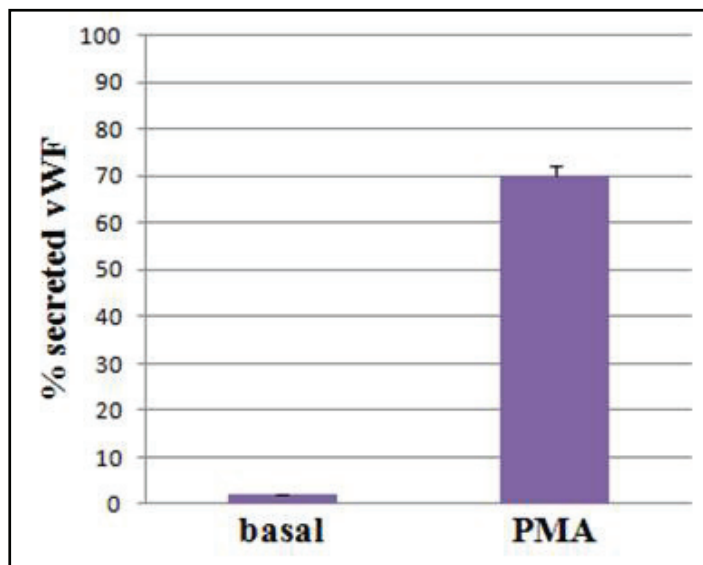
Αφού δεν ήταν εφικτή η παραπάνω προσέγγιση, στραφήκαμε σε μια εναλλακτική τεχνική (109) όπου τα κύτταρα επωάζονται με ένα ισχυρό ενεργοποιητή της έκκρισης (PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate, 80 nM, για 20 λεπτά). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η επώαση με PMA προκαλεί άδειασμα σχεδόν όλων των WPBs, οπότε τα WPBs που ανιχνεύονται από εκεί κι έπειτα είναι τα νέα που σχηματίζονται από το TGN, ενώ απουσιάζει πλήρως ο θόρυβος των παλαιών εκκριτικών οργανιδίων. Στην περίπτωση αυτή, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η σειρά στρατολόγησης των Rabs, θα επαρκούσε διπλή διαμόλυνση των πλασμιδίων των Rabs ανά δύο (σε ανεξάρτητους συνδυασμούς των 5 διαφορετικών Rabs), χωρίς την ανάγκη συν-διαμόλυνσης με το πλασμίδιο του vWF.

Προκειμένου να εφαρμόσουμε την τεχνική αυτή (109), έπρεπε πρώτα να την εγκαθιδρύσουμε στις πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας των HUVECs που εφαρμόζουμε στο εργαστήριό μας. Έτσι, αρχικά πραγματοποιήσαμε σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ενεργοποιητών (PMA, ATP, Thrombin, VEGF) προκειμένου να βρούμε εκείνον που προκαλεί το αποδοτικότερο άδειασμα των WPBs από τα HUVECs. Έτσι, κύτταρα HUVE ενεργοποιήθηκαν ξεχωριστά με PMA (100 ng/ml), ATP (100 μM), Thrombin (1 U/ml), ή VEGF (50 ng/ml), για 2 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό, επώαστηκαν για 2 ώρες με θρεπτικό μέσο προκειμένου να ανακάμψουν από την επίδραση των ενεργοποιητών και ελέγχθηκε η ύπαρξη τυχόν εναπομεινάντων WPBs. Σημειώνεται ότι οι 2 ώρες επώασης με πλήρες θρεπτικό μέσο, μετά την επώαση με PMA, προσφέρουν τον απαραίτητο χρόνο ώστε να αποδεσμευτούν από την κυτταρική μεμβράνη μόρια vWF που εκκρίθηκαν από τα WPBs (110). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, το PMA είναι ο μοναδικός ενεργοποιητής που προκαλεί σχεδόν πλήρες άδειασμα των WPBs των HUVECs. Πιθανά αυτό οφείλεται στο ότι το PMA είναι ένας χημικός ενεργοποιητής της PKC (πρωτεϊνική κινάση C), η οποία βρίσκεται καθοδικά πολλών υποδοχέων. Έτσι, το PMA μάλλον μιμείται αθροιστικά την ενεργοποίηση του συνόλου των υποδοχέων που δρουν μέσω της PKC, σε αντίθεση με τους άλλους 3 ενεργοποιητές που ενεργοποιούν την ποσότητα της PKC που αναλογεί στον κάθε ένα υποδοχέα ξεχωριστά (βλέπε Εισαγωγή, Υποενότητα 1.2.3).



Εικόνα 3.4. Σύγκριση της ικανότητας διαφορετικών ενεργοποιητών να προκαλούν έκκριση των WPBs. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, ενεργοποιήθηκαν με PMA, (100 ng/ml), ATP (100 μM), Thrombin (1 U/ml) ή VEGF (50 ng/ml), για 2 ώρες. Έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν για 2 ώρες παρουσία πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντισώματα έναντι του vWF (πράσινο), και αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείται πως τα κύτταρα αδειάζουν από WPBs μόνο στην περίπτωση που έγινε επαγωγή με PMA. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

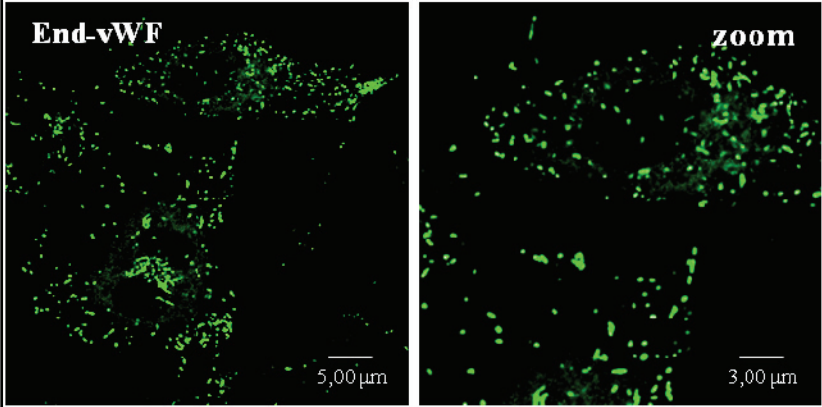
Από ανεξάρτητα πειράματα όπου ελέγξαμε την επίδραση της συγκέντρωσης του PMA και του χρόνου επώασής του με τα κύτταρα στην απόδοση της εξωκυττάρωσης (άδεισμα των WPBs από τα HUVECs), καταλήξαμε ότι ο χρόνος επώασης των 2 ωρών και η συγκέντρωση των 100 ng/ml είναι οι αποδοτικότερες συνθήκες ενεργοποίησης (πειράματα που δεν παρουσιάζονται στην διατριβή). Τέλος, η οξεία εκκριτική δράση του PMA επιβεβαιώθηκε με πειράματα μέτρησης του εκκρινόμενου vWF. Συγκεκριμένα κύτταρα HUVE, σε πλήρη συρροή (full confluency) για 2 μέρες, ενεργοποιήθηκαν για 2 ώρες με PMA (100 ng/ml). Στη συνέχεια, το υλικό επώασης συλλέχθηκε και αναλύθηκε με μεθοδολογία τύπου ELISA. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5, η ενεργοποίηση των κυττάρων με PMA επάγει την εξωκυττάρωση του 70% της συνολικής ποσότητας vWF, γεγονός που εξηγεί το αποδοτικό άδειασμα των WPBs του κυττάρου στα παραπάνω πειράματα ανοσοφθορισμού (Εικόνα 3.4, 2 ώρες-PMA).



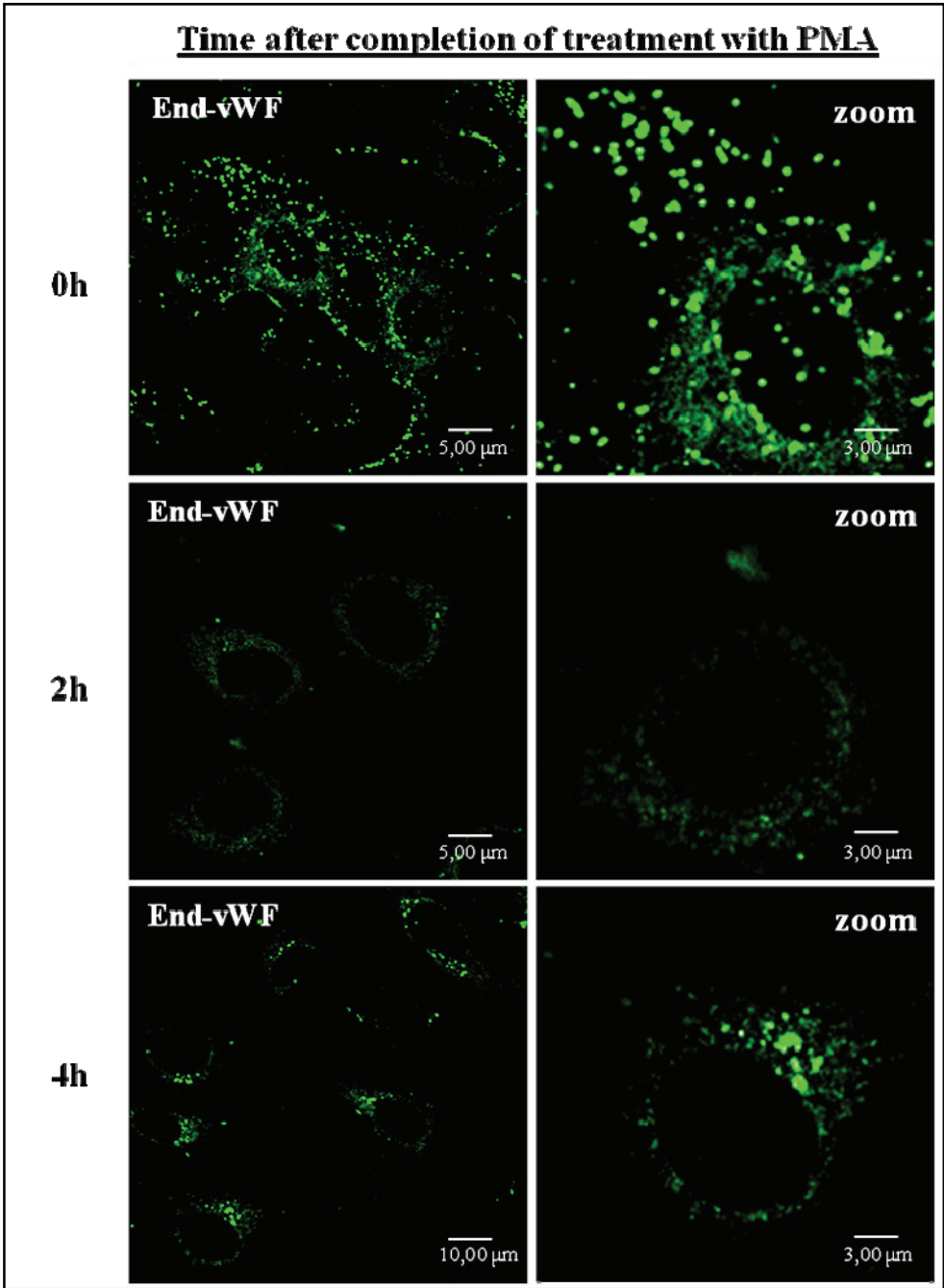
Εικόνα 3.5. Διερεύνηση του ποσοστού του εκκρινόμενου vWF μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων με PMA. Κύτταρα HUVE, σε συρροή για 2 μέρες, ενεργοποιήθηκαν για 2 ώρες με PMA (100 ng/ml). Η ποσοτικοποίηση της βασικής και επαγόμενης έκκρισης του vWF πραγματοποιήθηκε με ELISA και εκφράστηκε σε ποσοστό επί τις 100. Οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τυπική απόκλιση. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 2

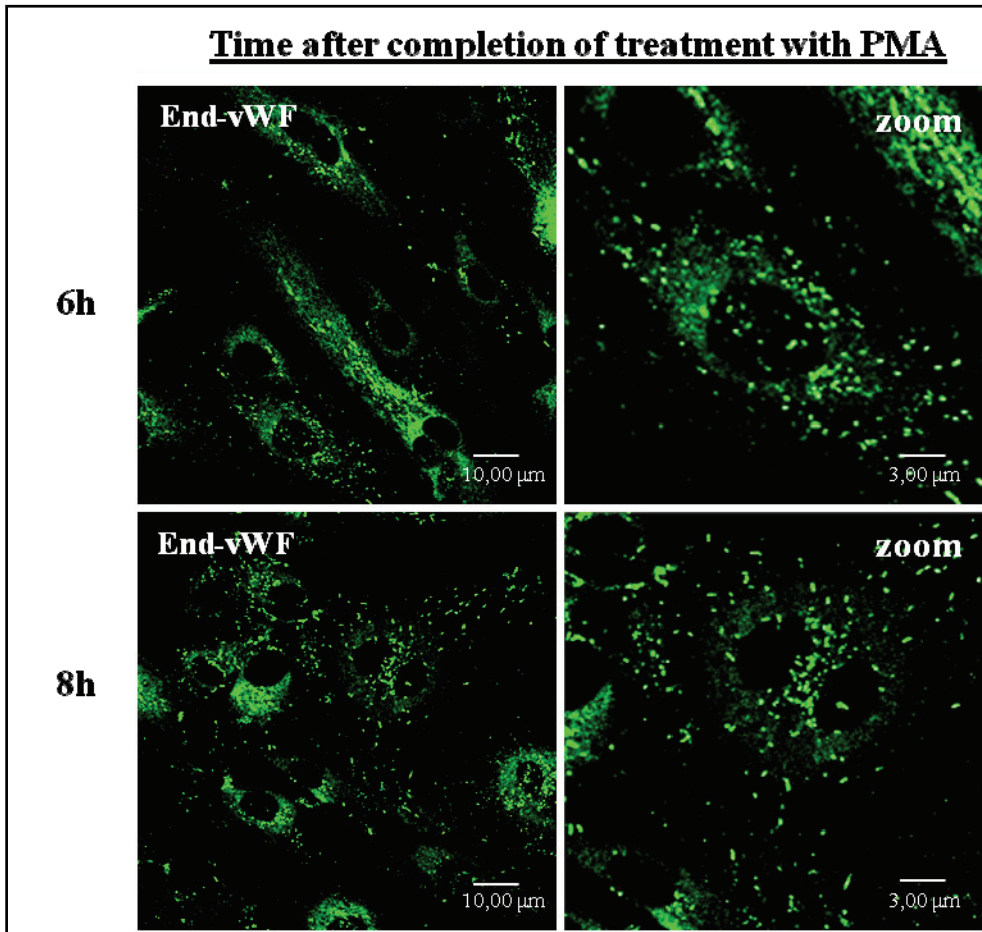
Έχοντας επιβεβαιώσει ότι το PMA προκαλεί αποδοτικό άδειασμα των WPBs των HUVECs, προχωρήσαμε σε πείραμα εύρεσης του χρόνου που απαιτείται, μετά από επαγωγή με PMA, για την δημιουργία των νεοσυντιθέμενων WPBs από το Golgi (Εικόνα 3.6). Συγκεκριμένα, κύτταρα HUVE ενεργοποιήθηκαν με PMA για 2 ώρες και στη συνέχεια πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και αφέθηκαν σε καλλιέργεια για 2 έως 8 ώρες. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του πειράματος της Εικόνας 3.4, 2 ώρες μετά την αφαίρεση του PMA παρατηρείται άδειασμα του vWF από τα κύτταρα (λόγω εξωκυττάρωσης των WPBs), ενώ στις 4 ώρες παρατηρείται σχηματισμός νέων WPBs, όπως μαρτυρά η έξοδος του νεοσυντιθέμενου vWF από το Golgi σε χαρακτηριστικά περιπυρηνικά κυστίδια (Εικόνας 3.6). Από εκείνο το σημείο και μετά συνεχίστηκε η παραγωγή των WPBs, ενώ παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης αποκατάσταση του αριθμού των WPBs στα κύτταρα, με σχηματισμό ακόμη και περιφερειακών WPBs, στις 6 και 8 ώρες επώασης με πλήρες θρεπτικό μέσο.

Control-untreated cells



Time after completion of treatment with PMA





Εικόνα 3.6. Προσδιορισμός του χρόνου δημιουργίας νέων WPBs, μετά από επαγωγή των κυττάρων με PMA και επώαση σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και αφέθηκαν να ανακάμψουν από την επίδρασή της (από 2 έως 8 ώρες). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντισώματα έναντι του vWF (πράσινο). Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείται πως απαιτούνται 2 ώρες μετά την αφαίρεση του PMA προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως ο ενδογενής vWF (αποκαλύφθηκε με χρώση για τον ενδογενή vWF (πράσινο). Τα νεοσυντιθέμενα WPBs από το Golgi (βλέπε περιπυρηνικά κυστίδια) εμφανίζονται στις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων μετά την αφαίρεση του PMA. Η παραγωγή των WPBs συνεχίστηκε από εκείνο το σημείο και μετά, και παρατηρήθηκε πλήρης ανάκαμψη των κυττάρων και παρατήρηση πολλών περιφερειακών WPBs στις 6 και 8 ώρες ανάκαμψης. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

Όπως είδαμε πιο πάνω, για την πλήρη έκκριση (απώλεια σήματος) του vWF απαιτούνται 2 ώρες επώασης με PMA και επιπλέον 2 ώρες καλλιέργειας σε πλήρες θρεπτικό μέσο (Εικόνα 3.6). Δεδομένου ότι η έκκριση είναι μια σχετικά σύντομη διαδικασία που ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 1 λεπτό (111,112) δημιουργείται το εύλογο ερώτημα γιατί να απαιτείται τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα (2 h PMA και 2 h πλήρες μέσο) για την πλήρη έκκριση του vWF. Η απάντηση δίνεται από προηγούμενες

μελέτες που κατέδειξαν ότι ο vWF, μετά την έκκρισή του από τα WPBs, παραμένει συνδεδεμένος στην επιφάνεια των κυττάρων για >25 λεπτά, πριν απελευθερωθεί πλήρως στο μέσο της καλλιέργειας (113,114) και συγκεκριμένα η επαγωγή με PMA προκαλεί αργή έναρξη (δεκάδες δευτερόλεπτα έως λεπτά), αλλά μια παρατεταμένη (ώρες) περίοδο σύντηξης των WPB με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (115). Η χρώση του vWF αμέσως μετά την ολοκλήρωση της επώασης με PMA (Εικόνα 3.6, 0 h), που δίνει στικτό μοτίβο, ενώ το σχήμα των WPBs είναι μακρόστενο, βρίσκεται σε συμφωνία με την παραπάνω ερμηνεία.

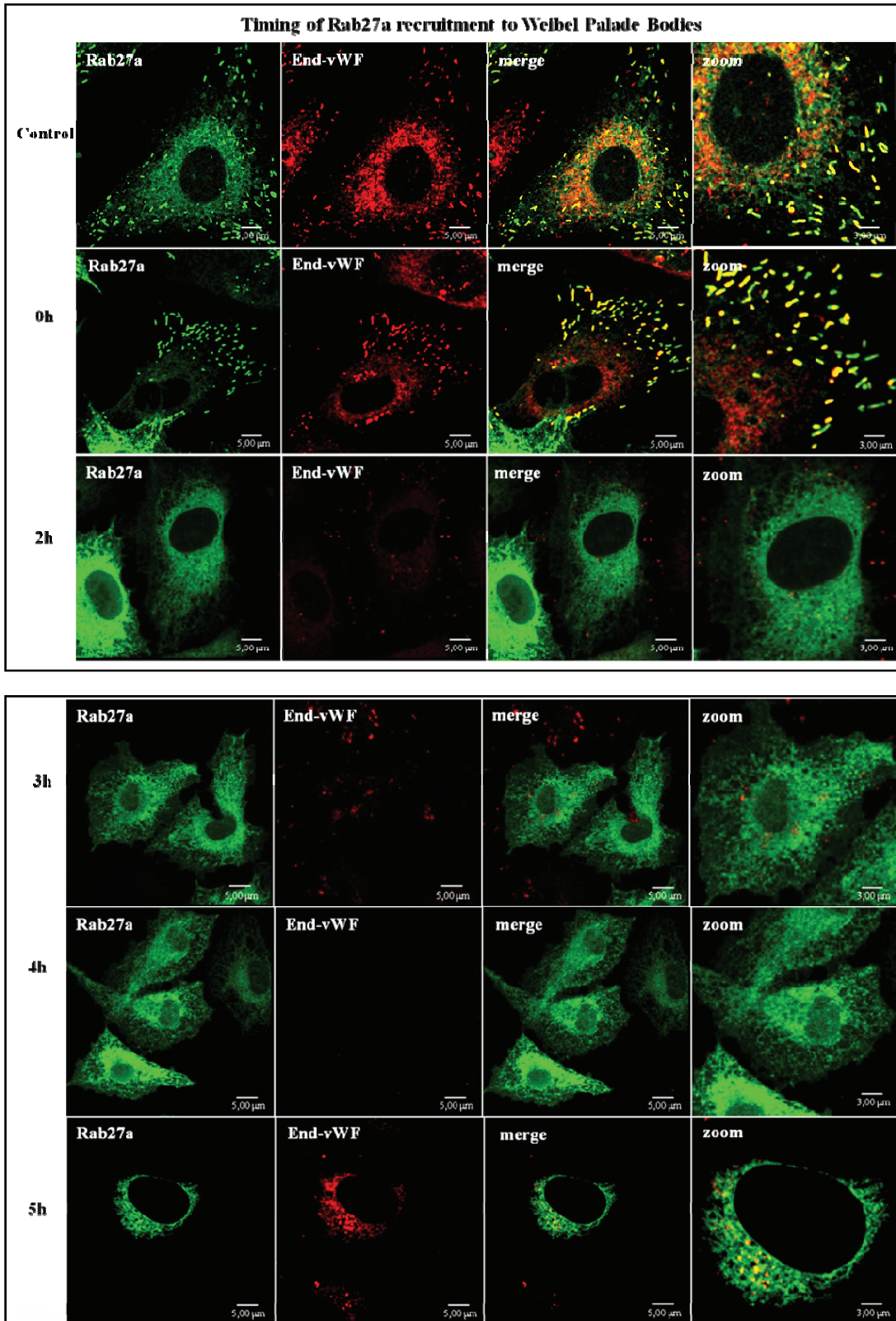
Συνεπώς, μετά από το PMA-επαγόμενο άδειασμα των προϋπαρχόντων WPBs, ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για την δημιουργία νέων WPBs είναι περίπου 4 ώρες. Ωστόσο, επειδή ο χρόνος αυτός εμφάνισε αποκλίσεις μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων (κατά 0,5 έως 1 ώρα), σε όλα τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήσαμε ανίχνευση δημιουργίας των νέων WPBs σε διάφορους χρόνους (time course).

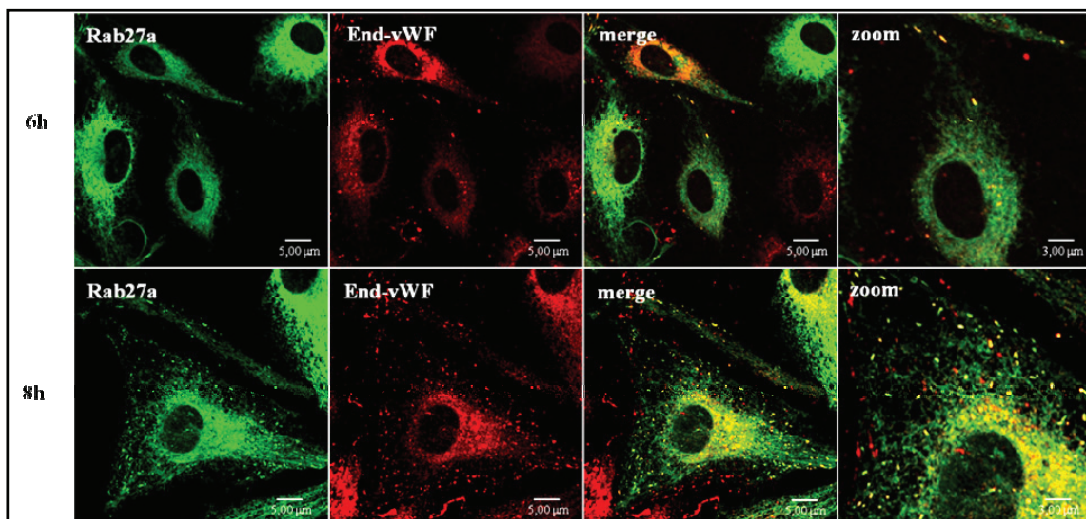
3.2.3 Οι Rabs των WPBs (3a, 15, 27a, 33, 37) στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs μία ώρα μετά τη δημιουργία τους

Έχοντας εγκαθιδρύσει τις συνθήκες ανίχνευσης των νεοσχηματιζόμενων WPBs, προχωρήσαμε στην εύρεση του χρόνου στρατολόγησης των Rabs στα νέα αυτά οργανίδια.

Αρχικά ελέγξαμε τον χρόνο στρατολόγησης της Rab27a, καθώς είναι η πιο καλά μελετημένη Rab των WPBs (90, 91, 100, 102, 103, 116) και απαντάται σε όλα τα ώριμα WPBs (90). Η Rab27a έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην αγκυροβόληση των ώριμων WPBs στον κυτταροσκελετό μέσω ενός τριμερούς συμπλόκου που αποτελείται από την Rab27a, τον τελεστή της MyRIP και τη μυοσίνη Va (102). Για την εύρεση του χρόνου στρατολόγησης της Rab27a, υπερεκφράστηκε η GFP-Rab27a σε κύτταρα HUVE και μετά από 48 ώρες προκαλέσαμε έκκριση των προϋπαρχόντων WPBs με επώαση των κυττάρων με PMA και μελετήθηκε η στρατολόγησή της GFP-Rab27a στα νεοσχηματιζόμενα WPBs, με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (confocal microscopy). Όταν τα κύτταρα ανέκαμψαν από την επίδραση του PMA, παρατηρήθηκε η δημιουργία των νέων WPBs στις 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων (Εικόνα 3.7, βλέπε χρώση του vWF), ενώ η έκφραση της Rab27a παραμένει ακόμη διάχυτη, γεγονός που καταδεικνύει πως η Rab27a δεν έχει ακόμη στρατολογηθεί στα WPBs. Η στρατολόγηση της Rab27a στη μεμβράνη των WPBs γίνεται αργότερα, στις 6 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, δηλ. 1 ώρα μετά τη δημιουργία των νέων

WPBs (Εικόνα 3.7, βλέπε συνεντοπισμό της Rab27a με τον ενδογενή vWF στις 6 ώρες). Από εκείνο το σημείο και μετά παρατηρήθηκε εκτενής στρατολόγηση της Rab27a στα WPBs (8 ώρες ανάκαμψης).

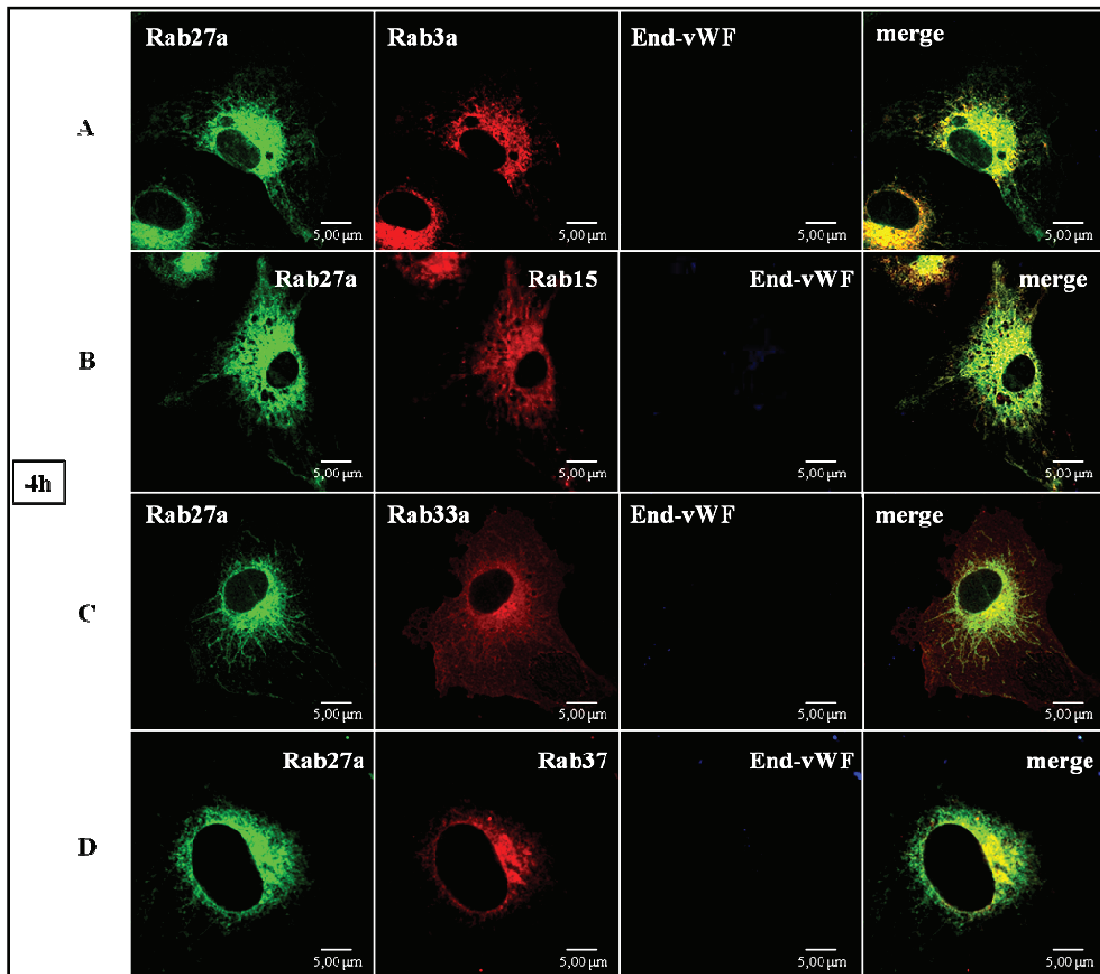


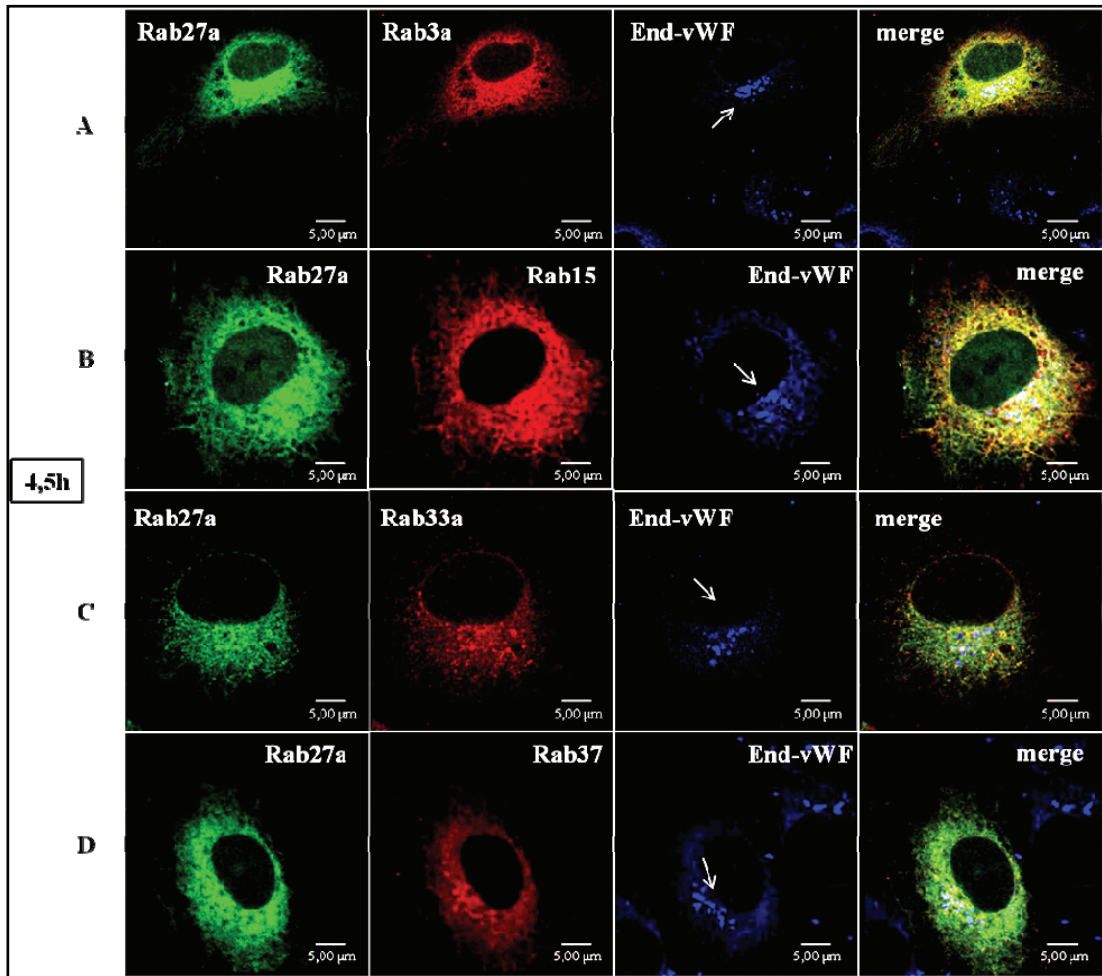


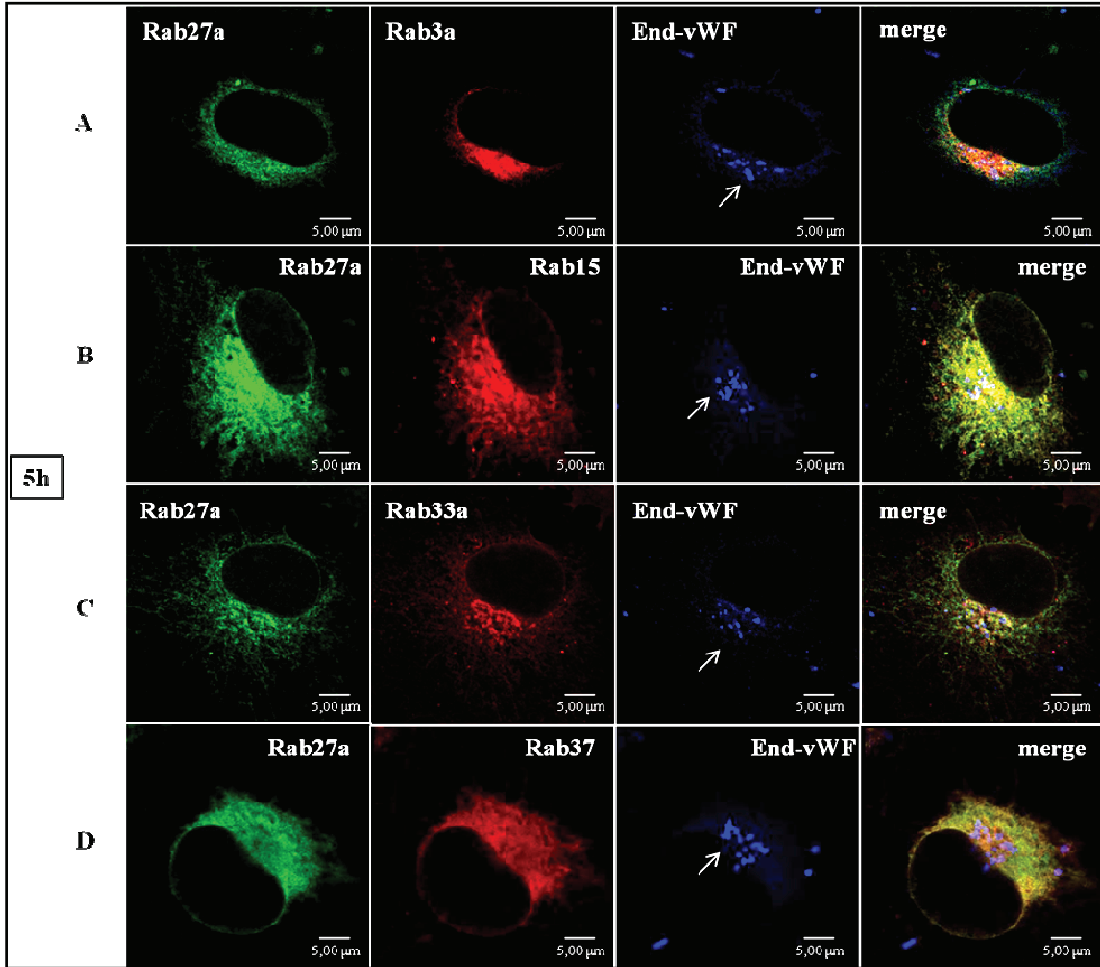
Εικόνα 3.7. Η Rab27a στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μία ώρα μετά τη δημιουργία τους από το Golgi. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με GFP-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), και έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και αφέθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο για να ανακάμψουν από την επίδρασή του PMA (από 2 έως 8 ώρες). Ύστερα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντισώματα έναντι του vWF (κόκκινο) και πολυκλωνικό έναντι του GFP (πράσινο), και τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείστε ότι στα κύτταρα μάρτυρες, στις 0 ώρες μετά την αφαίρεση του PMA, υπάρχει κανονική κατανομή των WPBs, σε αντίθεση με τις 2 και 3 ώρες ανάκαμψης όπου υπάρχει εκτεταμένη αφαίρεση των WPBs και η έκφραση της Rab27a είναι διάχυτη. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο στις 4 ώρες ανάκαμψης, όπου τα κύτταρα αδειάζουν πλήρως από WPBs (βλέπε χρώση για τον ενδογενή vWF, κόκκινο). Η δημιουργία των νεοσυντιθέμενων WPBs πραγματοποιείται στις 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, ενώ η Rab27a (πράσινο) στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs (κόκκινο) μία ώρα μετά τη δημιουργία τους (συνεντοπισμός στις 6 ώρες ανάκαμψης (κίτρινο) της Rab27a με τον ενδογενή vWF). Από εκείνο το σημείο και μετά παρατηρήθηκε πως τα περισσότερα WPBs στρατολογούν την Rab27a (8 ώρες ανάκαμψης). Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

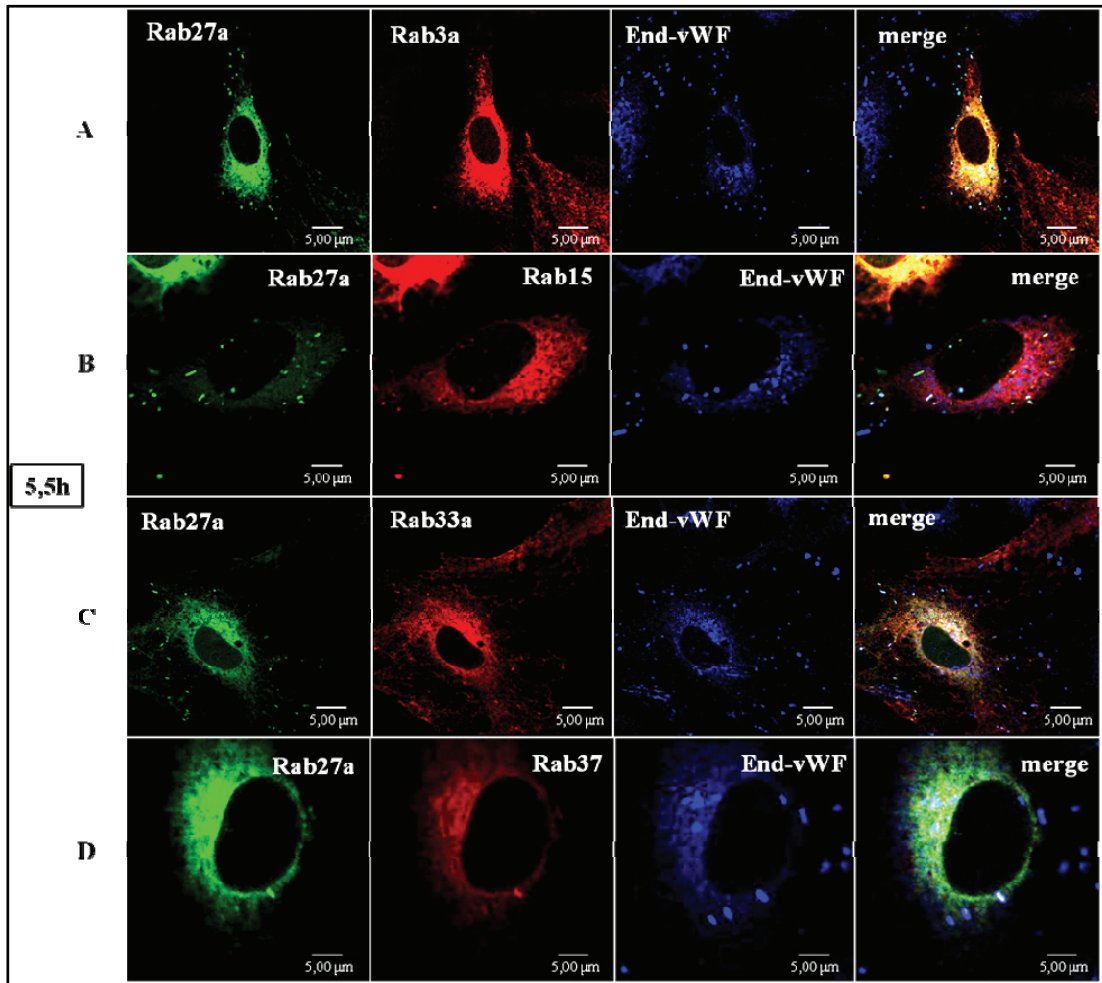
Στη συνέχεια, έχοντας ως πρωτεύειν αναφοράς την Rab27a, πραγματοποιήσαμε μελέτη του χρόνου στρατολόγησης και των υπολοίπων τεσσάρων Rabs στη μεμβράνη των WPBs. Έτσι, σε 4 ξεχωριστά πηγαδάκια κυττάρων HUVE, υπερεκφράστηκαν ταυτόχρονα η GFP-Rab27a μαζί με κάθε μία από τις άλλες 4 Rabs [Εικόνα 3.8: GFP-Rab27a και mcherry-Rab3a (σειρά A), GFP-Rab27a και mcherry-Rab15 (σειρά B), GFP-Rab27a και mcherry-Rab33a (σειρά C), GFP-Rab27a και mcherry-Rab37 (σειρά D)], και η στρατολόγησή τους μελετήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ. Κατά τον ανοσοφθορισμό, μαζί με τις Rabs που υπερεκφράστηκαν, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του ενδογενούς vWF ώστε να εντοπιστεί ο χρόνος δημιουργίας των νεοσυντιθέμενων WPBs μετά την ανάκαμψη από το PMA. Τέσσερις ώρες μετά την αφαίρεση του PMA παρατηρήθηκε ότι έχουν ήδη αδειάσει τα WPBs του κυττάρου (Εικόνα 3.8, 4 ώρες). Η δημιουργία των νέων

WPBs στο Golgi εμφανίζεται στις 4,5 και 5 ώρες, ενώ οι Rabs εκφράζονται ακόμη διάχυτα (Εικόνα 3.8, 4,5 και 5 ώρες). Οι παραπάνω Rabs στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs περίπου 1 ώρα αργότερα (στις 5,5 ώρες) (Εικόνα 3.8, 5,5 ώρες), όπως υποδεικνύεται από το συνεντοπισμό των Rabs με τον vWF (λευκό), ενώ η στρατολόγησή τους στα WPBs αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου (Εικόνα 3.8, 8ώρες).

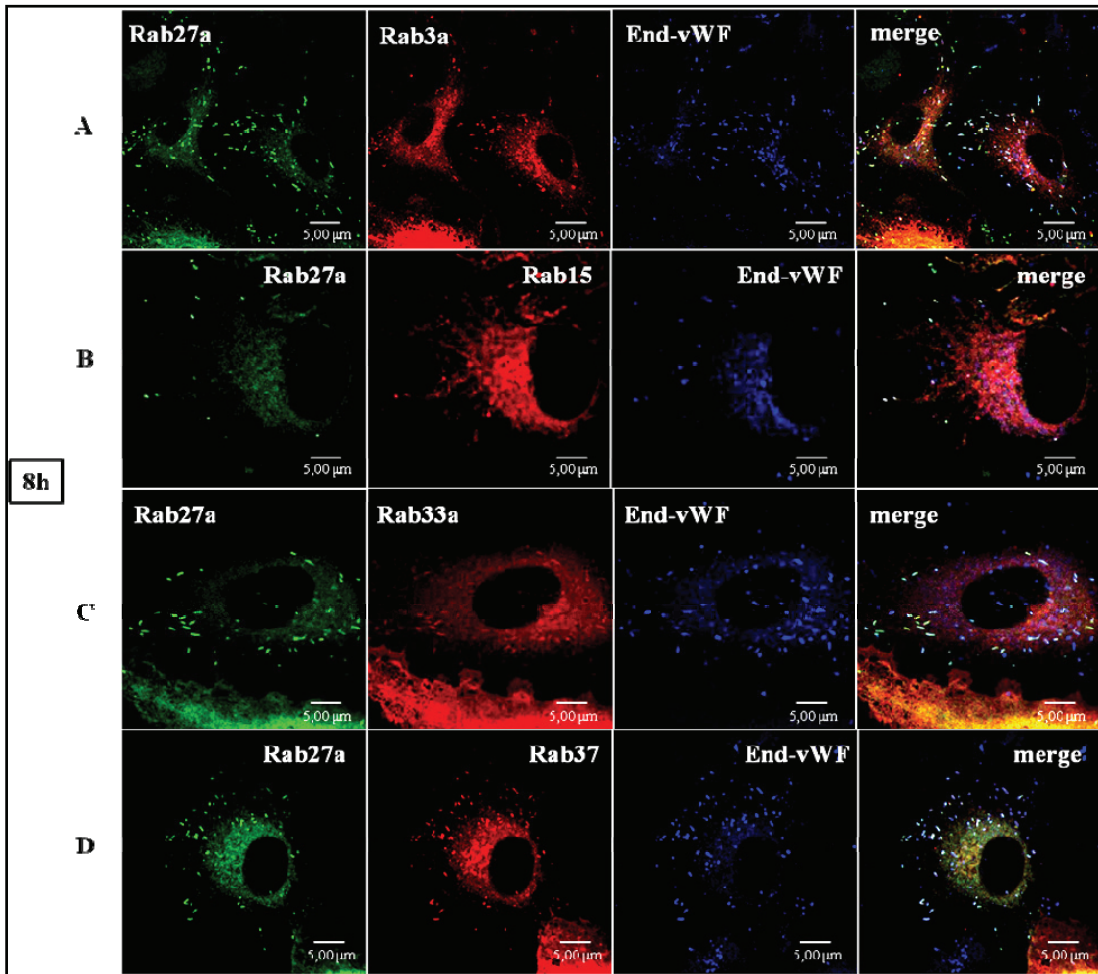








5,5h



Εικόνα 3.8. Στρατολόγηση της Rab27a (πράσινο), Rab3a, Rab15, Rab33a, Rab37 (κόκκινο), στη μεμβράνη των WPBs μία ώρα μετά τη δημιουργία του vWF (μπλε). Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γάλλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με GFP-Rab27a και mcherry-Rab3a, Rab15, Rab33a, ή Rab37 (βλέπε σειρά A, B, C, D, αντίστοιχα). Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και αφέθηκαν να ανακάμψουν από την επίδρασή του φαρμάκου (από 4 έως 8 ώρες). Ύστερα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (μπλε), πολυκλωνικό έναντι του GFP (πράσινο) και πολυκλωνικό έναντι του mcherry (κόκκινο) και τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρήστε ότι στις 4 ώρες ανάκαμψης τα κύτταρα έχουν ήδη αδειάσει από WPBs - αποκαλύφθηκε με χρώση για τον ενδογενή vWF (μπλε) - ενώ η έκφραση των Rabs είναι διάχυτη. Η δημιουργία των νεοσυντιθέμενων WPBs (υποδεικνύεται από τα βέλη) πραγματοποιείται στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, ενώ η έκφραση των Rabs συνεχίζει να είναι διάχυτη. Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων πραγματοποιείται η στρατολόγηση των Rab27a (πράσινο) Rab3a, Rab15, Rab33a, Rab37 (κόκκινο) στη μεμβράνη των WPBs, δηλαδή μία ώρα μετά τη δημιουργία των νεοσυντιθέμενων WPBs (υποδεικνύεται με τον συνεντοπισμό μεταξύ των Rabs και του ενδογενούς vWF, λευκό χρώμα). Στις 8 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων παρατηρήθηκε πως τα περισσότερα WPBs στρατολογούν όλες τις Rabs στη μεμβράνη τους (λευκό). Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

Τα μέχρι τώρα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι οι Rabs στρατολογούνται σχετικά πρώιμα στη μεμβράνη των WPBs (περίπου μία ώρα μετά τη δημιουργία των νέων WPBs), γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρόλο των Rabs στην ωρίμανση και τη μετακίνηση των

κυστιδίων. Επισημαίνεται πως τα WPBs απαιτούν σημαντικό χρόνο για να ωριμάσουν πλήρως, δηλαδή να δημιουργηθούν τα πολυμερή του vWF και να αποκτήσουν τα οργανίδια το χαρακτηριστικό σχήμα πούρου, και στη συνέχεια να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν πως τα νεοσχηματιζόμενα WPBs στερούνται την Rab27a (116).

3.2.4 Οι Rab27a και Rab33a στρατολογούνται στην πρόιμη φάση της ζωής WPBs

Τα αποτελέσματα της υποενότητας 3.2.3 κατέδειξαν πως οι Rabs των WPBs (3a, 15, 27a, 33, 37) στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs, περίπου 1 ώρα μετά τη δημιουργία των νεοσυντιθέμενων WPBs. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας προέρχονται από κύτταρα που είχαν μονιμοποιηθεί σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, τα παραπάνω ευρήματα του χρόνου στρατολόγησης προέρχονται από στιγμιότυπα που απέχουν χρονικά μεταξύ τους μεγάλα σχετικά διαστήματα. Έτσι, με την παραπάνω μεθοδολογία, δεν ήταν δυνατό να αποκαλυφθούν τυχόν μικρές διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στο χρόνο στρατολόγησης των διαφορετικών Rabs. Προκειμένου να αντιμετωπισθούν οι περιορισμοί αυτοί, προχωρήσαμε σε πειράματα μικροσκοπίας σε πραγματικό χρόνο.

Για το σκοπό αυτό, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο (time-lapse video microscopy), χρησιμοποιώντας τις Rabs ανά δύο, συζευγμένες με φθοριοχρώματα που να επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευσή τους. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές GFP και mcherry. Ωστόσο, ενώ το πρόσδεμα GFP αποδείχθηκε ότι πληροί τις ανάγκες (ικανοποιητική φωτεινότητα, αντοχή στην επανειλημμένη ακτινοβολία με λέιζερ), το πρόσδεμα mcherry εμφάνισε τα εξής τεχνικά προβλήματα:

- Δεν ήταν αρκετά φωτεινό φθοριοχρώμα για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης. Στα προηγούμενα πειράματα ανοσοφθορισμού, σε μονιμοποιημένα κύτταρα, χρησιμοποιήσαμε αντισώματα για ενίσχυση του φθοριοχρώματος, γεγονός που διευκόλυνε την ανίχνευση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, στη μικροσκοπία ζωντανών κυττάρων δεν είναι εφικτή η χρήση αντισωμάτων.
- Λόγω της χαμηλής φωτεινότητας του mcherry, χρησιμοποιήσαμε υψηλή ακτινοβολία με λέιζερ ώστε να διεκδικήσουμε το μέγιστο δυνατό από την διέγερση και εκπομπή του προσδέματος αυτού. Όμως, μάλλον λόγω της υψηλής έκθεσης στο λέιζερ, τα κύτταρα παρουσίαζαν χαρακτηριστικά που δήλωναν υψηλό στρες, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως φωτοτοξικότητα.

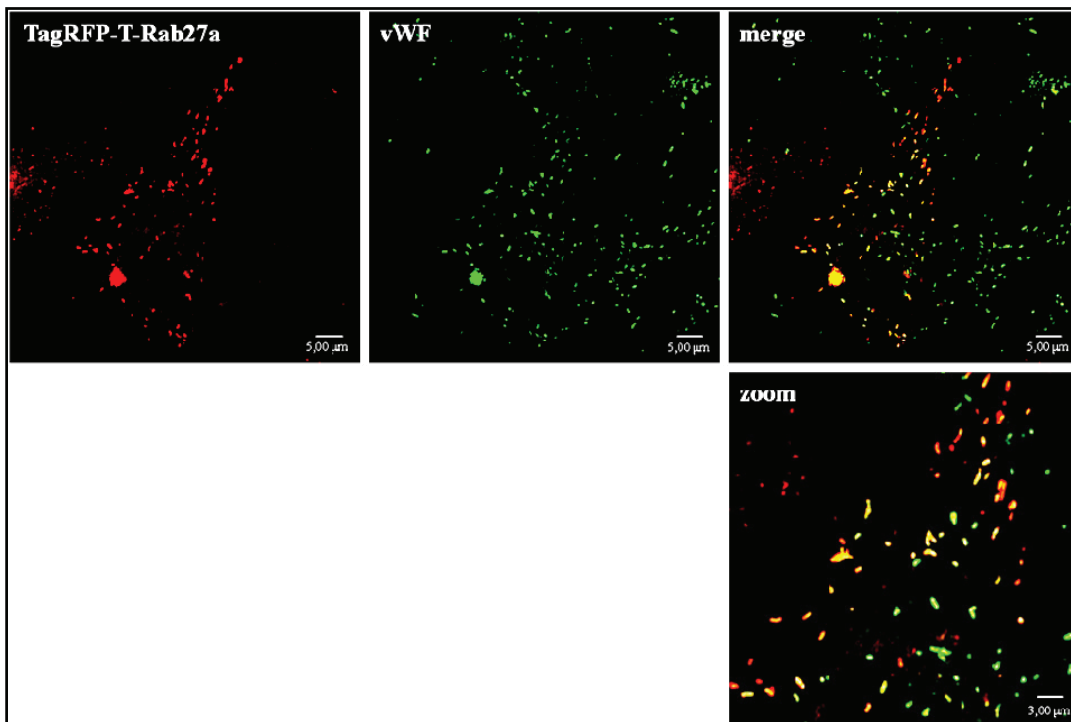
- Το mcherry εμφάνιζε το φαινόμενο του ξεθωριάσματος (photobleaching), δηλαδή απώλεια του φθορισμού του μετά από έκθεση στο λέιζερ.

Ένα επιπλέον τεχνικό πρόβλημα, ανεξάρτητο του mcherry, ήταν η απώλεια της εστίασης (focus) κατά τη διάρκεια της video μικροσκοπίας, λόγω διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του πλαστικού πιάτου και του θαλάμου του μικροσκοπίου (37⁰C).

Τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίστηκαν ως εξής:

- ✓ Το πρόσδεμα mcherry αντικαταστάθηκε από το πρόσδεμα TagRFP-T, το οποίο είναι από τα πιο φωτεινά και σταθερά φθοριοχρώματα (117,118)
- ✓ Χρησιμοποιήθηκε χαμηλότερη ένταση του λέιζερ ή/και χαμηλότερη μεγέθυνση της περιοχής του ενδιαφέροντος.
- ✓ Πραγματοποιήσαμε τα πειράματα video μικροσκοπίας στους 21⁰C.

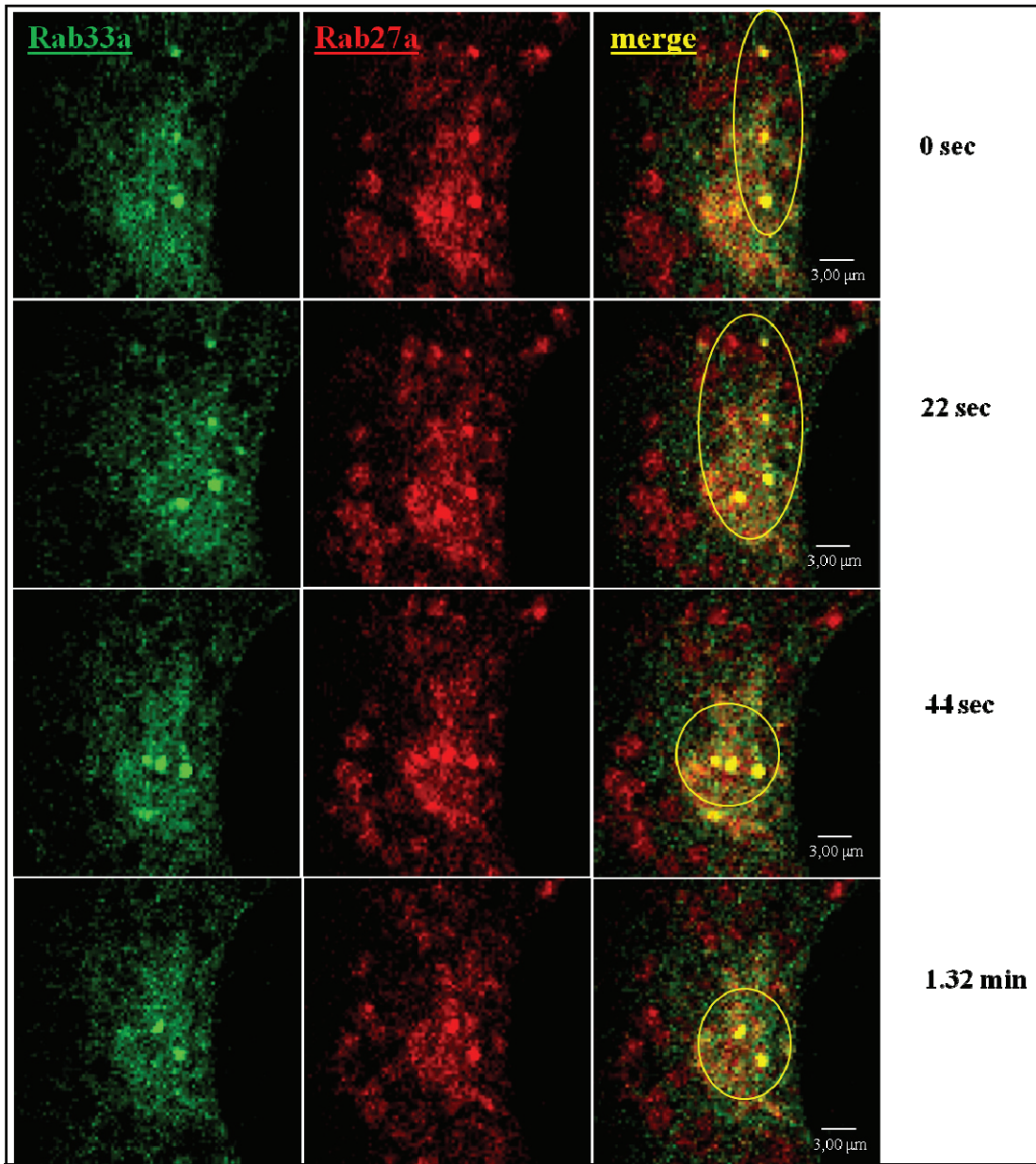
Αρχικά, το πρόσδεμα TagRFP-T τοποθετήθηκε στην Rab27a, και βεβαιωθήκαμε ότι δεν επηρεάζει την στρατολόγησή της στην μεμβράνη των WPBs (Εικόνα 3.9).

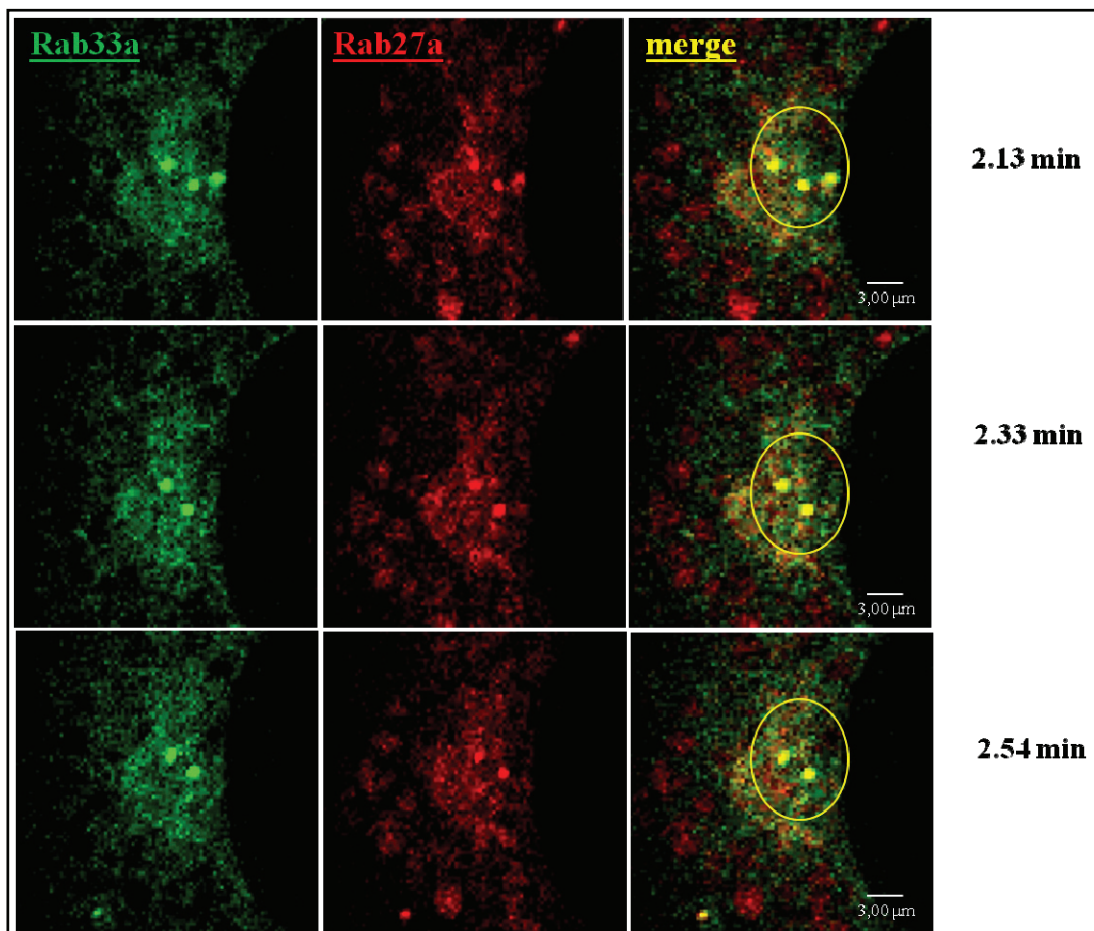


Εικόνα 3.9. Το πρόσδεμα TagRFP-T δεν επεμβαίνει στη στόχευση της Rab27a στα WPBs. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γνάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της TagRFP-T-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (πράσινο), και τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Όπως προκύπτει από την εικόνα, η Rab27a (κόκκινο) εντοπίζεται στα WPBs (πράσινο/vWF), κάτι που αποδεικνύεται από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό (κίτρινο). Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε πειράματα video μικροσκοπίας συνδυάζοντας την TagRFP-T-Rab27a με τις άλλες 4 Rabs συζευγμένες με GFP, σε συνδυασμό ανά δύο. Στα πειράματα αυτά, η TagRFP-T-Rab27a χρησιμεύει επίσης ως μάρτυρας των WPBs, καθώς απαντάται σε όλα τα ώριμα WPBs (90) και είναι η πιο καλά μελετημένη Rab των οργανιδίων αυτών (90, 91, 100, 102, 103, 116).

Αρχικά ελέγξαμε τον συνδυασμό των TagRFP-T-Rab27a και GFP-Rab33a, οι οποίες υπερεκφράστηκαν μαζί σε κύτταρα HUVE. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και αφέθηκαν να ανακάμψουν από την επίδρασή του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C, παίρνοντας μία εικόνα κάθε 22 δευτερόλεπτα. Η καταγραφή του βίντεο ξεκίνησε από τα πρώτα στάδια της ζωής των WPBs, όταν αυτά είναι ακόμη πολύ λίγα σε αριθμό και έχουν σχήμα ωοειδές (Εικόνα 3.10). Το πείραμα αυτό κατέδειξε ότι οι Rab33a και Rab27a συνεντοπίζονται ήδη στα πρώιμα αυτά στάδια της ζωής των WPBs (Εικόνα 3.10). Επιπλέον, καθ'όλη τη διάρκεια του video, δεν αποσύρεται από τα WPBs κάποια από τις 2 αυτές, τουλάχιστον σε μαζικό επίπεδο. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως οι Rab27a και Rab33a στρατολογούνται στα πρώιμα WPBs, και ότι δεν απομακρύνονται από αυτά τουλάχιστον για το διάστημα που διαρκεί το video.



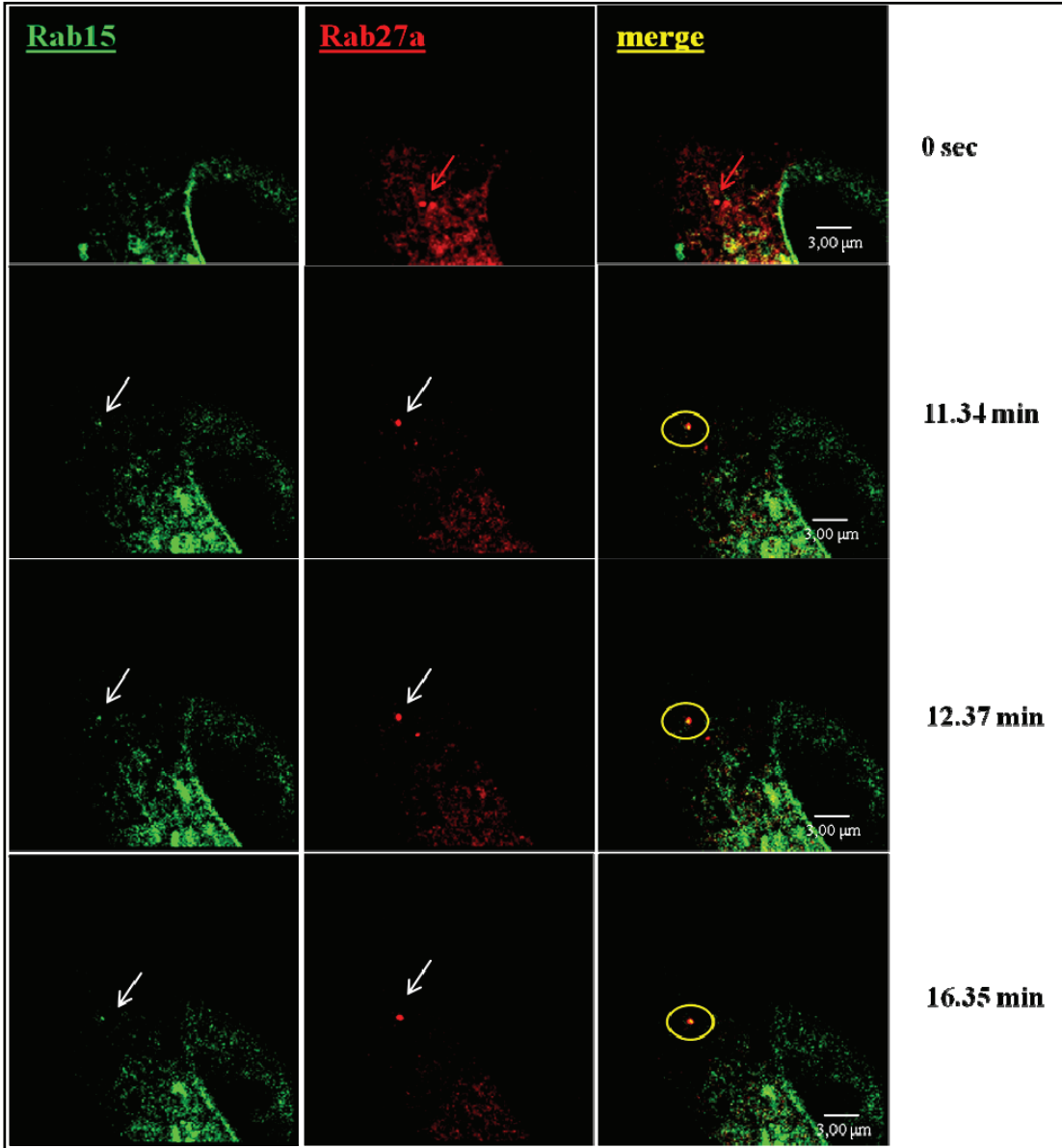


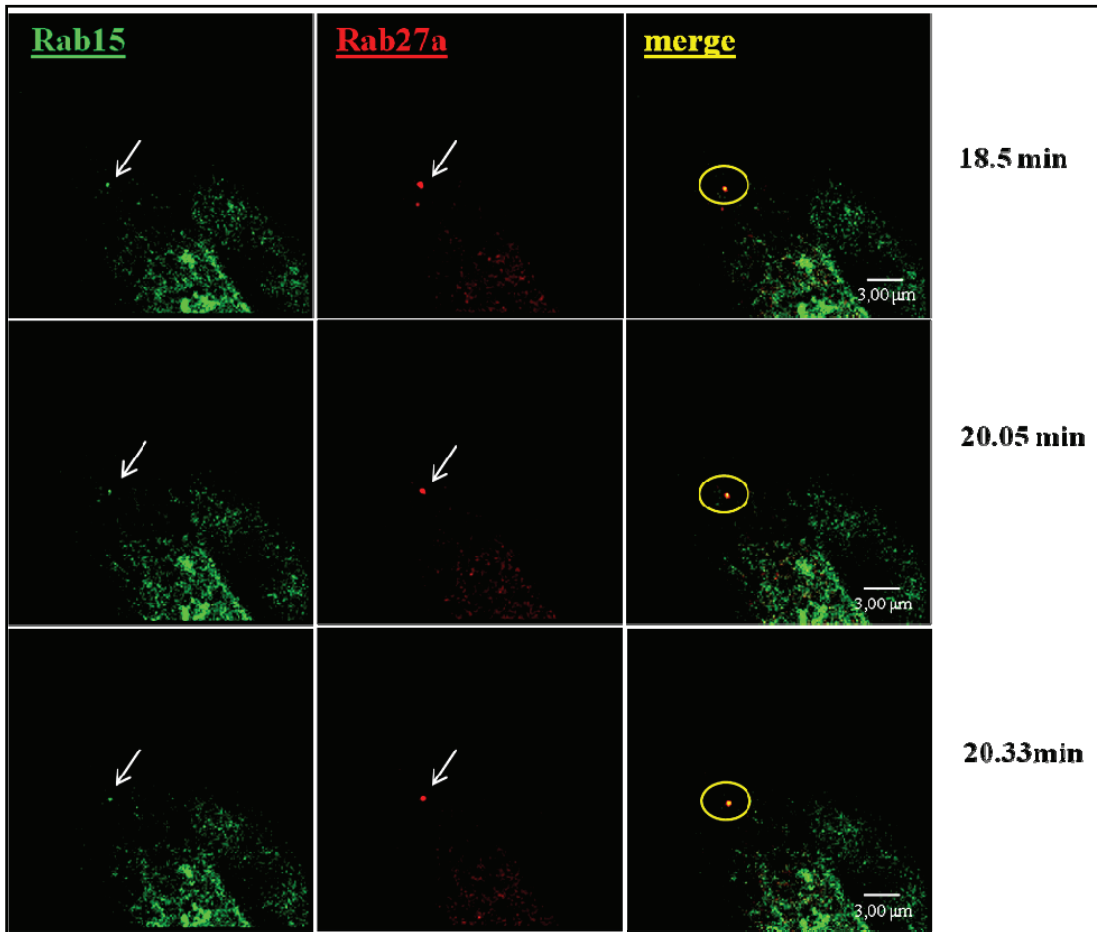
Σχήμα 3.10. Η στρατολόγηση των Rab27a και Rab33a πραγματοποιείται στα πρώιμα στάδια της ζωής των WPBs. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με GFP-Rab33a και TagRFP-T-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C. Παρατηρείστε ότι η Rab33a (πράσινο) και η Rab27a (κόκκινο) έχουν ήδη στρατολογηθεί στα πρώιμα WPBs (υποδεικνύεται από το ωσειδές τους σχήμα και από το μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Οι συνθήκες του video ήταν: zoom 2,7, οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 22 δευτερόλεπτα, συνολική διάρκεια video 10 λεπτά. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3.

3.2.5 Η Rab15 στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μετά την Rab27a

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην σύγκριση του χρόνου στρατολόγησης των GFP-Rab15 και TagRFP-T-Rab27a, οι οποίες υπερεκφράστηκαν μαζί σε κύτταρα HUVE. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η Rab27a χρησιμεύει όχι μόνο ως μόριο αναφοράς για τη σύγκριση του χρόνου στρατολόγησης των Rabs, αλλά ενέχει και ρόλο μάρτυρα των WPBs. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA, πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα

δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C. Από την ανάλυση του video προέκυψε ότι στον χρόνο 0 δευτερόλεπτα, από την έναρξη της φωτογράφισης, η Rab27a έχει στρατολογηθεί στη μεμβράνη των WPBs (Εικόνα 3.11, 0 sec, υποδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη), ενώ η έκφραση της Rab15 είναι ακόμη διάχυτη (Εικόνα 3.11, 0 sec). Η στρατολόγηση της Rab15 (στο ίδιο WPB, λευκά βέλη) λαμβάνει χώρα περίπου 11 λεπτά αργότερα (Εικόνα 3.11, χρόνος 11.34 min, υποδεικνύεται από το ωοειδές σχήμα και τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Από εκείνο το σημείο και μετά, οι δύο Rabs παρέμειναν στρατολογημένες στη μεμβράνη των νεοσυντιθέμενων WPBs, χωρίς καμία να αποσυνδέεται, όπως παρατηρήσαμε και για το ζευγάρι Rab27a/Rab33a. Οι παραπάνω παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Rab15 στρατολογείται στα WPBs μετά την Rab27a.



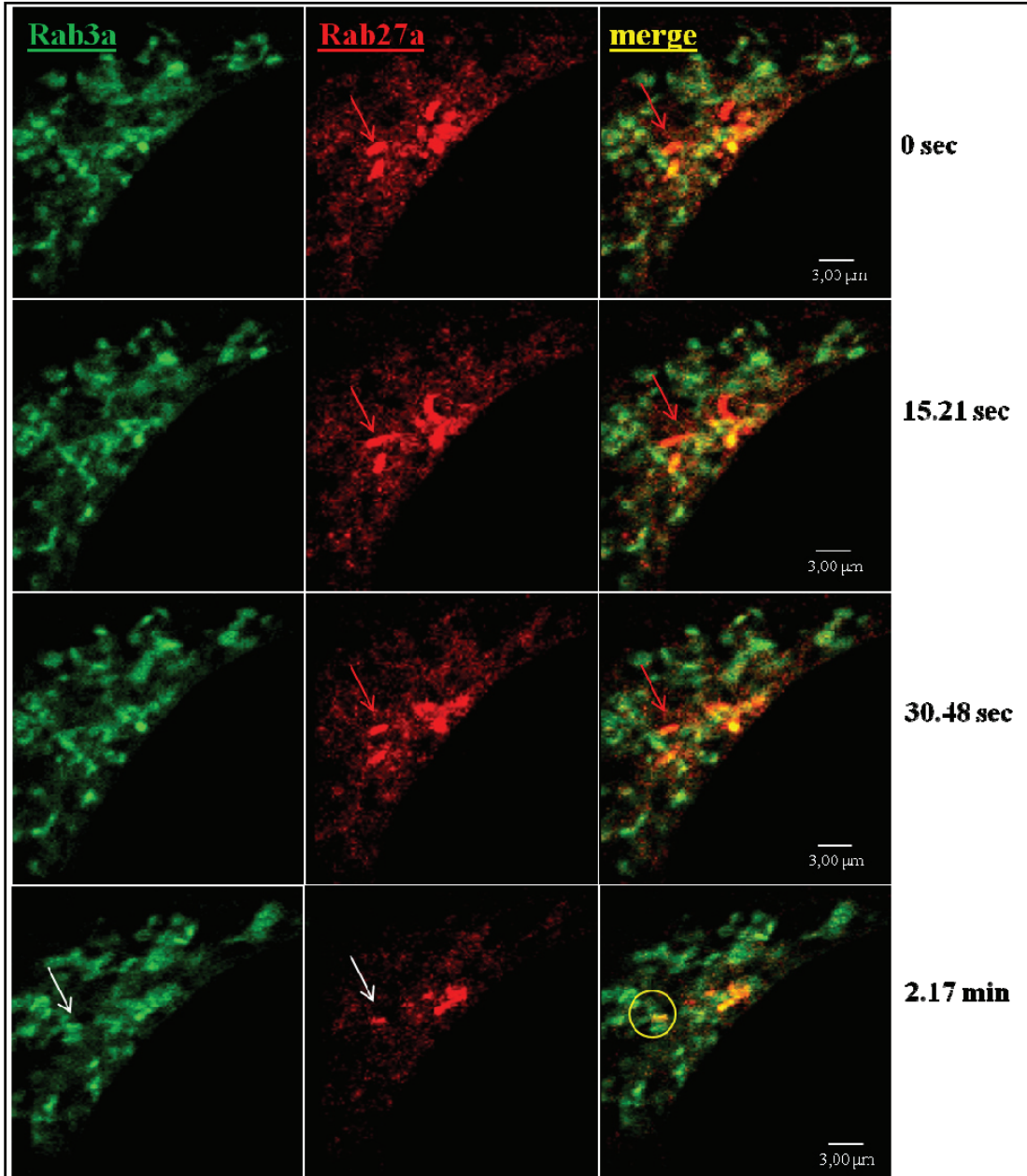


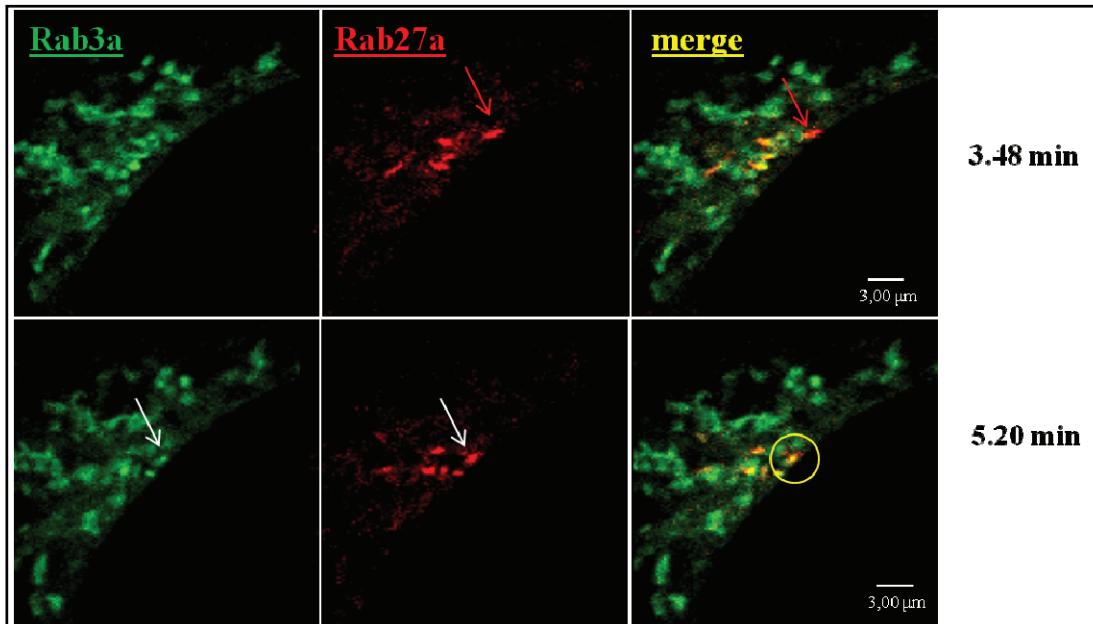
Εικόνα 3.11. Η Rab15 στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μετά την Rab27. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με GFP-Rab15 και TagRFP-T-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδρασή του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C. Στο χρόνο 0 sec παρατηρούμε τη στρατολόγηση της Rab27a (κόκκινα βέλη), ενώ δεν υπάρχει κάποιο WPB που να στρατολογεί την Rab15. Στη συνέχεια, 11.34 min μετά την Rab27a (κόκκινο), παρατηρείται η στρατολόγηση της Rab15 (πράσινο) στη μεμβράνη των WPBs (υποδεικνύεται από τα ωσειδή σχήματα και το μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Τα λευκά βέλη αναφέρονται στο ίδιο WPB. Οι συνθήκες του video ήταν: zoom 4, οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 2,6 δευτερόλεπτα, συνολική διάρκεια video 21 λεπτά. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 3.

3.2.6 Η Rab3a στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μετά την Rab27a

Όπως προηγουμένως, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με GFP-Rab3a και TagRFP-T-Rab27a. Μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA, ακολούθησε πλύση με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτών των Rabs, αντιμετωπίσαμε το πρόβλημα ότι δεν

καταφέραμε να εντοπίσουμε κύτταρα τα οποία να είχαν λίγα νεοσυντιθέμενα WPBs, γεγονός που δυσχέραινε την παρακολούθηση μεμονωμένων οργανιδίων. Ακόμη, η κάθε εικόνα του video απείχε από την προηγούμενη 15 δευτερόλεπτα, οπότε δεν ήταν εύκολη η παρακολούθηση κάποιου συγκεκριμένου WPB, καθώς μετακινούνταν και χάνονταν από το πεδίο. Παρά τα τεχνικά αυτά εμπόδια, από το πείραμα αυτό προέκυψαν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Έτσι, στην Εικόνα 3.12, στο χρόνο 0 δευτερόλεπτα, παρατηρούμε WPBs στα οποία έχει ήδη στρατολογηθεί η Rab27a (υποδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη), από τα οποία απουσιάζει η Rab3a. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει ότι, τουλάχιστον σε ένα μέρος των WPBs, η Rab3a στρατολογείται μετά από την Rab27a. Σε συμφωνία με το συμπέρασμα αυτό, ο συνεντοπισμός μεταξύ των δύο Rabs (κλάσμα κίτρινων προς κόκκινων κυστιδίων) αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου. Πιο ειδικά, κατά την επεξεργασία της μικροσκοπίας σε πραγματικό χρόνο παρατηρείται πως η Rab3a στρατολογείται 2 λεπτά μετά την Rab27a (Εικόνα 3.12, 2.17 min, λευκά βέλη), υποδεικνύεται από το ωοειδές σχήμα και το μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο στο ίδιο WPB). Το ίδιο ισχύει και κατά τη συνέχεια της μικροσκοπίας σε πραγματικό χρόνο, δηλαδή στα 3.48 λεπτά υπάρχει ένα WPB στο οποίο εντοπίζεται η Rab27a (υποδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη) αλλά όχι η Rab3a. Η στρατολόγηση της Rab3a (στο ίδιο WPB, λευκά βέλη), γίνεται περίπου 2 λεπτά πιο μετά, στα 5.20 min (υποδεικνύεται από το ωοειδές σχήμα και τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Ακόμη όμως και λανθασμένη να είναι η παραπάνω παρατήρηση, δηλαδή να μην είναι το ίδιο WPB, σε κάθε περίπτωση η Rab27a (κόκκινο) προηγείται της Rab3a (πράσινο), όπως αντιλαμβανόμαστε από το πλήθος Rab27a-θετικών κυστιδίων τα οποία είναι αρνητικά προς την Rab3a, καθώς το αντίθετο δεν συμβαίνει.



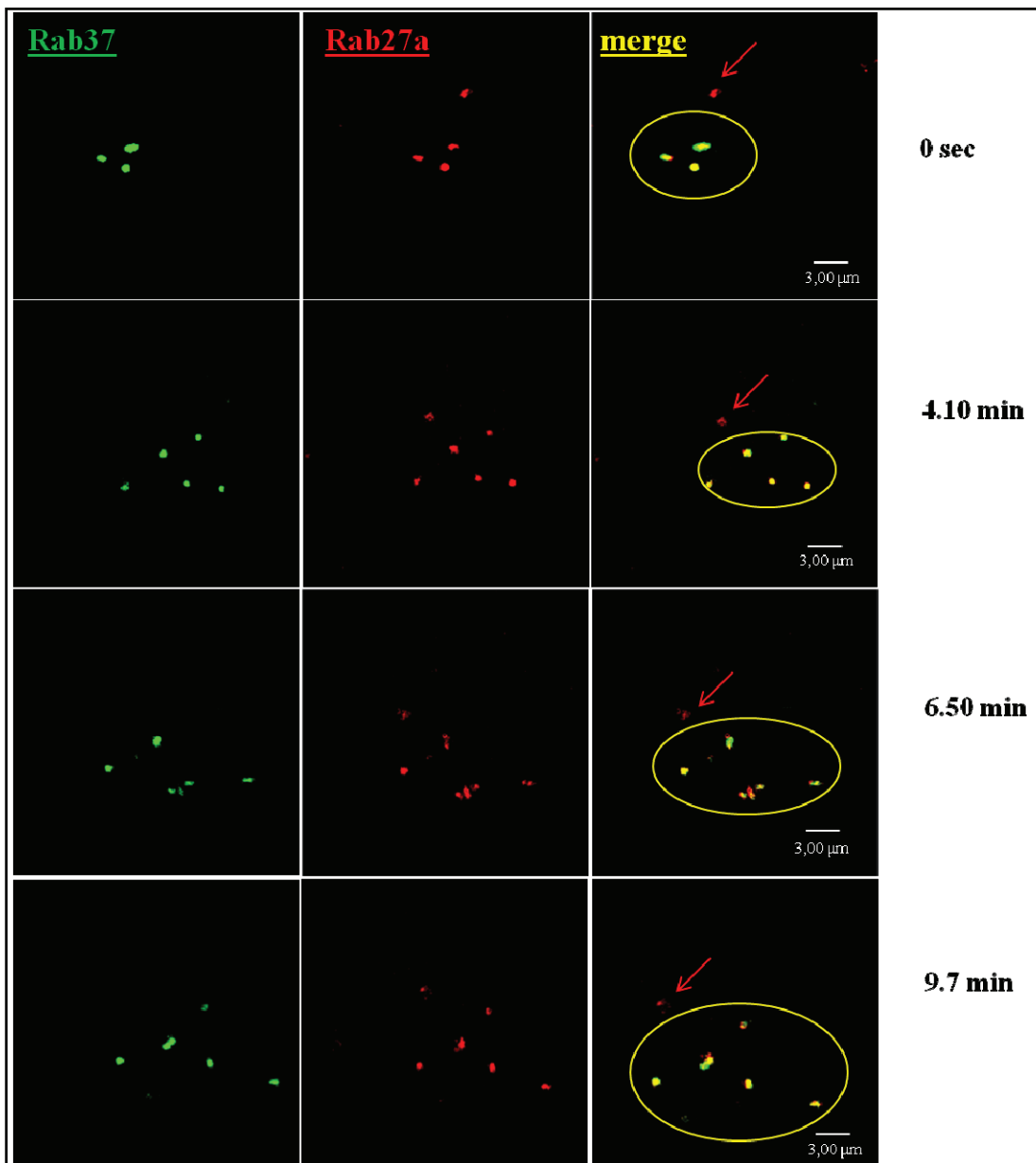


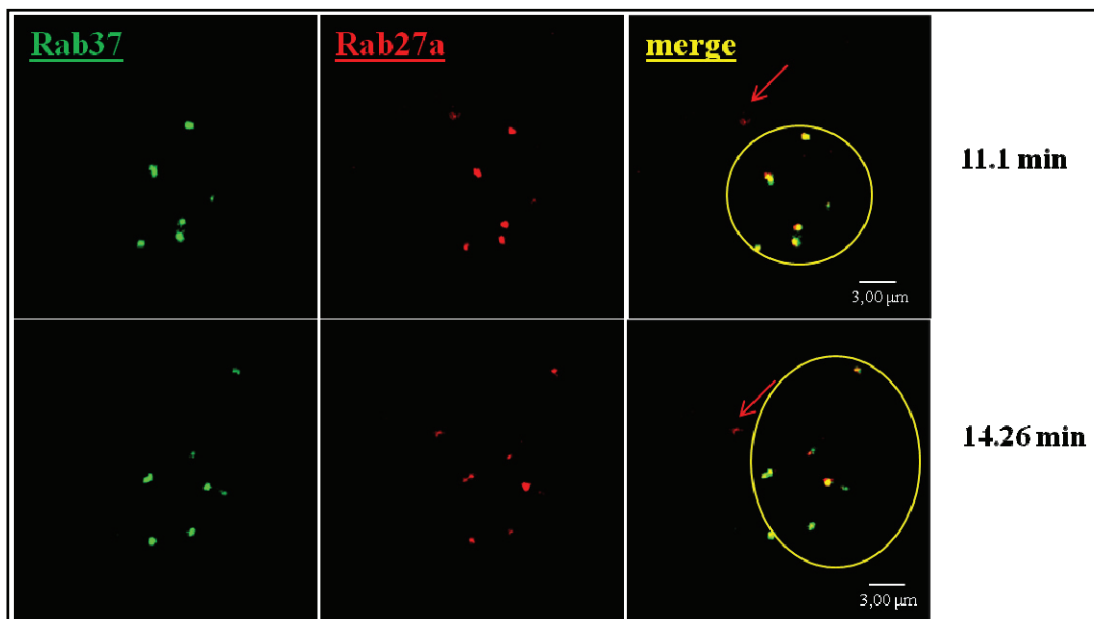
Εικόνα 3.12. Η Rab3a στρατολογείται στη μεμβράνη των WPBs μετά τη Rab27a. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με GFP-Rab3a και TagRFP-T-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδρασή του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C. Στο χρόνο 0 sec παρατηρούμε τη στρατολόγηση της Rab27a (κόκκινο) στα WPBs (υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη), από τα οποία απουσιάζει η Rab3a. Κατά την παρέλευση του χρόνου, φαίνεται πως η Rab3a (πράσινο) στρατολογείται 2 λεπτά μετά την Rab27a (κόκκινο) (υποδεικνύεται από το ωσειδές σχήμα, από τα λευκά βέλη και το μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Το ίδιο ισχύει και κατά τη συνέχεια της μικροσκοπίας σε πραγματικό χρόνο, δηλαδή στα 3.48 min υπάρχει ένα WPB που στρατολογεί τη Rab27a (κόκκινο) (υποδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη) και όχι τη Rab3a. Η στρατολόγηση της Rab3a (στο ίδιο WPB, λευκά βέλη), γίνεται πάλι περίπου 2 λεπτά πιο μετά, στα 5.20, υποδεικνύεται από το ωσειδές σχήμα και τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Οι παρατηρήσεις αυτές καταδεικνύουν ότι, τουλάχιστον σε ένα μέρος των WPBs, η Rab3a στρατολογείται μετά από την Rab27a. Οι συνθήκες του video ήταν: zoom 3,8, οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 15,2 δευτερόλεπτα, συνολική διάρκεια video 17 λεπτά. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 4.

3.2.7 Η Rab37 συνεντοπίζεται με την Rab27a ήδη από τα πρώιμα στάδια της ζωής των WPBs

Κύτταρα HUVE που διαμολύνθηκαν με GFP-Rab37 και TagRFP-T-Rab27a, ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C (Εικόνα 3.13). Από την ανάλυση του video προέκυψε ότι ήδη από τον χρόνο 0 δευτερόλεπτα, δηλαδή κατά την έναρξη της φωτογράφισης, όλα σχεδόν τα πρώιμα WPBs ήταν θετικά και στις δύο Rabs

(υποδεικνύεται από το ωοειδές σχήμα και από το μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο). Επίσης, καθ'όλη τη διάρκεια του video και οι 2 Rabs παραμένουν στρατολογημένες στη μεμβράνη των ίδιων νέων WPBs, χωρίς καμία να αποσυνδέεται. Σημειώνεται ωστόσο πως οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 22,8 δευτερόλεπτα· οπότε δεν μπορεί να αποκλειστεί η αποσύνδεση κάποιας από τις δύο Rabs στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως οι Rab27a και Rab37 συνεντοπίζονται στα πρώιμα WPBs και δεν απομακρύνονται από αυτά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Εξαιρέση αποτελεί ένα κυστίδιο (κόκκινα βέλη), θετικό ως προς την Rab27a, το οποίο δεν στρατολογεί τη Rab37. Έτσι, στο μεγαλύτερο μέρος των WPBs, η Rab37 στρατολογείται μαζί με την Rab27a.





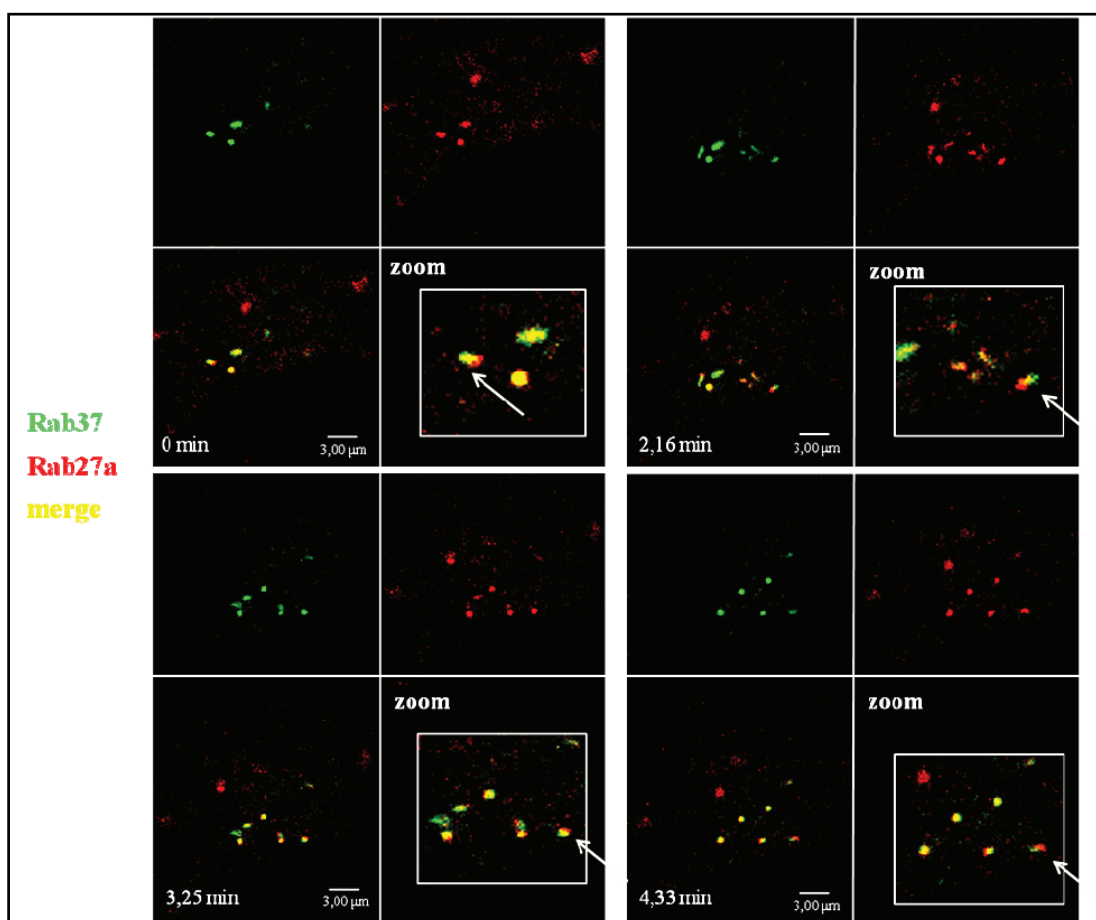
Εικόνα 3.13. Οι Rab37 και Rab27a συσπειρώνονται στα πρώιμα WPBs. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με GFP-Rab37 και TagRFP-T-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδρασή του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21⁰C. Παρατηρείστε πως η Rab37 (πράσινο) και η Rab27a (κόκκινο) έχουν ήδη στρατολογηθεί στα πρώιμα στάδια της ζωής των WPBs, από την αρχή της ανάλυσης (υποδεικνύεται από τα ωοειδή σχήματα και από το μεταξύ τους συσπειρωμένο-κίτρινο). Εξαιρέση αποτελεί ένα κυστίδιο (κόκκινα βέλη), θετικό ως προς την Rab27a, το οποίο δεν στρατολογεί τη Rab37. Έτσι, στο μεγαλύτερο μέρος των WPBs, η Rab27a στρατολογείται μαζί με την Rab37. Οι συνθήκες του video ήταν: zoom 6,9, οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 22,8 δευτερόλεπτα, συνολική διάρκεια video 50 λεπτά. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 9.

Συμπερασματικά, από το σύνολο των μέχρι τώρα πειραμάτων, μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού σε δεδομένα χρονικά σημεία αλλά και βίντεο μικροσκοπίας, η σειρά των βημάτων στρατολόγησης των Rabs στη μεμβράνη των πρώιμων WPBs, και ο κατά προσέγγιση χρόνος που αυτή συμβαίνει σε σχέση με την δημιουργία τους είναι:

1. Σχηματισμός από το Golgi των νεοσυντιθέμενων WPBs, στα οποία εισέρχονται τα νεοσχηματισμένα μόρια του vWF
2. Περίπου μία ώρα μετά, στρατολογούνται οι Rab27a, Rab33a και Rab37
3. Μετά από περίπου 2 λεπτά, στρατολόγηση της Rab3a και τέλος,
4. Μετά από περίπου 11 λεπτά, στρατολόγηση της Rab15.

3.2.8 Σε ορισμένα WPBs, οι Rab27a και Rab37 φαίνεται να στρατολογούνται σε διαφορετικές υποπεριοχές

Κατά την επεξεργασία της μικροσκοπίας σε πραγματικό χρόνο της υποενότητας 3.2.7, δηλαδή του video που μελετήθηκε ο χρόνος στρατολόγησης της Rab37 σε σχέση με την Rab27a, παρατηρήθηκε πως ενώ σε κάποια WPBs ο συνεντοπισμός μεταξύ των 2 αυτών Rabs είναι απόλυτος, υπάρχουν κυστίδια στα οποία οι δύο Rabs κατανέμονται σε διαφορετικές υποπεριοχές της μεμβράνης (Εικόνα 3.14). Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η πολωμένη κατανομή δεν παρατηρήθηκε σε κανένα άλλο ζεύγος των Rabs που μελετήθηκαν.



Εικόνα 3.14. Στρατολόγηση των Rab27a (κόκκινο) και Rab37 (πράσινο) σε διαφορετικές υποπεριοχές των WPBs. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με GFP-Rab37 και TagRFP-T-Rab27a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml, για 2 ώρες), έπειτα πύθηκαν με θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδρασή του φαρμάκου. Από τις 4 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και μετά, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο στους 21^oC. Παρατηρείστε ότι σε κάποια WPBs (υποδεικνύονται με βέλη) οι Rabs στρατολογούνται σε διαφορετικές υποπεριοχές της μεμβράνης. Οι συνθήκες του video ήταν: zoom 6,9, οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 22,8 δευτερόλεπτα, συνολική διάρκεια video 50 λεπτά. Αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων: 9.

Παρόμοια πολωμένη κατανομή των Rab πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί για τις Rab4, Rab5 και Rab11 στο πρώιμα ενδοσώματα, στο μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης. Αυτές οι 3 Rabs στρατολογούνται σε διαφορετικές υποπεριοχές των πρώιμων ενδοσωμάτων, ρυθμίζοντας έτσι την κυστιδιακή μετακίνηση του φορτίου από ή/και προς διαφορετικούς προορισμούς (82). Έτσι, η Rab4 και η Rab11 ελέγχουν την ανακύκλωση προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε απευθείας (Rab4) είτε μέσω του ανακυκλωτικού ενδοσώματος (Rab11), ενώ η Rab5 είναι υπεύθυνη για την παραλαβή φορτίου από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό, τα ενδοσώματα επιτυγχάνουν την εξειδικευμένη διαλογή και στόχευση των φορτίων στον προορισμό τους. Είναι συνεπώς πιθανό η πόλωση των Rab27a και Rab37 να εξυπηρετεί εξειδικευμένη κυστιδιακή διακίνηση μεταξύ των WPBs και άλλων οργανιδίων. Το ενδεχόμενο αυτό θα διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες του εργαστηρίου.

3.3 Μελέτη της δυναμικής των WPB-Rabs (σύγκριση του ρυθμού ανακύκλωσής τους)

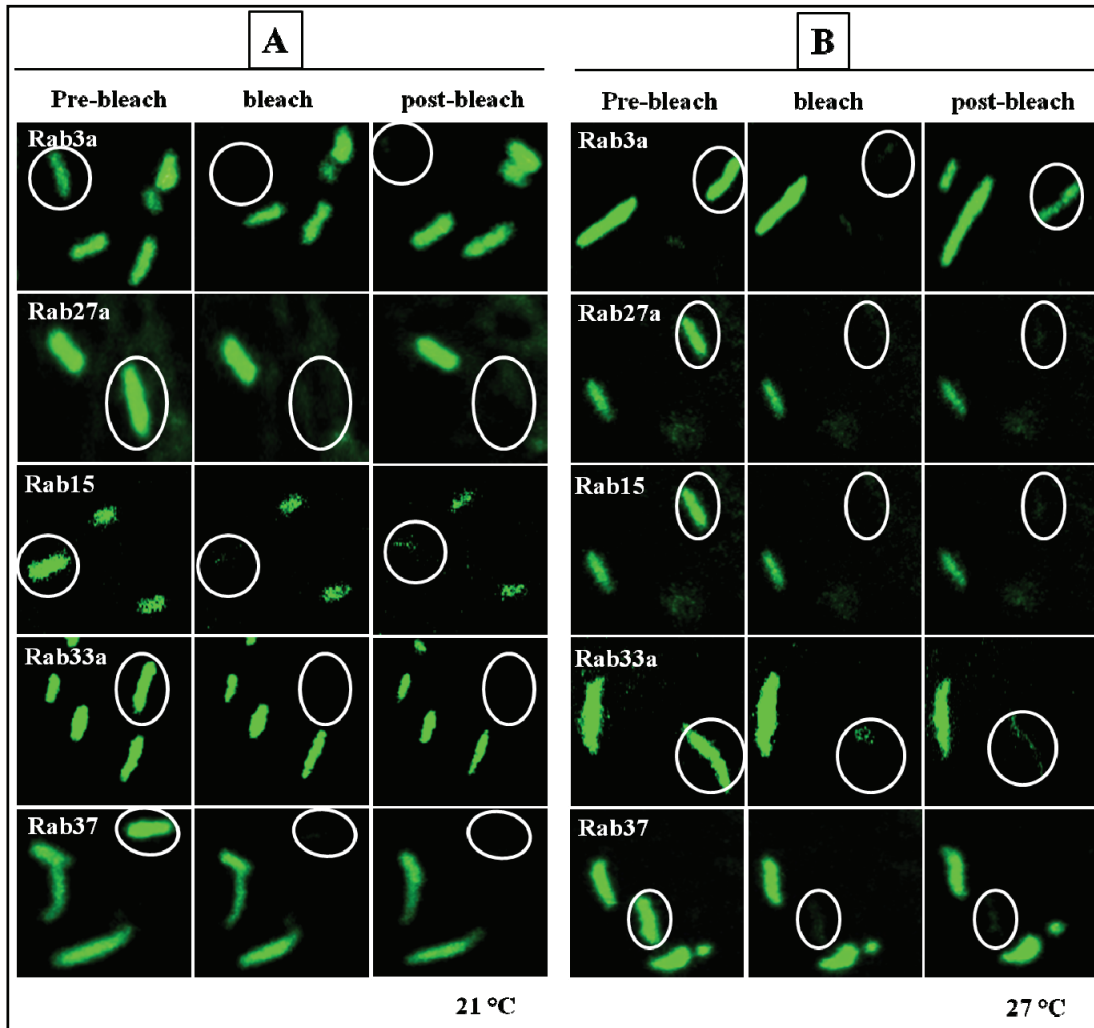
Οι Rabs ακολουθούν συνεχόμενους κύκλους όπου στρατολογούνται στη μεμβράνη των κυστιδίων/οργανιδίων, αποδεσμεύονται στο κυτταρόπλασμα και επαναστρατολογούνται στην μεμβράνη. Οι κύκλοι αυτοί αποτελούν ρυθμιστικό μηχανισμό ελέγχου της δράσης των Rabs, αφού, ο χρόνος παραμονής τους στην μεμβράνη καθορίζει την διάρκεια που παραμένουν στην ενεργή τους μορφή. Επιπλέον, η μελέτη του ρυθμού ανακύκλωσής των Rabs δίνει πληροφορίες σχετικά με τη διαφορετική κινητική στρατολόγησης και υδρόλυσης του GTP της κάθε Rab στην μεμβράνη, και γενικότερα της διαφορετικής δυναμικής της κάθε πρωτεΐνης. Έτσι, σημαντικό στοιχείο στην κατανόηση δράσης των WPB-Rabs αποτελεί η γνώση του ρυθμού με τον οποίο ανακυκλώνονται μεταξύ της μεμβράνης των WPBs και του κυτταροπλάσματος.

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρυθμό ανακύκλωσης των Rab πρωτεϊνών των WPBs, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (Fluorescence Recovery After Photo bleaching, FRAP), σε ζωντανά κύτταρα. Η συγκεκριμένη μέθοδος αναπτύχθηκε το 1970 ως μια τεχνική για τη μελέτη της κινητικότητας πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα με μέτρηση του ρυθμού ανάκτησης φθορισμού, αφού προηγουμένως είχε επέλθει φωτολεύκανση σε μια περιοχή ενδιαφέροντος. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η κινητική δέσμευσης και

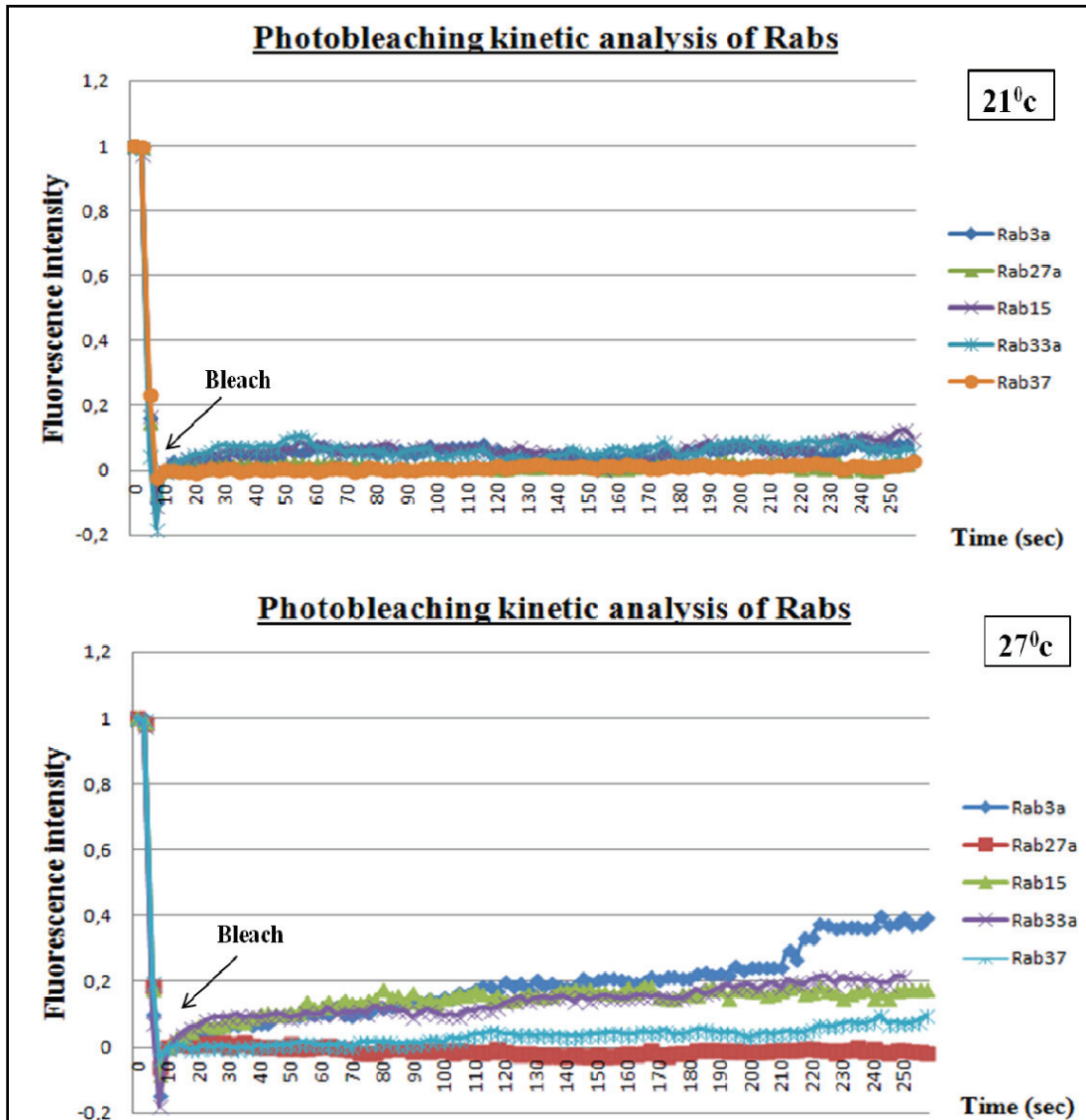
αποδέσμευσης των GFP-συζευγμένων Rab3a, Rab15, Rab27a, Rab33a και Rab37. Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος εκτέλεσης πειραμάτων FRAP σε συνεστιακή μικροσκοπία. Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών αντιμετωπίσαμε τα παρακάτω τεχνικά ζητήματα:

- Στους 37⁰C, λόγω μεγάλης κινητικότητας των WPBs, η φωτολεύκανση των WPBs δεν ήταν εφικτή λόγω της γρήγορης κίνησής τους. Για το σκοπό αυτό, αποφασίσαμε τα πειράματα να πραγματοποιηθούν σε θερμοκρασίες μικρότερες των 37⁰C, όπως 21⁰C ή 27⁰C.
- Αρχικά, πέρα από την υπερέκφραση της εκάστοτε GFP-Rab που μελετούσαμε με FRAP, υπερεκφράσαμε την mcherry-Rab27a ως δείκτη των WPBs. Ωστόσο, επειδή οι συνθήκες για να πραγματοποιηθεί η FRAP απαιτούν πολύ υψηλό zoom, επέρχονταν φωτολεύκανση του κόκκινου χρώματος (mcherry-Rab27a) σε λίγα δευτερόλεπτα. Έτσι, επιλέξαμε τελικώς να υπερεκφράζουμε μόνο μία Rab κάθε φορά, συζευγμένη με GFP.

Έχοντας λοιπόν επιλέξει τις πειραματικές συνθήκες που είναι εφικτές στο δικό μας πειραματικό μοντέλο, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με κάθε μία εκ των Rab3a, Rab15, Rab27a, Rab33a ή Rab37, συζευγμένες με GFP, και μετά από παρέλευση 48 ωρών ακολουθήθηκε FRAP ανάλυση στους 21⁰C ή 27⁰C (βλέπε Εικόνα 3.15 A, B, αντίστοιχα, και Εικόνα 3.16). Στην Εικόνα 3.15, τα WPB που επισημάνονται με το λευκό ωοειδές πλαίσιο (βλέπε εικόνες στην αριστερή στήλη του Σχήματος 3.15 A και B) υπέστησαν φωτολεύκανση (μεσαίες εικόνες A, B). Οι δεξιά εικόνες (A, B) παρουσιάζουν το βαθμό ανάκτησης του φθορισμού μετά την φωτολεύκανση.



Εικόνα 3.15. Ανάλυση, με FRAP, του ρυθμού ανακύκλωσης μεταξύ μεμβράνης και κυτταροπλάσματος για τις GFP-Rab3a, Rab15, Rab27a, Rab33a και Rab37. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης των GFP-Rab3a, Rab15, Rab27a, Rab33a και Rab37. Μετά από παρέλευση 48 ωρών ακολουθήθηκε ανάλυση με FRAP, στους 21⁰C (A) και 27⁰C (B). Τα WPB που έχουν επισημανθεί με ωοειδές σχήμα (εικόνες αριστερά) υπέστησαν φωτολεύκανση (μεσαίες εικόνες), ενώ οι εικόνες δεξιά δείχνουν το βαθμό ανάκτησης του φθορισμού μετά την φωτολεύκανση. Παρατηρείστε πως η Rab3a εμφανίζει το μεγαλύτερο βαθμό ανάκτησης σήματος, στους 27⁰C, και ότι στους 21⁰C δεν εμφανίζεται καμία Rab να ανακτάται σημαντικά. Συνθήκες video: zoom 20, οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν κάθε 2,5 δευτερόλεπτα, συνολική διάρκεια video 5 λεπτά, αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων 30 σε κάθε συνθήκη και για καθεμιά Rab.



Εικόνα 3.16. Διαγραμματική απεικόνιση του κλάσματος ανάκτησης φθορισμού για κάθε μία Rab των WPBs. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης των GFP-Rab3a, Rab15, Rab27a, Rab33a και Rab37. Μετά από παρέλευση 48 ωρών ακολουθήθηκε ανάλυση με FRAP, στους 21⁰C (πάνω) και 27⁰C (κάτω) και ποσοτικοποιήθηκε η ένταση ανάκτησης φθορισμού για κάθε μία Rab σε σχέση με το χρόνο. Αυτό που παρατηρείται είναι πως καμία Rab δεν ανακτάται σημαντικά στους 21⁰C, σε αντίθεση με τους 27⁰C όπου η κινητική της ανακύκλωσης μεταξύ κυτταροπλάσματος και της μεμβράνης των 5 WPB-Rabs είναι: Rab3a > Rab15 ≈ Rab33a > Rab37 ≈ Rab27a.

Μελετώντας την Εικόνα 3.16 παρατηρούμε πως στους 27⁰C, ο ρυθμός ανακύκλωσης της Rab3a είναι μεγαλύτερος από τις υπόλοιπες Rabs (ανακτάται περίπου η μισή ποσότητα της από την αρχική ένταση φθορισμού), για τις Rab15 και Rab33 βρέθηκε να είναι πολύ μικρός (περίπου στο 1/5 της αρχικής έντασης φθορισμού) ενώ για τις Rab27a και Rab37 βρέθηκε να είναι σχεδόν μηδενικός. Στους 21⁰C, όλες η Rabs είχαν μηδενική ανάκτηση.

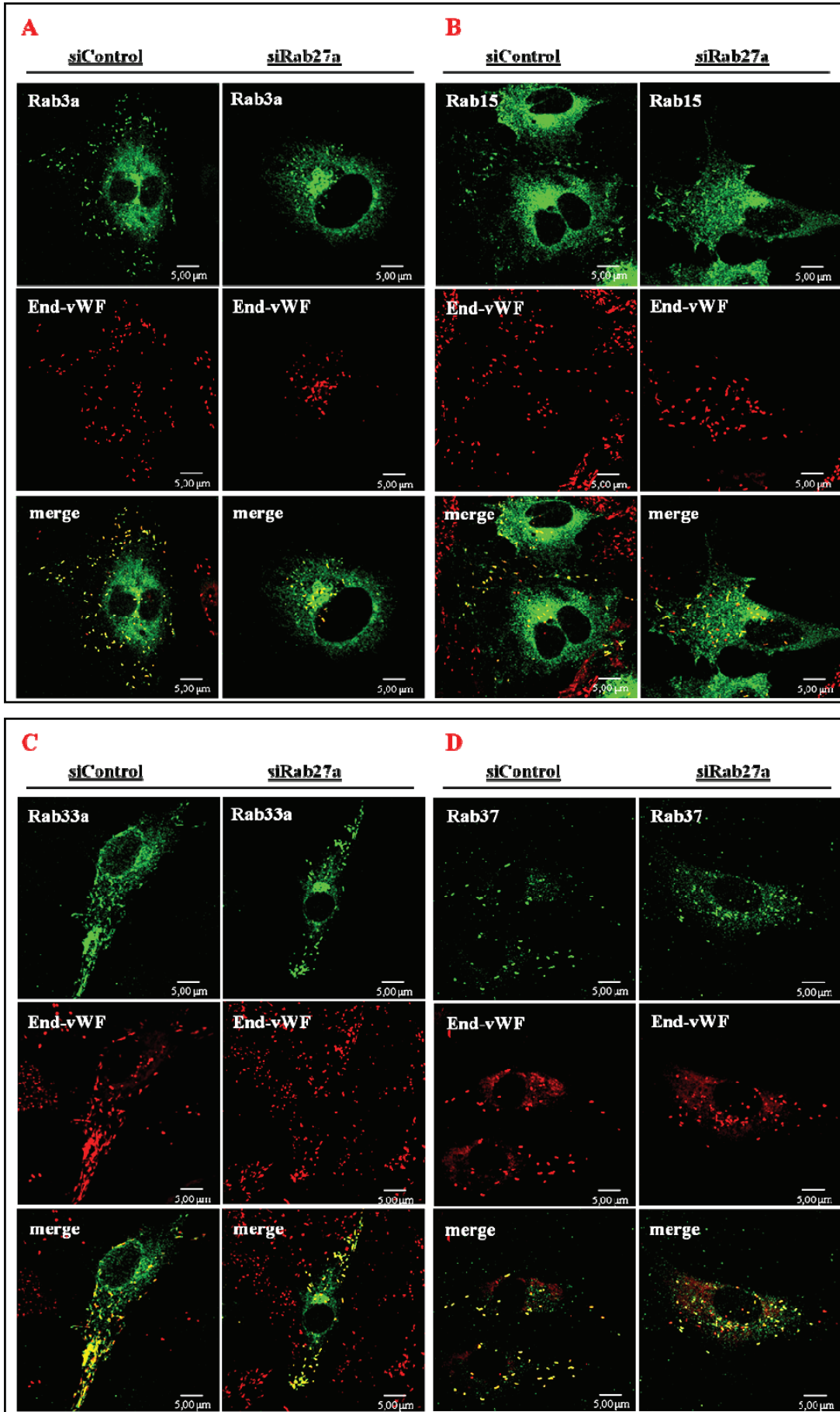
Σύμφωνα με τα παραπάνω, η σχετική κινητική της ανακύκλωσης μεταξύ κυτταροπλάσματος και της μεμβράνης, για τις 5 WPB-Rabs, στους 27⁰C είναι: Rab3a>Rab15≅Rab33>Rab37≅Rab27a. Η σειρά αυτή είναι ενδεικτική της σχετικής ταχύτητας υδρόλυσης και ανταλλαγής GTP και της σταθερότητας των συμπλόκων που σχηματίζονται από τις Rabs στη μεμβράνη (βλέπε συζήτηση).

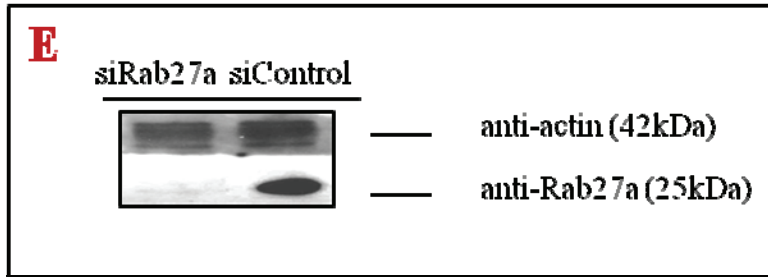
3.4 Διερεύνηση του ρόλου της Rab27a στην στρατολόγηση των άλλων Rabs στα WPBs

Από προηγούμενες μελέτες στρατολόγησης των Rabs στα ενδοσώματα έχει αποδειχθεί ότι, κατά την διαδοχική στρατολόγηση των Rabs, μία Rab μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση της επόμενης (85). Τα προηγούμενα πειράματά μας έδειξαν πως πρώτες στη σειρά στρατολόγησης στα WPBs είναι οι Rab27a μαζί με την Rab37 και την Rab33a. Η Rab27a αποτελεί την πρώτη Rab που βρέθηκε να εντοπίζεται στη μεμβράνη των WPBs (116), είναι η πιο σημαντική στην εξωκυττάρωση (90) και απαντάται σε όλα τα ώριμα WPBs (119). Λόγω του ιδιαίτερου ρόλου που παίζει η Rab27a στα WPBs, μελετήσαμε τη σημασία της στη στρατολόγηση των άλλων τεσσάρων Rabs, τόσο στα ώριμα WPBs (Παράγραφος 3.4.1) όσο και στα νεοσυντιθέμενα (Παράγραφος 3.4.2).

3.4.1 Η Rab27a δεν επηρεάζει τη στρατολόγηση των άλλων Rabs στα ώριμα WPBs

Αρχικά ελέγξαμε εάν η αποσιώπηση της Rab27a επηρεάζει τη στρατολόγηση των υπολοίπων Rabs στα ώριμα WPBs. Έτσι, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNAs έναντι της Rab27a και μετά από 24 ώρες πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση κάθε μιας εκ των άλλων τεσσάρων Rabs (Rab3a, Rab15, Rab33a, Rab37, βλέπε Εικόνα 3.17, A, B, C, D, αντίστοιχα), και μετά από 48 ώρες ελέγχθηκε, με συνεστιακή μικροσκοπία, η στρατολόγηση των παραπάνω Rabs.





Εικόνα 3.17. Η αποσιώπηση της Rab27a δεν εμποδίζει τη στρατολόγηση των υπόλοιπων Rabs στα ώριμα WPBs. (A, B, C, D) Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης των GFP-Rab3a (A), GFP-Rab15 (B), GFP-Rab33a (C), και GFP-Rab37 (D). Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (κόκκινο), και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP (πράσινο), και αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. (E) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης της Rab27a με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

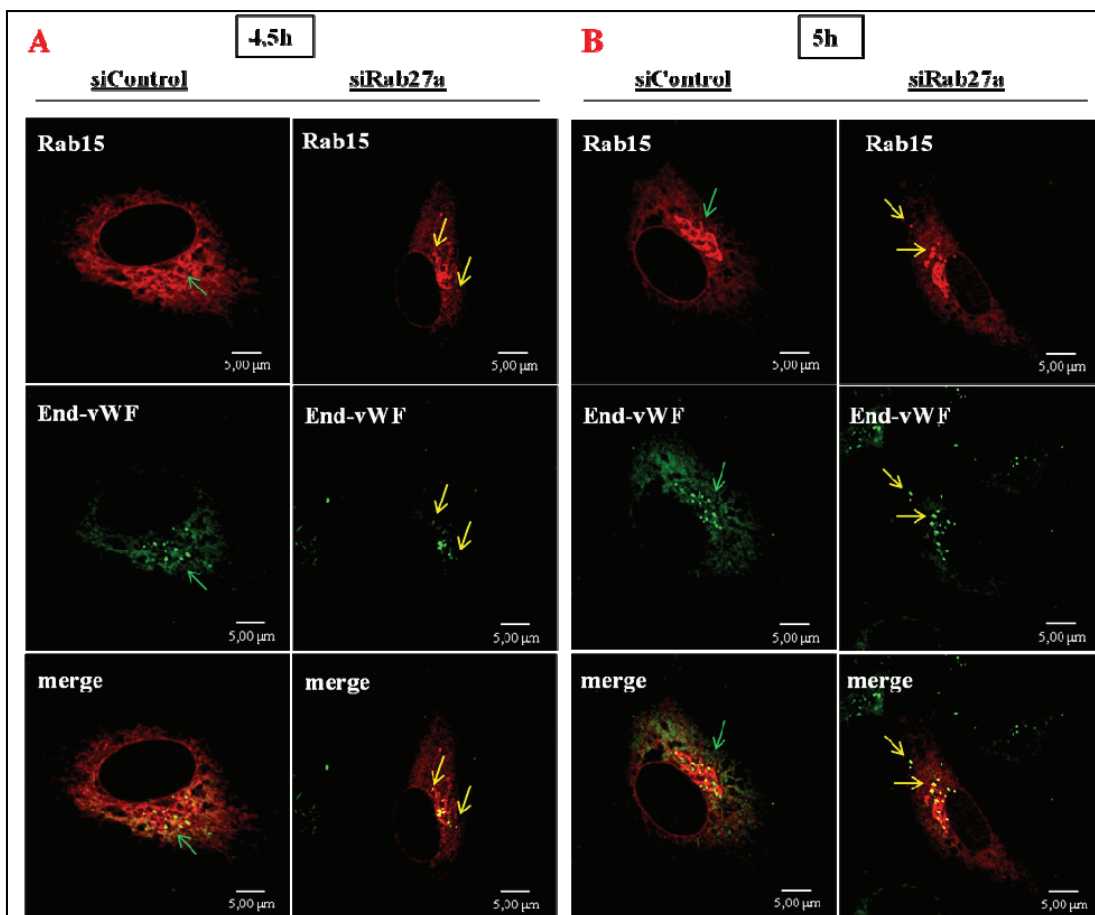
Η ανάλυση αυτή κατέδειξε ότι η αποσιώπηση της Rab27a δεν επηρεάζει τη στρατολόγηση των υπολοίπων Rabs στα ώριμα WPBs, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις οι Rabs (πράσινο) συνεντοπίζονται (κίτρινο) με τον ενδογενή vWF (κόκκινο).

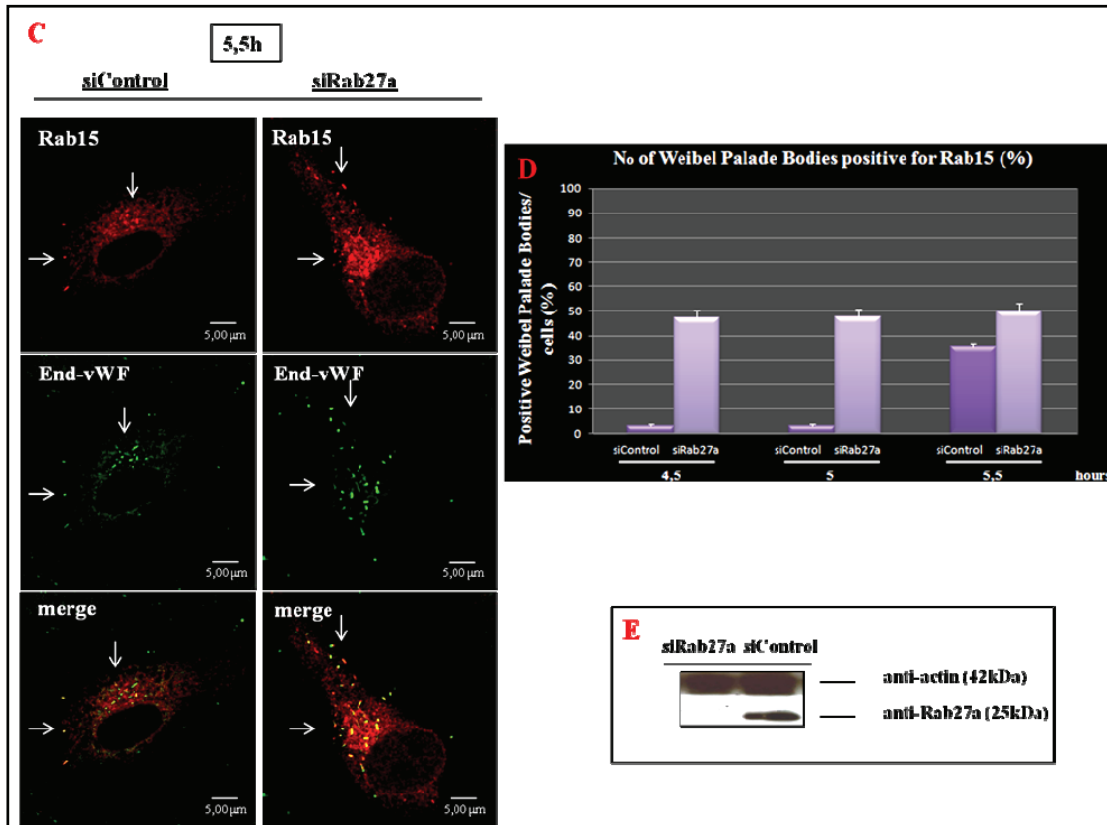
3.4.2 Στα νεοσυντιθέμενα WPBs, η Rab27a καθυστερεί τη στρατολόγηση των Rab3a, Rab15, Rab37, ενώ επιταχύνει την στρατολόγηση της Rab33a

Στη συνέχεια ελέγξαμε την πιθανή εμπλοκή της Rab27a στην στρατολόγηση των άλλων Rabs στα νεοσυντιθέμενα WPBs. Έτσι, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNAs έναντι της Rab27a και μετά από 24 ώρες πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση κάθε μιας εκ των άλλων τεσσάρων Rabs (Rab15, Rab3a, Rab33a, Rab37, βλέπε Εικόνες 3.18, 3.20, 3.21 και 3.22, αντίστοιχα). Μετά την παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA, προς εξωκυττάρωση των προϋπαρχόντων WPBs. Όταν τα κύτταρα ανέκαμψαν από την επίδραση της PMA μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.18, η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί πρόωρη στρατολόγηση της Rab15 στη μεμβράνη των WPBs. Πιο συγκεκριμένα, στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a, στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όπου πραγματοποιείται η σύνθεση του vWF (πράσινο), υπάρχουν μερικά WPBs που

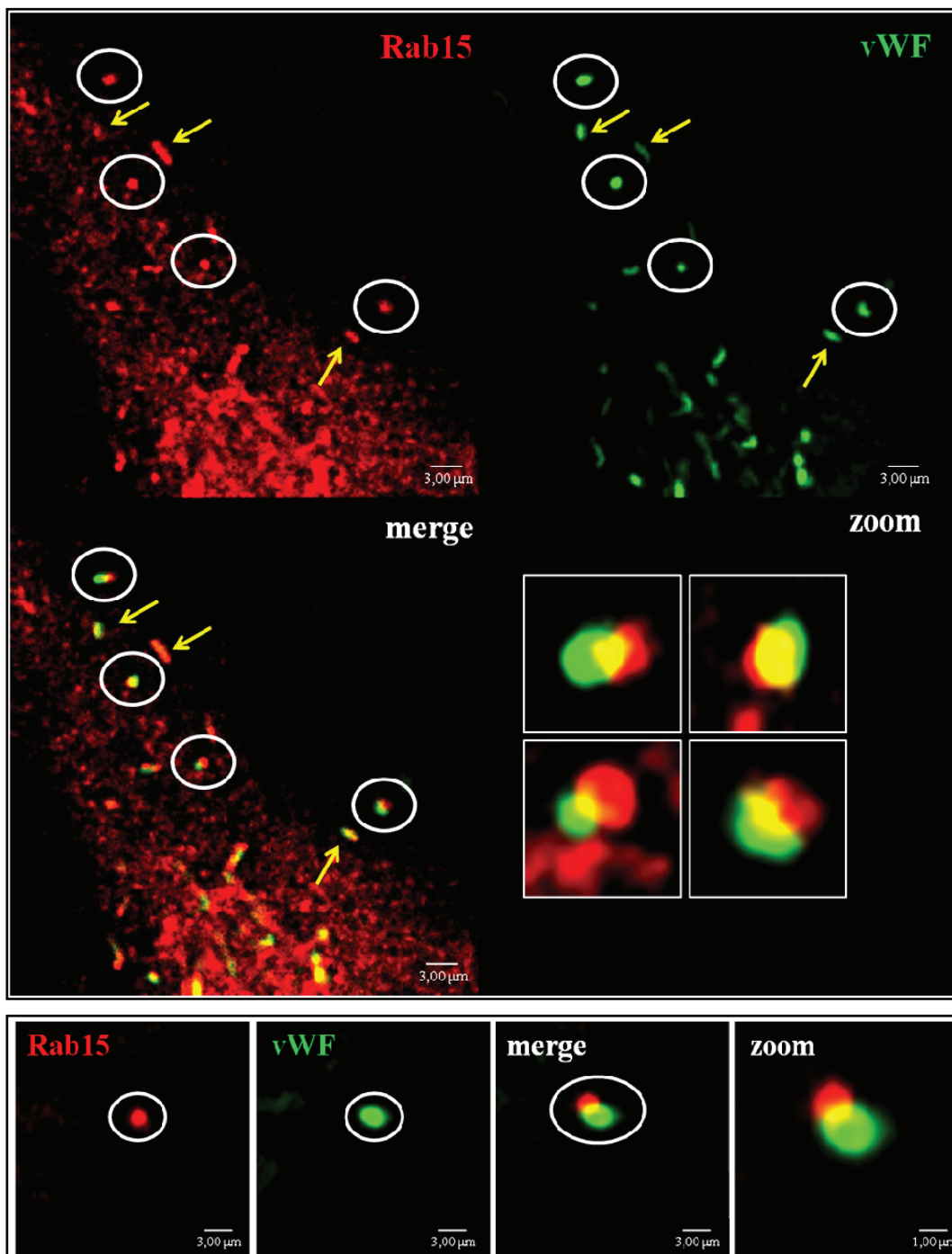
στρατολογούν την Rab15 (κόκκινο), όπως υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη και από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες στις ίδιες ώρες όπου η έκφραση της Rab15 είναι ακόμη διάχυτη (πράσινα βέλη). Μετά από ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab15, όταν αποσιωπείται η Rab27a, στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης, διαπιστώθηκε πως περίπου το 50% των WPBs στρατολογεί τη Rab15, εν αντιθέσει με τα κύτταρα μάρτυρες όπου η Rab15 δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη.





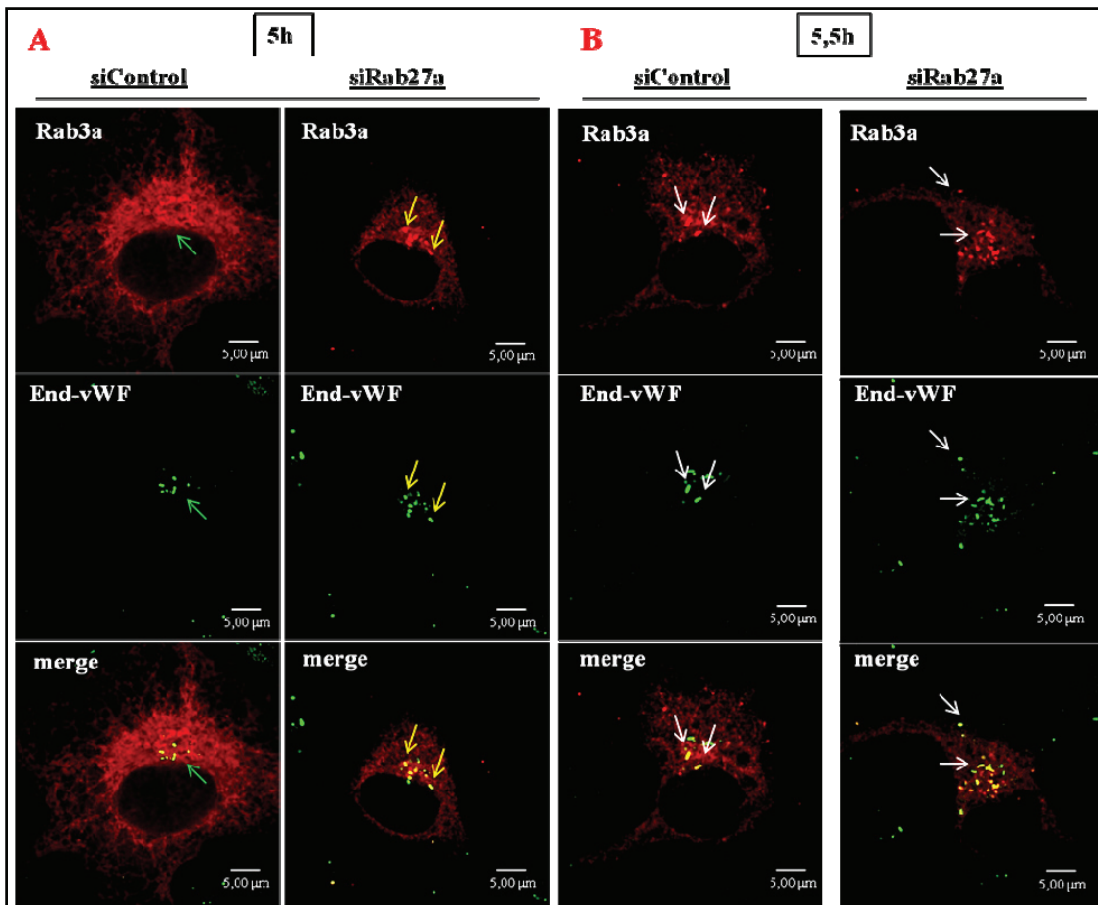
Εικόνα 3.18. Η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί πρόωρη στρατολόγηση της Rab15 (κόκκινο) στη μεμβράνη των WPBs (πράσινο). (A, B, C) Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της mcherry-Rab15. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και επωάστηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Ύστερα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (πράσινο), και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του mcherry (κόκκινο). Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείστε ότι στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όπου πραγματοποιείται η δημιουργία των νέων WPBs (vWF, πράσινο), υπάρχουν κάποια WPBs που στρατολογούν την Rab15 (κόκκινο) στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a, υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες όπου η έκφραση της Rab15 είναι ακόμη διάχυτη (πράσινα βέλη). Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a αλλά και στα κύτταρα μάρτυρες, η Rab15 (κόκκινο) έχει στρατολογηθεί στα WPBs (πράσινο) (υποδεικνύεται από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο, λευκά βέλη). (D) Ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab15 στα κύτταρα μάρτυρες αλλά και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a. Στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όταν αποσιωπείται η Rab27a περίπου το 50% των WPBs στρατολογεί τη Rab15, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπου η Rab15 δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη. Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων η Rab15 έχει στρατολογηθεί στη μεμβράνη των WPBs και στις δύο περιπτώσεις. (Αριθμός κυττάρων: 15 σε κάθε συνθήκη) (E) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης της Rab27a με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

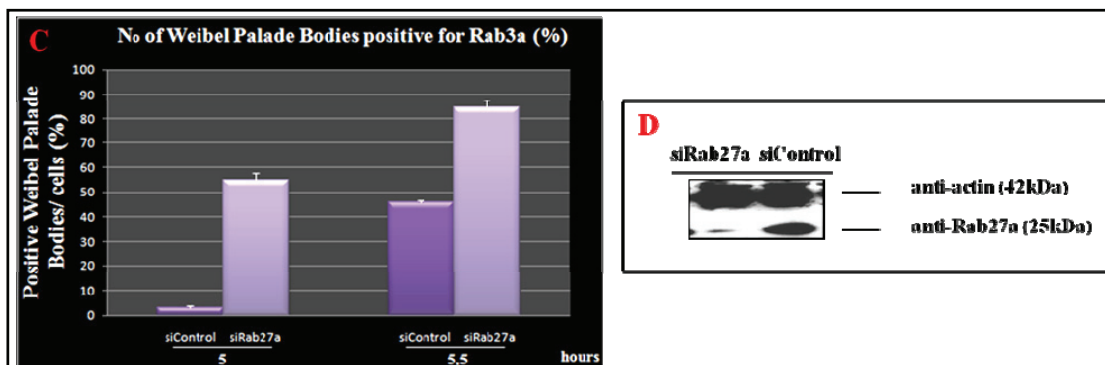
Αξίζει να σημειωθεί μια παρατήρηση που κάναμε κατά την επεξεργασία των εικόνων μικροσκοπίας της παραπάνω υποενότητας (συγκεκριμένα: Εικόνα 3.18, 5,5h, siRab27a). Στο πείραμα αυτό παρατηρήσαμε πως έπειτα από την αποσιώπηση της Rab27a, ενώ σε κάποια WPBs ο συνεντοπισμός μεταξύ Rab15 και των κυστιδίων είναι απόλυτος (Εικόνα 3.19, κίτρινα βέλη), σε άλλες περιπτώσεις η Rab15 εντοπίζεται σε δομές (κυστίδια) τα οποία βρίσκονται σε επαφή με τα WPBs (Εικόνα 3.19, ωσειδή σχήματα). Πιο συγκεκριμένα, στις μεγεθυμένες εικόνες παρατηρείται η αλληλεπίδραση (κίτρινο) των Rab15-θετικών κυστιδίων (κόκκινο) με τα WPBs (πράσινο). Είναι πιθανόν αυτά τα Rab15-θετικά κυστίδια να είναι ενδοσωματικής προέλευσης, καθώς είναι γνωστό ότι η Rab15 εντοπίζεται στα ενδοσώματα (108). Η παρατήρηση αυτή είναι ενδιαφέρουσα καθώς μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ Rab15-θετικών κυστιδίων ενδοσωματικής προέλευσης με τα WPBs θα μπορούσε να ερμηνεύσει προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν την μεταφορά πρωτεϊνικού φορτίου από τα όψιμα ενδοσώματα στα WPBs, τη σύνδεση δηλαδή μεταξύ ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης (120), μια υπόθεση που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



Εικόνα 3.19. Αλληλεπίδραση Rab15-θετικών κυστιδίων με τα WPBs. Κύτταρα HUVE, που καλλιιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της mcherry-Rab15. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και επωάστηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Ύστερα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (η εικόνα αναφέρεται στο χρονικό διάστημα 5,5 ώρες από την αφαίρεση του PMA) και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (πράσινο), και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του mcherry (κόκκινο). Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Με τα κίτρινα βέλη απεικονίζονται τα WPBs που συνεντοπίζονται πλήρως με την Rab15. Τα ωσειδή σχήματα και οι μεγεθυμένες εικόνες αναφέρονται στην αλληλεπίδραση (κίτρινο) των Rab15-θετικών κυστιδίων (κόκκινο) με τα WPBs (πράσινο).

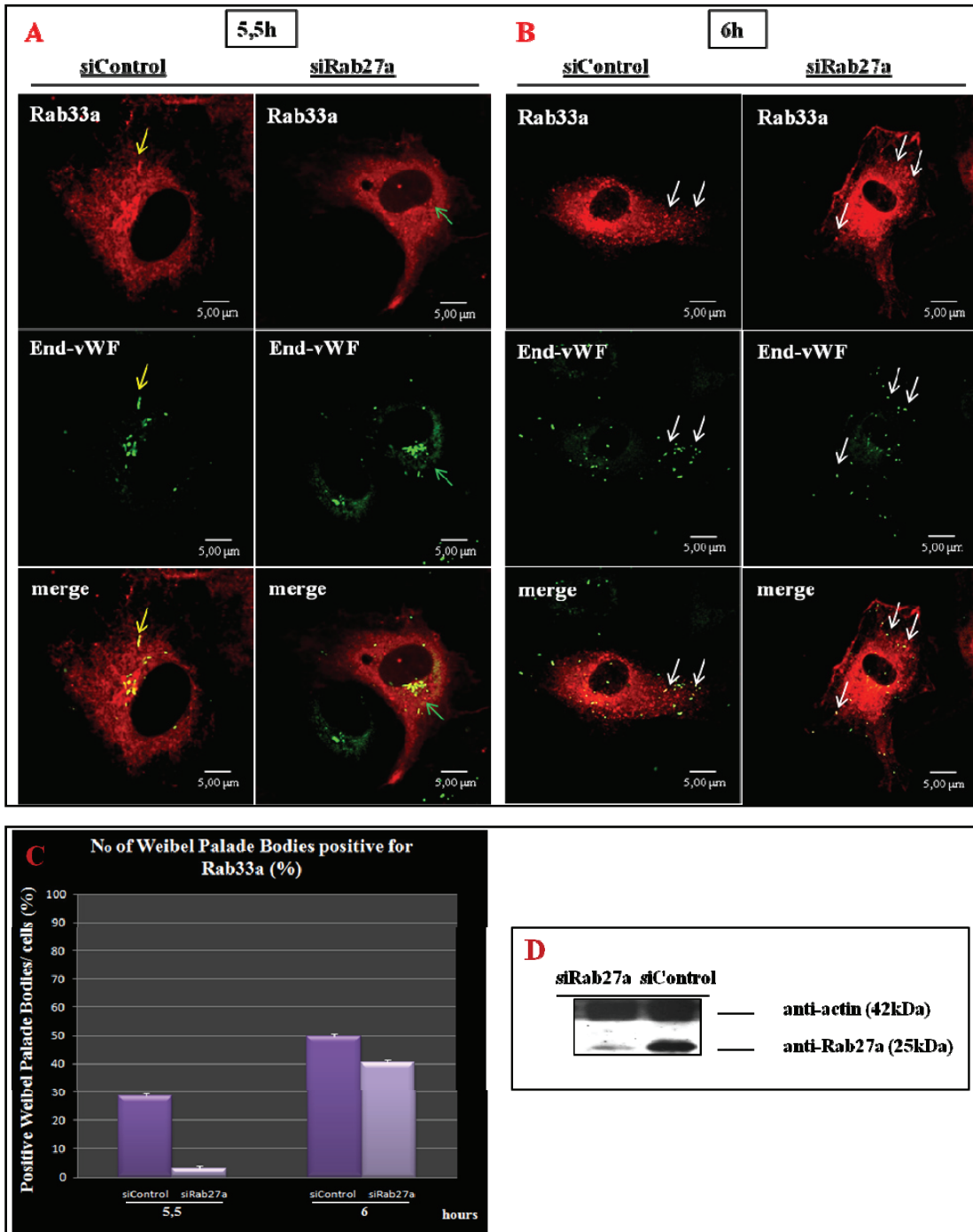
Συνεχίζοντας, μελετήσαμε τη σημασία της Rab27a στην στρατολόγηση της Rab3a. Μετά από την αποσιώπηση της Rab27a, στις 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων όπου πραγματοποιείται η σύνθεση του vWF (πράσινο), υπάρχουν μερικά WPBs που στρατολογούν την Rab3a (κόκκινο) (υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη και από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο), σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες όπου η έκφραση της Rab3a είναι ακόμη διάχυτη (Εικόνα 3.20, πράσινα βέλη). Από την ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab3a, όταν αποσιωπείται η Rab27a, στις 5 ώρες ανάκαμψης, προέκυψε πως περισσότερο από το 50% των WPBs στρατολογεί τη Rab3a, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπου η Rab3a δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη. Συνεπώς, η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί πρόωρη στρατολόγηση και της Rab3a στη μεμβράνη των WPBs.





Εικόνα 3.20. Η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί πρόωρη στρατολόγηση της Rab3a (κόκκινο) στη μεμβράνη των WPBs (πράσινο). (A, B) Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτιδία έναντι της Rab27a (50 nM). Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της mcherry-Rab3a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και επωάστηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Ύστερα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (πράσινο), και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του mcherry (κόκκινο). Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείστε ότι στις 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όπου πραγματοποιείται η δημιουργία των νέων WPBs (vWF, πράσινο), υπάρχουν κάποια WPBs που στρατολογούν την Rab3a (κόκκινο) στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a, υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες όπου η έκφραση της Rab3a είναι ακόμη διάχυτη (πράσινα βέλη). Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a αλλά και στα κύτταρα μάρτυρες, η Rab3a (κόκκινο) έχει στρατολογηθεί στα WPBs (πράσινο) (υποδεικνύεται από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο, λευκά βέλη). (C) Ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab3a στα κύτταρα μάρτυρες αλλά και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a. Στις 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όταν αποσιωπείται η Rab27a περίπου το 50% των WPBs στρατολογεί τη Rab3a, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπου η Rab3a δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη. Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων η Rab3a έχει στρατολογηθεί στη μεμβράνη των WPBs και στις δύο περιπτώσεις. (Αριθμός κυττάρων: 15 σε κάθε συνθήκη) (D) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτιδία έναντι της Rab27a (50 nM). Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης της Rab27a με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

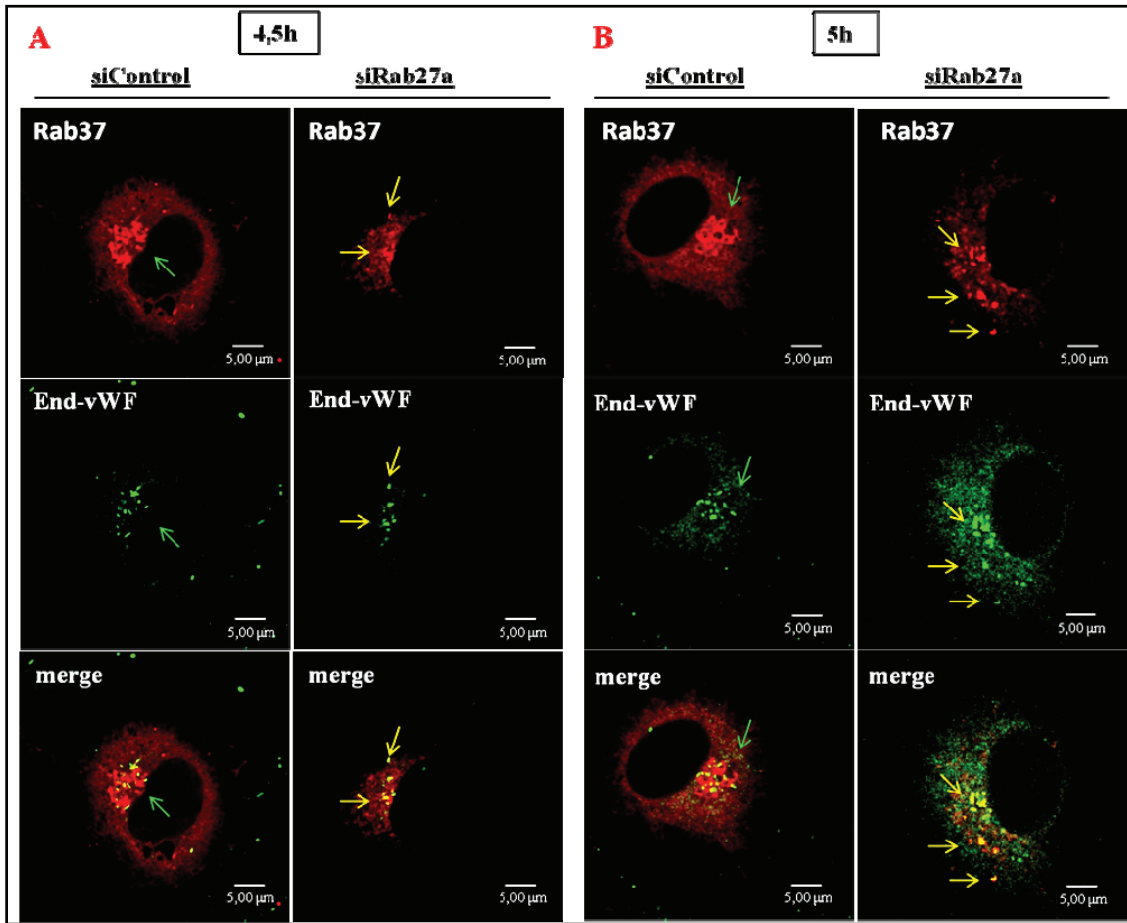
Αντίθετα με τα παραπάνω ευρήματα, η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί καθυστερημένη στρατολόγηση της Rab33a στη μεμβράνη των WPBs. Πιο συγκεκριμένα, στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, στα κύτταρα μάρτυρες έχει στρατολογηθεί η Rab33a (κόκκινο, υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη) στη μεμβράνη των WPBs (πράσινο), σε αντίθεση με τα κύτταρα όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a όπου η έκφραση της Rab33a είναι ακόμη διάχυτη (Εικόνα 3.21, πράσινα βέλη). Ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab33a στα κύτταρα μάρτυρες, στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, μας δείχνει πως περίπου στο 30% των WPBs έχει στρατολογηθεί η Rab33a, σε αντίθεση με τα κύτταρα που αποσιωπείται η Rab27a, όπου η Rab33a δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη.

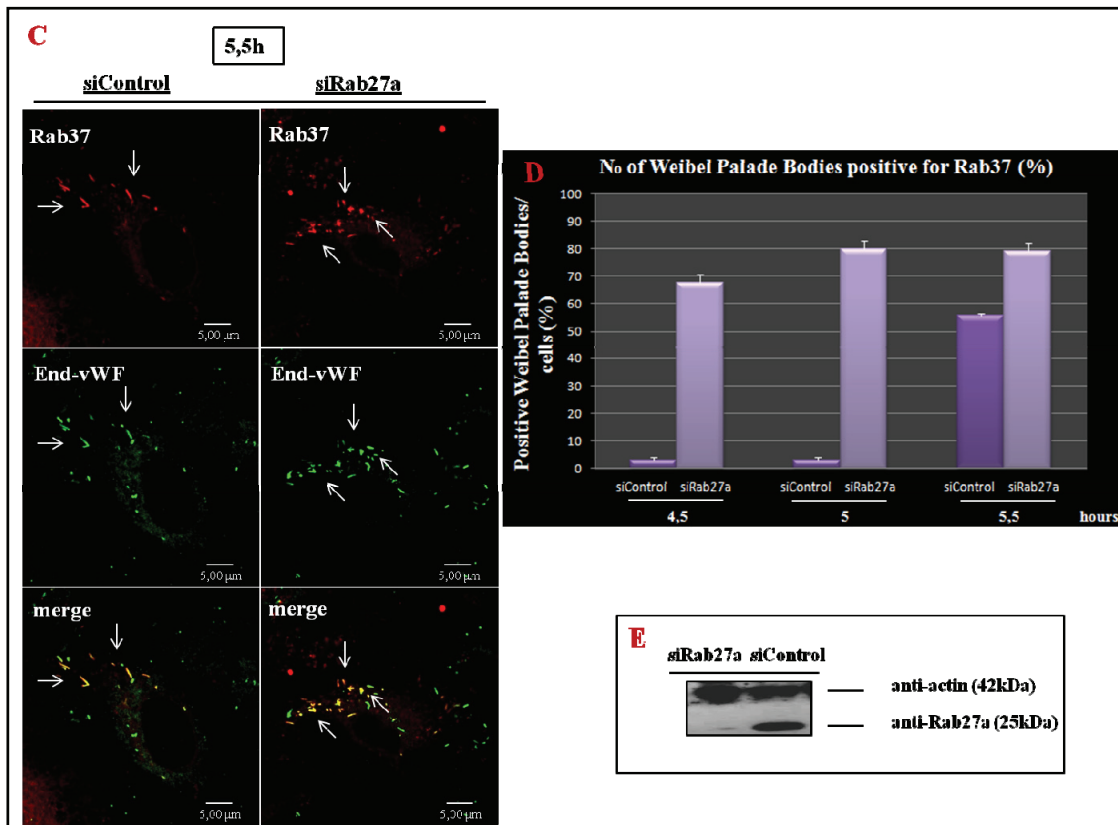


Εικόνα 3.21. Η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί καθυστερημένη στρατολόγηση της Rab33a (κόκκινο) στη μεμβράνη των WPBs (πράσινο). (A, B) Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της mcherry-Rab33a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και επωάστηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Ύστερα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (πράσινο), και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του mcherry (κόκκινο). Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνθεσιακή μικροσκοπία. Παρατηρείστε ότι στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, στα κύτταρα μάρτυρες έχει στρατολογηθεί η Rab33a (κόκκινο-υποδεικνύεται από τα

κίτρινα βέλη) στη μεμβράνη των WPBs (πράσινο), εν αντίθεση με τα κύτταρα όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a όπου η έκφραση της Rab33a είναι ακόμη διάχυτη (πράσινα βέλη). Στις 6 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a αλλά και στα κύτταρα μάρτυρες, η Rab33a (κόκκινο) έχει στρατολογηθεί στα WPBs (πράσινο) (υποδεικνύεται από των μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο, λευκά βέλη). (C) Ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab33a στα κύτταρα μάρτυρες αλλά και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a. Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, στα κύτταρα μάρτυρες, περίπου το 30% των WPBs στρατολογεί τη Rab33a, σε αντίθεση με τα κύτταρα που αποσιωπείται η Rab27a, όπου η Rab33a δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη. Στις 6 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων η Rab33a έχει στρατολογηθεί στη μεμβράνη των WPBs και στις δύο περιπτώσεις. (No κυττάρων: 15 σε κάθε συνθήκη). (D) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης της Rab27a με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

Τέλος, η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί επίσης πρόωρη στρατολόγηση της Rab37 στη μεμβράνη των WPBs (Εικόνα 3.22). Πιο συγκεκριμένα, στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων όπου πραγματοποιείται η σύνθεση του vWF (πράσινο), υπάρχουν κάποια WPBs που στρατολογούν την Rab37 (κόκκινο), στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a, (υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη και από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο), σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες στις ίδιες ώρες, όπου η έκφραση της Rab37 είναι ακόμη διάχυτη (Εικόνα 3.22, πράσινα βέλη). Ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab37, όταν αποσιωπείται η Rab27a, στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης, μας δείχνει πως περίπου το 70-80% των WPBs στρατολογεί τη Rab37, εν αντιθέσει με τα κύτταρα μάρτυρες, όπου η Rab37 δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη.





Εικόνα 3.22. Η αποσιώπηση της Rab27a προκαλεί πρόωρη στρατολόγηση της Rab37 (κόκκινο) στη μεμβράνη των WPBs (πράσινο). (A, B, C) Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γνάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της mcherry-Rab37. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA (100 ng/ml για 2 ώρες), έπειτα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και επώαστηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να ανακάμψουν από την επίδραση του φαρμάκου. Ύστερα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF (πράσινο), και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του mcherry (κόκκινο). Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρείστε ότι στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όπου πραγματοποιείται η δημιουργία των νέων WPBs (vWF, πράσινο), υπάρχουν κάποια WPBs που στρατολογούν την Rab37 (κόκκινο) στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a, υποδεικνύεται από τα κίτρινα βέλη, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες όπου η έκφραση της Rab37 είναι ακόμη διάχυτη (πράσινα βέλη). Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a αλλά και στα κύτταρα μάρτυρες, η Rab37 (κόκκινο) έχει στρατολογηθεί στα WPBs (πράσινο) (υποδεικνύεται από τον μεταξύ τους συνεντοπισμό-κίτρινο, λευκά βέλη). (D) Ποσοτικοποίηση των WPBs που στρατολογούν την Rab37 στα κύτταρα μάρτυρες αλλά και στις συνθήκες όπου έχει αποσιωπηθεί η Rab27a. Στις 4,5 και 5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων, όταν αποσιωπείται η Rab27a περίπου το 70-80% των WPBs στρατολογεί τη Rab37, σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπου η Rab37 δεν έχει στρατολογηθεί ακόμη. Στις 5,5 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων η Rab37 έχει στρατολογηθεί στη μεμβράνη των WPBs και στις δύο περιπτώσεις. (Αριθμός κυττάρων: 15 σε κάθε συνθήκη) (E) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (50 nM). Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης της Rab27a με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η Rab27a φαίνεται να ρυθμίζει τον χρόνο στρατολόγησης των Rab3a, Rab15, Rab33a και Rab37 στη μεμβράνη των WPBs, καθώς καθυστερεί την στρατολόγηση των Rab3a, Rab15, Rab37, ενώ επιταχύνει την στρατολόγηση της Rab33a.

Συμπερασματικά, η σειρά των βημάτων στρατολόγησης των Rabs στη μεμβράνη των πρώιμων WPBs, και ο κατά προσέγγιση χρόνος που αυτή συμβαίνει σε σχέση με την δημιουργία τους είναι:

1. Σχηματισμός από το Golgi των νεοσυντιθέμενων WPBs, στα οποία εισέρχονται τα νεοσχηματισμένα μόρια του vWF
2. Οι πρώτες Rabs που εμφανίζονται στα WPBs, σχεδόν ταυτόχρονα, είναι η Rab27a μαζί με την Rab33a, περίπου μία ώρα μετά τη δημιουργία των κυστιδίων,
3. Η Rab37 στρατολογείται σύντομα μετά από αυτές και τέλος
4. Ακολουθεί η διαδοχική στρατολόγηση των Rab3a και Rab15.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας εξετάστηκε ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός όλων των ανθρώπινων Rabs και ταυτοποιήθηκαν οι Rabs που εντοπίζονται εξειδικευμένα στη μεμβράνη των WPBs, τα οποία αποτελούν ειδικά εκκριτικά οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων (90). Η μελέτη αυτή αποκάλυψε πως πέντε Rabs (Rab3a, 15, 27a, 33a και 37) στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs. Η ύπαρξη τόσων μελών της οικογένειας Rab στα WPBs γέννησε το εύλογο ερώτημα σχετικά με το ποια είναι η σημασία τους για τα οργανίδια αυτά.

Μια δοκιμασμένη πειραματική προσέγγιση προκειμένου να λάβει κανείς πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο των διαφορετικών Rabs στα μεμβρανικά οργανίδια είναι να μελετηθεί η σειρά στρατολόγησης των Rabs, καθώς οι πρώιμες Rabs αναμένεται να παίζουν ρόλο στην δημιουργία των οργανιδίων αυτών καθ'αυτών, αλλά και στην παραλαβή κυστιδίων από το προηγούμενο οργανίδιο του μονοπατιού, ενώ οι μετέπειτα στρατολογούμενες Rabs αναμένεται να εμπλέκονται στην επικοινωνία των οργανιδίων με τα μετέπειτα οργανίδια του μονοπατιού. Έτσι, για παράδειγμα, στα ενδοσώματα, η Rab5, που στρατολογείται πρώτη, παίζει ρόλο τόσο στην δημιουργία των ενδοσωμάτων (121) όσο και στην παραλαβή κυστιδίων που προέρχονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη (122), ενώ η Rab7 που στρατολογείται μετά την Rab5 (85) παίζει ρόλο στην ωρίμανση των ενδοσωμάτων (123) και στην σύντηξή τους με τα λυσοσώματα (124). Επίσης, η σειρά στρατολόγησης είναι ενδεικτική για το ρόλο που μπορεί να παίζει η κάθε Rab στην σύνδεση της προηγούμενης και επόμενης Rab με την μεμβράνη. Έτσι, κάθε προηγούμενη Rab είναι δυνητικός θετικός ρυθμιστής της στρατολόγησης της επόμενης (μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα GEF), ενώ είναι πιθανός αρνητικός ρυθμιστής της προηγούμενης (μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα GAP) (50, 85). Με βάση το παραπάνω σκεπτικό, προκειμένου να πάρουμε πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο των Rabs στους μηχανισμούς δημιουργίας, μετακίνησης και έκκρισης των WPBs, στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η σχετική χωροχρονική οργάνωση των πέντε WPB-Rabs. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σειρά και ο χρόνος στρατολόγησης των παραπάνω Rabs στη μεμβράνη των WPBs, ο ρυθμός ανακύκλωσης των Rab πρωτεϊνών μεταξύ μεμβράνης των WPBs και κυτταροπλάσματος, καθώς και ο πιθανός ρόλος της πρώτης στρατολογούμενης Rab στην στρατολόγηση των επόμενων.

Αρχικά, λαμβάνοντας υπόψη πως αυτές οι 5 διαφορετικές Rabs εντοπίζονται σχεδόν σε όλα τα ώριμα WPBs του κυττάρου, έπρεπε να βρεθούν οι συνθήκες εντοπισμού και παρακολούθησης του νεοσυντιθέμενου vWF, κατά την έξοδό του από το Golgi, για να είναι δυνατή η μελέτη της σειράς στρατολόγησης των Rabs κατά τα αρχικά στάδια της ζωής των κυστιδίων. Αυτό κατέστη εφικτό με την ενεργοποίηση των κυττάρων με PMA που προκάλεσε την εξωκυττάρωση των περισσότερων προϋπαρχόντων WPBs του κυττάρου (άδειασμα των WPBs του κυττάρου). Επειδή, η δράση του PMA είναι αντιστρεπτή, με την αφαίρεσή του παρατηρήθηκε η δημιουργία και ενδοκυττάρια μετακίνηση των νέων κυστιδίων WPBs τα οποία κουβαλούσαν τα νεοσυντιθέμενα μόρια vWF. Με τον τρόπο αυτό, η καταγραφή της θέσης και της δυναμικής των Rabs άρχισε από τη στιγμή που σχηματίζονται τα WPBs.

Ανάλυση των πειραμάτων σε μονιμοποιημένα κύτταρα, όπου η διακριτική ικανότητα χρόνου είναι μικρή, δεν ανέδειξε διαφορές στο χρόνο στρατολόγησης των διαφορετικών Rabs. Έτσι, οι πέντε WPB-Rabs φάνηκε να στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs περίπου 1 ώρα μετά τη δημιουργία των νέων WPBs και πως η στρατολόγησή τους στα WPBs αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι Rabs στρατολογούνται σχετικά πρώιμα στη μεμβράνη των WPBs, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρόλο των Rabs στην ωρίμανση και τη μετακίνηση των κυστιδίων. Μάλιστα, τα WPBs απαιτούν σημαντικό χρόνο για να ωριμάσουν πλήρως (4-26 ώρες) πριν συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη, καθώς χρειάζονται αρκετές ώρες για τον πολυμερισμό του vWF και την δημιουργία των σωληνοειδών δομών του, που χαρακτηρίζουν τα ώριμα WPBs (116).

Η μικροσκοπία πραγματικού χρόνου, η οποία εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη διακριτική ικανότητα χρόνου σε σχέση με την μικροσκοπία μονιμοποιημένων κυττάρων, μας έδωσε τη δυνατότητα να μελετήσουμε τη σειρά στρατολόγησης των παραπάνω Rabs σε μικρότερα χρονικά κλάσματα και να εντοπίσουμε διαφορές στο χρόνο στρατολόγησης των διαφορετικών Rabs. Οι πρώτες Rabs που εμφανίζονται στα WPBs, σχεδόν ταυτόχρονα, είναι η Rab27a μαζί με την Rab33a και την Rab37, ενώ έπεται η διαδοχική στρατολόγηση των Rab3a και Rab15.

Τα παραπάνω ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία τα νεοσυντιθέμενα WPBs δεν φέρουν την Rab27a και η στρατολόγησή της συμβαίνει πρώιμα σε σχέση με τη συνολική διάρκεια ωρίμανσης των οργανιδίων αυτών, έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες οι

οποίες κατέδειξαν ότι τα νέα WPBs στερούνται την Rab27a (116) και η στρατολόγησή της είναι χρόνο-εξαρτώμενη της ωρίμανσης των οργανιδίων αυτών (119), συμμετέχοντας στην αγκυροβόληση των ώριμων WPBs στον κυτταροσκελετό μέσω ενός τριμερούς συμπλόκου που αποτελείται από την Rab27a, τον τελεστή MyRIP και τη μυοσίνη Va (102). Επίσης, εμπλέκεται στην εξωκυττάρωση των κυτταροτοξικών κυστιδίων στα λεμφοκύτταρα, και είναι απαραίτητη κατά την ωρίμανση και την αγκυροβόληση των κυστιδίων (Menasche et al., 2008). Ακόμη, προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι η Rab27a, ρυθμίζει τα όψιμα βήματα της εξωκυττάρωσης μέσω της αλληλεπίδρασής της με πολλαπλούς τελεστές. Για παράδειγμα, στα παγκρεατικά β-κύτταρα, η Rab27a εντοπίζεται σε κοκκία ινσουλίνης και σχηματίζει σύμπλοκο με τους τελεστές της, όπως η Slp4, η Slp1, η MyRIP καθώς και η Noc2, και ρυθμίζει ένα συγκεκριμένο στάδιο της μετακίνησης των κοκκίων ινσουλίνης και της εξωκυττάρωσης τους. Πιο ειδικά, η Slp4 και η Slp1 ελέγχουν την εξωκυττάρωση των κοκκίων που συνδέονται με, ή αποκολλώνται από, την πλασματική μεμβράνη, αντίστοιχα, ενώ η MyRIP συγκρατεί τα κοκκία στο δίκτυο της ακτίνης για επακόλουθη απελευθέρωση (125).

Η πρόωπη στρατολόγηση της **Rab33a** είναι συμβατή με τον γνωστό εντοπισμό της στο Golgi, από όπου εκβλαστάνουν τα WPBs. Ωστόσο, ακριβώς λόγω του εντοπισμού της Rab33a στο Golgi, είναι παράξενο που αυτή η Rab δεν εντοπίζεται στα WPBs από την αρχή της εκβλάστησής τους από το Golgi. Είναι λοιπόν πιθανό η Rab33a να μην συμμετέχει στην βιογένεση των WPBs, αλλά να εμπλέκεται στην σύντηξη τους με νέα κυστίδια που εκβλαστάνουν από το Golgi, μεταφέροντας έτσι το πρωτεϊνικό τους φορτίο στα εκκριτικά αυτά οργανίδια. Είναι επίσης πιθανό να εμπλέκεται στην επιστροφή πρωτεϊνικού φορτίου από τα WPBs προς το Golgi, μέσω κυστιδίων, καθώς είναι γνωστό πως σε κύτταρα HeLa, η ισομορφή της Rab33b συμμετέχει στην ανακύκλωση των λανθασμένων φορτίων των κυστιδίων πίσω στο Golgi (126). Ακόμη, η Rab33a εντοπίζεται σε συναπτικά κυστίδια και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά τους κατά μήκος των αναπτυσσόμενων αξόνων (127). Ωστόσο, ο βασικός ρόλος της Rab33a είναι η μετακίνηση κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο Golgi (128).

Η περίπου ταυτόχρονη στρατολόγηση της Rab27a με την **Rab37** έρχεται σε συμφωνία με τον κοινό τους ρόλο ως ρυθμιστές της εξωκυττάρωσης, όπου, μαζί με την Rab3a, συμβάλλουν στην πρόσδεση και τη σύντηξη των κοκκίων ινσουλίνης με την πλασματική μεμβράνη στα παγκρεατικά κύτταρα (129).

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η **Rab3a** και **Rab15** έπονται των άλλων τριών Rabs στον χρόνο στρατολόγησης στα WPBs. Η παρατήρηση αυτή είναι συμβατή με το γεγονός ότι αυτές οι Rabs συμμετέχουν στην ρύθμιση της εξωκυττάρωσης των WPBs (90). Επιπλέον, η Rab3a ρυθμίζει την αγκυροβόληση και τη σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων (130). Ακόμη, στα κύτταρα PC12, η Rab3a συνεργάζεται με την Rab27a κατά το στάδιο της πρόσδεσης των κυστιδίων με την πλασματική μεμβράνη (105). Τέλος, η ώριμη στρατολόγηση της Rab15 (μια ενδοσωματική Rab) στα WPBs, βρίσκεται σε συμφωνία με την συμμετοχή της στην εξωκυττάρωση των οργανιδίων αυτών (90). Η **Rab15**, προσδένεται στην Munc13-4 (κοινός τελεστής των Rab15 και Rab27a), και μαζί με την Rab27a ρυθμίζουν την εξωκυττάρωση των WPBs (90). Ωστόσο, η Rab15 είναι και ρυθμιστής της μετακίνησης των πρώιμων ενδοσωμάτων (108). Συνεπώς, η σύνδεσή της με τα WPBs πιθανά επιτρέπει την ανταλλαγή φορτίου μεταξύ ενδοσωμάτων και WPBs, μέσω κυστιδίων (120), κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προκαταρκτικά πειράματα της παρούσας εργασίας όπου φαίνεται πως η Rab15 εντοπίζεται σε κυστίδια που έρχονται σε επαφή με τα WPBs. Αυτές οι επαφές θα μπορούσε να οργανώνονται από την πρωτεΐνη Munc13-4. Συμπερασματικά, πιθανόν τα ενδοσώματα να είναι ενδιάμεσοι μεταφορείς για την έκκριση, μεταφέροντας μηνύματα στα WPBs, συντονίζοντας έτσι τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης τα οποία πιστεύονταν ότι λειτουργούσαν ανεξάρτητα μεταξύ τους.

Καθ'όλη τη διάρκεια της video μικροσκοπίας, μετά την στρατολόγηση των Rab15, Rab27a, Rab33a και Rab37, δεν παρατηρείται εμφανής αποδέσμευσή τους από την μεμβράνη, ακόμη και στα πλήρως ώριμα WPBs. Η ιδιότητα αυτή είναι χαρακτηριστικά διαφορετική από εκείνη που παρατηρείται κατά την ωρίμανση των ενδοσωμάτων, όπου η Rab5 εγκαταλείπει την μεμβράνη αμέσως μετά την στρατολόγηση της Rab7 (85). Η διαφορά αυτή πιθανώς δηλώνει το σχηματισμό σταθερών συμπλόκων των WPB-Rabs με την μεμβράνη, αλλά και την πιθανά χαμηλή δράση τους ως GTPάσες, ή/και την μικρή ενεργότητα των GAPs, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της υδρόλυσης του GTP. Όσον αφορά την Rab3a, η μελέτη της στρατολόγησής της ήταν αρκετά δύσκολη, καθώς δεν καταφέραμε να εστιάσουμε σε κύτταρα τα οποία να είχαν λίγα νεοσυντιθέμενα WPBs. Ακόμη, οι φωτογραφίες που τραβήχτηκαν για τη δημιουργία του video ήταν κάθε 15 δευτερόλεπτα, πράγμα που δεν επέτρεπε την εύκολη παρακολούθηση κάποιου συγκεκριμένου WPB, με αποτέλεσμα να μην είμαστε σίγουροι για το κατά πόσο παραμένει σταθερά συνδεδεμένη ή εάν αποσυνδέεται.

Επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων έδωσαν πειράματα με την τεχνική FRAP, σύμφωνα με την οποία η κινητική της ανακύκλωσης μεταξύ κυτταροπλάσματος και της μεμβράνης των 5 WPB-Rabs, είναι $Rab3a > Rab15 \cong Rab33 > Rab27a \cong Rab37$. Επιπλέον, για όλες τις Rabs βρέθηκε χαμηλό ποσοστό ανάκτησης του σήματος μετά την φωτολεύκανση. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ενδεικτικές της σχετικής ταχύτητας υδρόλυσης και ανταλλαγής GTP, καθώς και της σταθερότητας των συμπλόκων που σχηματίζονται από αυτές τις Rabs στη μεμβράνη. Η Rab3a έχει διαφορετική κινητική ανάκτησης σε σχέση με τις άλλες Rabs, πιθανώς λόγω του υψηλότερου ρυθμού υδρόλυσης του GTP. Ο πολύ μικρός ρυθμός ανακύκλωσης των υπολοίπων Rabs, υποδηλώνει πως, μετά την στρατολόγηση τους στην μεμβράνη, αυτές παραμένουν κατά κύριο λόγο συνδεδεμένες με το οργανίδιο, ενώ οι κύκλοι διαλυτοποίησης στο κυτταρόπλασμα και επαναστρατολόγησης στην μεμβράνη λαμβάνουν χώρα σε μικρή έκταση. Οι Rabs αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη των WPBs μέσω της λιπιδιακής τους ουράς στο καρβόξυ τελικό άκρο τους, έτσι η κινητικότητά τους εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις τους με πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα οργανίδια αυτά. Η διαφορετική δυναμική των Rabs θα μπορούσε να υποδηλώνει, πως οι Rabs μπορεί να έχουν διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους στην εξωκυττάρωση (91). Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες κατά τις οποίες, πραγματοποιήθηκε FRAP ανάλυση στους 37⁰C για την Rab3a και την Rab27a, σε εκκριτικά κυστίδια στην κυτταρική σειρά PC12, δείχνοντας πως η Rab3a ανακτάται σχετικά γρήγορα (120 δευτερόλεπτα) ενώ η Rab27a καθόλου (131). Στην παρούσα μελέτη η τεχνική FRAP πραγματοποιήθηκε στους 27⁰C προκειμένου να μειωθεί η κινητικότητα των WPBs και να μην χάνονται από το οπτικό πεδίο κατά τη διάρκεια της καταγραφής της ανάκτησης του σήματος. Έτσι, παρά το ότι δεν αναμένεται να διαφοροποιείται η σχετική (μεταξύ των Rabs) ταχύτητα ανακύκλωσης σε φυσιολογική θερμοκρασία, η απόλυτη ταχύτητα της ανάκτησης του φθορισμού των πρωτεϊνών είναι πιθανό να είναι μεγαλύτερη στη θερμοκρασία των 37⁰C. Έτσι, πιθανόν ο ρυθμός ανακύκλωσής της Rab3a να είναι μεγαλύτερος από αυτόν που βρήκαμε. Επίσης, στους 21⁰C, η Rab27a βρέθηκε να ανακτάται μόνο σε μία περίπτωση, κατά την οποία έγινε φωτοσκίαση στο μισό WPB (132). Η ανάκτησή της όμως, στην περίπτωση αυτή, μάλλον οφείλεται στην ανακατανομή των μορίων στη μεμβράνη των WPBs, και όχι στη στρατολόγηση νέων κυτταροπλασματικών μορίων της Rab27a, καθώς όταν έγινε φωτοσκίαση σε ολόκληρο το WPB, η Rab27a δεν ανακτήθηκε καθόλου (132).

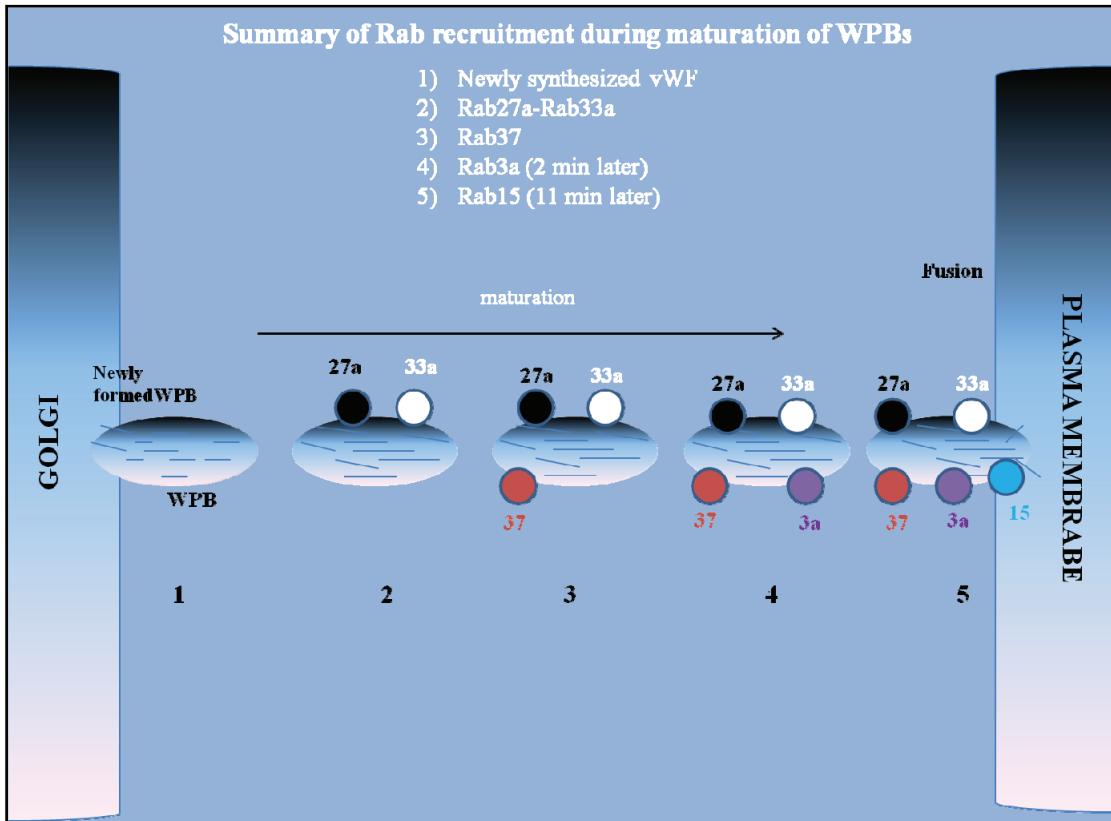
Κατά την επεξεργασία της μικροσκοπίας σε πραγματικό χρόνο της Rab37 σε σχέση με την Rab27a, παρατηρήθηκε πως ενώ σε κάποια WPBs ο συνεντοπισμός μεταξύ των 2 αυτών Rabs είναι απόλυτος, σε κάποια άλλα WPBs η Rab27a κατανέμεται σε διαφορετική υποπεριοχή του WPB σε σχέση με την Rab37 (σημειωτέον, το πρότυπο ασυμμετρίας παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ Rab27a και Rab37, και σε κανένα άλλο ζευγάρι των WPB-Rabs). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που ανέδειξαν ότι διαφορετικές Rabs είναι δυνατό να εντοπίζονται σε διαφορετικές υπό-περιοχές της μεμβράνης του οργανιδίου που στρατολογούνται. Συγκεκριμένα, στο μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης, οι Rab4, Rab5 και Rab11 στρατολογούνται σε διαφορετικές υποπεριοχές των πρώιμων ενδοσωμάτων, ρυθμίζοντας την ανακατανομή συγκεκριμένων μεμβρανικών περιοχών των ενδοσωμάτων (82). Αυτή η ασύμμετρη κατανομή των Rabs συμβαδίζει με τον διαφορετικό ρόλο που έχουν αυτές στα μονοπάτια της ενδοκυττάρωσης, καθώς η Rab4 ελέγχει την βραχεία ανακύκλωση προς την μεμβράνη, η Rab11 συμμετέχει στην μετακίνηση του φορτίου προς το βραδύ ανακυκλωτικό ενδόσωμα, ενώ η Rab5 ελέγχει την παραλαβή κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και την ομοτυπική σύντηξη μεταξύ των ενδοσωμάτων (85). Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα φέρουν σε πέρας τα σύνθετα μονοπάτια διαλογής του φορτίου και στόχευσής του στον κατάλληλο προορισμό. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι διαφορετικές υπο-περιοχές των Rab27a και Rab37 στα WPBs πιθανόν να οφείλεται σε διακριτές αλληλεπιδράσεις τους με μόρια της μεμβράνης που παρουσιάζουν πολωμένη κατανομή, ενώ η ενορχήστρωση των δράσεών τους μπορεί να αποδίδεται στην ύπαρξη κοινών τελεστών τους. Η πολωμένη κατανομή των Rab27a και Rab37 θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για διακριτές λειτουργίες των δύο αυτών Rabs κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, μεταφοράς και σύντηξης των WPBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η χώρο-χρονική οργάνωση των διαφορετικών αυτών λειτουργιών θα μπορούσε να ελέγχεται από τους κοινούς τελεστές και ρυθμιστές τους (GEFs, GAPs).

Σε προηγούμενες μελέτες, για τις Rabs των ενδοσωμάτων, βρέθηκε ότι η διαδοχική τους στρατολόγηση στην μεμβράνη ελέγχεται από τις Rabs αυτές καθαυτές (85). Οι πρώτες Rabs που στρατολογούνται στα WPBs είναι οι Rab27a, Rab37 και Rab33a, ενώ έπονται διαδοχικά οι Rab3a και Rab15. Έτσι, προκειμένου να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό στρατολόγησης των WPB-Rabs, επιλέξαμε να μελετήσουμε την πιθανή συμμετοχή της Rab27a στην στρατολόγηση των υπολοίπων Rabs. Ο λόγος που επιλέχθηκε να μελετηθεί ο ρόλος της Rab27a, αντί κάποιας εκ των υπολοίπων Rabs, είναι

η ιδιαίτερη σημασία που έχει αυτή η Rab για τα WPBs, καθώς αποτελεί την πρώτη Rab που βρέθηκε να εντοπίζεται στη μεμβράνη των WPBs (116), είναι ο πιο καλά μελετημένος ρυθμιστής της εξωκυττάρωσής τους (90, 91, 100, 102, 103, 116) και απαντάται σε όλα τα ώριμα WPBs (119). Προκειμένου να μελετήσουμε τη σημασία της Rab27a στη στρατολόγηση των άλλων τεσσάρων Rabs, πραγματοποιήσαμε πειράματα αποσιώπησής της με ειδικά siRNAs και υπερέκφρασης των υπολοίπων Rabs συζευγμένες με GFP. Σε ότι αφορά στα **ώριμα** WPBs, δεν φαίνεται η Rab27a να επηρεάζει τη στρατολόγηση των άλλων Rabs σε αυτά. Ωστόσο, στα **νεοσυντιθέμενα WPBs**, η αποσιώπηση της Rab27a μείωσε τον χρόνο στρατολόγησης των Rab3a, Rab15, και Rab37, ενώ αύξησε τον χρόνο που στρατολογείται η Rab33a. Συνεπώς, φαίνεται ότι η Rab27a είναι υπεύθυνη για την καταστολή της στρατολόγησης των Rab3a, Rab15 και Rab37, πιθανόν αναστέλλοντας τους GEF τους ή ενεργοποιώντας τις GAP τους, ενώ υποστηρίζει την στρατολόγηση της Rab33a, πιθανά μέσω ενεργοποίησης των GEF της ή καταστέλλοντας τις GAP της.

Συμπερασματικά, η σειρά των βημάτων στρατολόγησης των Rabs στη μεμβράνη των πρώιμων WPBs, και ο κατά προσέγγιση χρόνος που αυτή συμβαίνει σε σχέση με την δημιουργία τους είναι:

1. Σχηματισμός από το Golgi των νεοσυντιθέμενων WPBs, στα οποία εισέρχονται τα νεοσχηματισμένα μόρια του vWF
2. Οι πρώτες Rabs που εμφανίζονται στα WPBs, σχεδόν ταυτόχρονα, είναι η Rab27a μαζί με την Rab33a, περίπου μία ώρα μετά τη δημιουργία των κυστιδίων,
3. Η Rab37 στρατολογείται σύντομα μετά από αυτές και τέλος
4. Ακολουθεί η διαδοχική στρατολόγηση των Rab3a και Rab15 μετά από 2 και 11 λεπτά αντίστοιχα (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση της σειράς των βημάτων στρατολόγησης των Rabs στη μεμβράνη των πρώιμων WPBs, και ο κατά προσέγγιση χρόνος που αυτή συμβαίνει σε σχέση με την δημιουργία τους.

Συνοπτικά, η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη μελέτη που παρουσιάζει τη σειρά στρατολόγησης των 5 αυτών Rabs στη μεμβράνη των WPBs. Επιπλέον βρήκαμε ότι οι Rab15, Rab27a, Rab33a, Rab37 έχουν μικρό βαθμό ανακύκλωσης, και δεν ακολουθούν κύκλους διαλυτοποίησης στο κυτταρόπλασμα και επαναστρατολόγησης. Εξάιρεση αποτελεί η Rab3a, η οποία έχει σχετικά μεγάλη κινητική ανάκτησης, πιθανά λόγω του υψηλότερου ρυθμού υδρόλυσης του GTP. Ακόμη, ανιχνεύθηκαν WPBs στα οποία οι Rab27a και Rab37 εντοπίζονταν σε διαφορετικές υπό-περιοχές της μεμβράνης, που πιθανά υποδηλώνει διαφορετικές λειτουργίες αυτών των Rabs κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, μεταφοράς των WPBs στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και σύντηξης με αυτή. Τέλος, η Rab27a βρέθηκε πως ρυθμίζει τον χρόνο στρατολόγησης των υπολοίπων Rabs στη μεμβράνη των WPBs. Έτσι, φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την καταστολή της στρατολόγησης των Rab3a, Rab15, Rab37, πιθανά αναστέλλοντας τους GEF τους ή ενεργοποιώντας τις GAP τους, ενώ, είναι υπεύθυνη για την γρήγορη στρατολόγηση της Rab33a, πιθανά ενεργοποιώντας τους GEF της ή καταστέλλοντας τις GAP της. Στον πίνακα 4.1 που ακολουθεί γίνεται μία ανασκόπηση των

γνωστών μέχρι σήμερα GEF, GAP και τελεστών των WPB-Rabs. Οι πρωτεΐνες αυτές αναμένεται να αποτελούν τους ρυθμιστές της κινητικής/δυναμικής των Rabs στα WPBs.

	GEFS	GAPS	Effectors
Rab3a	MADD	TBC1D10B , Rab3GAP, USP6NL	Rabin3, RIM1 α , RIM2 α , Slp4a , Noc2, Munc18-1, Rabphilin , INPP5B, SNAP-29, Synapsin, Noc2 , MyoVa
Rab15	-	-	MICAL-1, MICAL COOH-terminal like, MICAL-L1, JRAB/MICAL-L2, Rab15 effector protein, Munc13-4
Rab27a	MADD	TBC1D10A/TBC1D10B	Slp1-5, Slac2-a, Slac2-b, Slp4a , MyRIP, Rim2, Rabphilin , Noc2 , Munc13-4
Rab33a	-	TBC1D25	ATG16L, GM130, rabaptin-5, rabex-5
Rab37	-	-	RIM1

Πίνακας 4.1. Γνωστοί GEFs, GAPs και Effectors των Rabs των WPBs. Με έντονα σκιασμένα γράμματα απεικονίζονται οι κοινοί ρυθμιστές (GEFS, GAPS) και τελεστές που μοιράζονται η Rab3a με την Rab27a. Η Rab15, έχει τη Munc13-4 ως κοινό τελεστή με την Rab27a, ενώ για τις υπόλοιπες Rabs μένουν ακόμη αρκετά ερωτηματικά (49, 90, 133, 134).

Κλείνοντας, η ύπαρξη διαφορετικών Rabs στα ίδια οργανίδια και η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με κοινούς τελεστές φαίνεται να αποτελεί μηχανισμό εφεδρείας και άμυνας του κυττάρου, ώστε σε περίπτωση απώλειας της μιας Rab να διασφαλίζεται η ολοκλήρωση της μεταφοράς από την άλλη (83). Έτσι, η ταυτοποίηση του συνόλου των τελεστών και ρυθμιστών των Rabs θα αποκάλυπτε τα μυστικά της οργάνωσης της κυστιδιακής μεταφοράς, καθώς η ενδοεπικοινωνία μεταξύ διαφορετικών Rabs, μέσω των κοινών τελεστών και ρυθμιστών τους, που ελέγχουν την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση των Rabs, εξασφαλίζει τη χωροχρονική τους ρύθμιση.

Περίληψη

Τα Weibel Palade Bodies (WPBs) είναι επιμηκυσμένα εκκριτικά οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων που περιέχουν τον παράγοντα von Willebrand (vWF) και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σχηματισμό αιμοστατικών θρόμβων, στη φλεγμονή, στην αγγειογένεση και στην αποκατάσταση των ιστών. Έτσι, η εξωκυττάρωση των WPBs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των αιμοφόρων αγγείων. Για να επιτύχουν την έκκριση των μορίων τους, τα WPBs, υφίστανται μια αργή διαδικασία ωρίμανσης, κατά την οποία μεταφέρονται στην περιφέρεια του κυττάρου και συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη.

Οι Rab GTPases είναι καθοριστικοί παράγοντες που ελέγχουν την εξειδικευμένη στόχευση των κυστιδίων στα οργανίδια προορισμού τους. Σε προηγούμενη μελέτη εντοπίσαμε 5 Rabs (Rab3a, 15, 27a, 33a και 37) ειδικά εντοπισμένες στη μεμβράνη των WPBs (WPB-Rabs).

Μια γνωστή πειραματική προσέγγιση για να ληφθούν πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο των διαφορετικών Rabs στα μεμβρανικά οργανίδια είναι η μελέτη της σειράς στρατολόγησής τους, καθώς οι πρώιμες Rabs αναμένεται να παίζουν ρόλο στην δημιουργία των οργανιδίων αυτών καθυστερώντας, αλλά και στην παραλαβή κυστιδίων από το προηγούμενο μεμβρανικό διαμέρισμα του μονοπατιού, ενώ οι μετέπειτα στρατολογούμενες Rabs αναμένεται να εμπλέκονται στην επικοινωνία των οργανιδίων με τα επόμενα διαμερίσματα του μονοπατιού. Έτσι, στην παρούσα εργασία, προκειμένου να λάβουμε πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο των πέντε WPB-Rabs στους μηχανισμούς δημιουργίας, μετακίνησης και έκκρισης των WPBs, θέσαμε ως στόχο την μελέτη της χωροχρονικής οργάνωσης των παραπάνω Rabs στα WPBs. Πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε τη σειρά και το χρόνο στρατολόγησής αυτών των Rabs στα WPBs, από τη στιγμή του σχηματισμού τους, μέχρι να ωριμάσουν και να συντηχθούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Βρήκαμε ότι οι παραπάνω 5 Rabs στρατολογούνται στη μεμβράνη των WPBs τουλάχιστον 1 ώρα μετά από την σύνθεσή τους από το Golgi. Οι πρώτες Rabs που εμφανίζονται στα WPBs, σχεδόν ταυτόχρονα, είναι η Rab27a και η Rab33a. Η Rab37 στρατολογείται σύντομα μετά από αυτές, και ακολουθεί η διαδοχική στρατολόγηση των Rab3a και Rab15. Μέσω πειραμάτων FRAP, όπου μελετήσαμε το χρόνο ανάκτησης φθορισμού των WPBs μετά από φωτοσκίαση των πέντε GFP-Rabs, διαπιστώσαμε ότι η ταχύτητα ανακύκλωσης των Rabs, μεταξύ μεμβράνης και κυτταροπλάσματος, ακολουθεί

τη σειρά Rab3a>Rab15≅Rab33a>Rab37≅Rab27a. Η σειρά αυτή είναι ενδεικτική της σχετικής (συγκριτικά μεταξύ των πέντε Rabs) σταθερότητας των συμπλόκων που σχηματίζουν οι Rabs στην μεμβράνη, αλλά και της ταχύτητας υδρόλυσης του GTP και της διαλυτοποίησής τους προς το κυτταρόπλασμα. Τέλος, δεδομένου ότι η Rab27a είναι η πρώτη Rab που στρατολογείται στα WPBs και, με βάση τις μέχρι τώρα μελέτες, η πιο σημαντική για την ωρίμανση και έκκρισή τους, μελετήσαμε τον πιθανό ρόλο της Rab27a στην στρατολόγηση των υπολοίπων τεσσάρων, πραγματοποιώντας πειράματα αποσιώπησης με siRNAs. Τα πειράματα αυτά κατέδειξαν ότι η έλλειψη της Rab27a από τα νεοσυντιθέμενα WPBs μειώνει τον χρόνο στρατολόγησης των Rab3a, Rab15, και Rab37, ενώ αυξάνει τον χρόνο που απαιτείται για την στρατολόγηση της Rab33a.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν τις πρώτες μέχρι σήμερα πληροφορίες σχετικά με την χωροχρονική στρατολόγηση και δυναμική των WPB-Rabs, συμβάλλοντας έτσι στην κατανόηση του πιθανού ρόλου αυτών των Rabs στην ωρίμανση και την εξωκυττάρωση των WPBs.

Summary

Weibel Palade Bodies (WPBs) are elongated secretory organelles of endothelial cells that contain von Willebrand factor (vWF) and other cargo proteins that contribute to hemostatic plug formation, inflammation, angiogenesis, and tissue repair. Thus, WPB exocytosis plays important role in the pathophysiology of blood vessels. To accomplish secretion of their cargo molecules, WPBs undergo maturation, transport and fusion with the plasma membrane.

Rab GTPases are crucial factors in controlling the specific targeting of vesicles to their destination organelles. In previous studies we identified 5 Rabs (Rab3a, 15, 27a, 33a and 37) specifically localized at the membrane of WPBs (WPB-Rabs).

A well-known experimental approach to obtain information of the possible role of different Rabs in membranous organelles is to study their order of recruitment, since, early recruited Rabs are expected to play a role in the generation of the organelle, as well as in the receive of vesicles coming from the previous compartment in the path, while later recruited Rabs are expected to be involved in the communication of the organelle with the next compartments of the path. Thus, in this Thesis, in order to get insights into the possible role of the five WPB-Rabs in the mechanisms of formation, transport and exocytosis of WPBs, we aimed in studying their spatio-temporal organization at WPBs. In particular, we studied the order and timing of recruitment of these Rabs at WPBs, from the time they are generated at the Golgi, until they mature and fuse with the plasma membrane. We found that the above 5 Rabs are recruited to the membrane of WPBs at least 1 hour after these organelles are produced from the Golgi compartment. The first Rabs that appear at WPBs, almost at the same time, are Rab27a and Rab33a; Rab37 is recruited soon after them, followed by the sequential recruitment of Rab3a and Rab15. Based on FRAP experiments, where we studied the fluorescence recovery time of WPBs after photobleaching of these 5 GFP-Rabs, we found that the recycling rate of Rabs, between membrane and cytoplasm, follow the order Rab3a>Rab15≅Rab33>Rab37≅Rab27. This order is indicative of the relative (comparatively between these five Rabs) stability of the complexes formed by these Rabs on the membrane, as well as of the rate of GTP hydrolysis and of their solubilization towards the cytoplasm. Finally, since Rab27a is the first recruited Rab at WPBs and, based on previous studies, the most important for their maturation and secretion, we studied the possible role of Rab27a in the membrane

recruitment of the other four Rabs, by employing siRNA-based silencing experiments. These experiments showed that lack of Rab27a from the newly formed WPBs reduces the time of recruitment of Rab3a, Rab15, and Rab37, while it augments the time required for the recruitment of Rab33a.

All in all, the above data provide the first to date information on the spatial-temporal recruitment and dynamics of WPB-Rabs, thus contributing to the understanding of the possible role of these Rabs on WPB maturation and exocytosis.

Βιβλιογραφία

1. Loscalzo, A. I. and Schafer, E. (2002) Clinical manifestation of endothelial dysfunction. *Thrombosis and Hemorrhage*, 685–706.
2. Nico, B., Crivellato, E. and Ribatti, D. (2007) The importance of electron microscopy in the study of capillary endothelial cells: an historical review. *Endothelium*, 14, 257-264.
3. Tkachenko, E., Gutierrez, E., Saikin, S. K., Fogelstrand, P., Kim, C., Groisman, A. and Ginsberg, M. H. (2013) The nucleus of endothelial cell as a sensor of blood flow direction. *Biology Open*, 0, 1–6,
4. Wilson, S. H. and Lerman, A. (2001) Function of Vascular Endothelium. *Heart Physiology and Pathophysiology*, 27.
5. Durand, M. J. and Gutterman, D. D. (2013) Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. *Microcirculation*. 20, 239–247.
6. Rajendran, P., Rengarajan, T. J. Y. and Sakthisekaran, D. G. I. (2013) The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*, 9, 1057–1069.
7. Lerman, A. and Burnett, J. C. Jr. (1992) Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*, 86, 12-19.
8. Galley, H. F. and Webster, N. R. (2004) Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, 93, 105–113.
9. Libby, P. M. and Ridker, A. M. (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135–1143.
10. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M. and Stern, D. M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91, 3527-3561.
11. Cau, S. B. A., EvoraRita, P. R. B. and Tostes, C. (2018) Vascular Biology and Clinical Syndromes, 9, 115-125.
12. Soriano, A., Pipitone, N. and Salvarani, C. (2017) Behçet’s Disease. *The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases Pathophysiology, Clinical Aspects and Therapeutic Approaches*, 21, 505-526.

13. Mc Gill, S. N., Ahmed, N. A. and Christou, N. V. (1998) Endothelial cells: role in infection and inflammation. *World J Surg*, 22, 171-8.
14. Eilken, H. M. and Adams, R. H. (2010) Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 617-25.
15. Hamilton, S. J. and Watts, G. F. (2013) Endothelial Dysfunction in Diabetes: Pathogenesis, Significance, and Treatment. *Rev Diabet Stud*, 10, 133-156.
16. Weibel, E. R. and Palade, G. E. (1964) New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol*, 23, 101-112.
17. Rondaij, M. G., Bierings, R., Kragt, A., van Mourik, J. A. and Voorberg, J. (2006) Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1002-7.
18. Metcalf, D. J., Nightingal, T. D., Zenner, H. L., Lui-Roberts, W. W. and Cutler, D. F. (2008) Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci*, 121, 19-27.
19. Mc Cormack, J. (2017) Weibel–Palade bodies at a glance. *J Cell Sci*, 130, 3611-3617.
20. Valentijn, K. M., van Driel, L. F., Mourik, M. J., Hendriks, G., Arends, T. J., Koster, A. J. and Valentijn, J. A. (2010) Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood*, 116, 1807-1816.
21. Wang, J. W. and Eikenboom, J. (2010) Von Willebrand disease and Weibel-Palade bodies. *Hamostaseologie*, 30, 150-5.
22. Von Willebrand, E. A. (1926) Hereditar pseudoheemofili. *Fin Laekaresaellsk Hand*, 68, 87–112.
23. Larrieu, M. J. and Soulier, J. P. (1954) Willebrand-Jürgens syndrome and thrombopathies; study of 66 cases; attempt at classification. *Rev Hematol*, 8, 361–370.
24. Nilsson, I. M., Blomback, M. and Blomback, B. (1959) Willebrand's disease in Sweden; its pathogenesis and treatment. *Acta Med Scand*, 164, 263–78.
25. Yin, J., Ma, Z., Su, J., Wang, J. W., Zhao, X., Ling, J., Bai, X., Ouyang, W., Wang, Z., Yu, Z. and Ruan, C. (2015) Mutations in the D1 domain of von Willebrand factor impair their propeptide-dependent multimerization, intracellular trafficking and secretion. *Journal of Hematology & Oncology*, 8, 73.
26. Haberichter, S. L. (2015) von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. *Blood*, 126, 1753-1761.

27. Crawley, J. T. B. and Scully, M. (2013) Thrombotic thrombocytopenic purpura: basic pathophysiology and therapeutic strategies. *Hematology*, 1, 292-9.
28. Giblin, J. P., Hewlett, L. J. and Hannah, M. J. (2008) Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, 112, 957-964.
29. Lopes da Silva, M. and Cutler, D. F. (2016) von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells. *Blood*, 128, 277-285.
30. Levy, G. G., Nichols, W. C., Lian, E. C., Foroud, T., McClintick, J. N., McGee, B. M., Yang, A. Y., Siemieniak, D. R., Stark, K. R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S. B., Chandrasekaran, V., Stabler, S. P., Sabio, H., Bouhassira, E. E., Upshaw, J. D., Ginsburg, D. and Tsai, H. M. (2001) Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 413, 488-94.
31. Sadler, J. E. (2008) Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 112, 11-18.
32. Sadler, J. E. (2005) von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost*, 3, 1702-1709.
33. Blagoveshchenskaya, A. D., Hannah, M. J., Allen, S. and Cutler, D. F. (2002) Selective and signal-dependent recruitment of membrane proteins to secretory granules formed by heterologously expressed von Willebrand factor. *Mol Biol Cell*, 13, 1582-1593.
34. Wagner, D. D., Saffaripour, S., Bonfanti, R., Sadler, J. E., Cramer, E. M., Chapman, B. and Mayadas, T. N. (1991) Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide. *Cell*, 64, 403-413.
35. Ferraro, F., Mafalda Lopes da, S., Grimes, W., Lee, H. K., Ketteler, R., KristonVizi, J. and Cutler, D. F. (2016) Weibel–Palade body size modulates the adhesive activity of its von Willebrand Factor cargo in cultured endothelial cells. *Sci Rep*, 6, 32473.
36. Lui-Roberts, W. W., Collinson, L. M., Hewlett, L. J., Michaux, G. and Cutler, D. F. (2005) An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel–Palade bodies of endothelial cells. *J Cell Biol*, 170, 627-636.
37. Michaux, G., Abbitt, K. B., Collinson, L. M., Haberichter, S. L., Norman, K. E. and Cutler, D. F. (2006) The physiological function of von Willebrand’s factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel–Palade bodies. *Dev Cell*, 10, 223-232.

38. Shapiro, S. E., Nowak, A. A., Wooding, C., Birdsey, G., Laffan, M. A. and McKinnon, T. A. (2014) The von Willebrand factor predicted unpaired cysteines are essential for secretion. *J Thromb Haemost*, 12, 246-254.
39. Springer, T. A. (2014) von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*, 124, 1412-1425.
40. Zhou, Y. F., Eng, E. T., Nishida, N., Lu, C., Walz, T. and Springer, T. A. (2011) A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J*, 30, 4098-4111.
41. De Wit, T. R. and van Mourik, J. A. (2001) Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14, 241-255.
42. Hannah, M. J., Williams, R., Kaur, J., Hewlett, L. J. and Cutler, D. F. (2002) Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin Cell Dev Biol*, 13, 313-324.
43. Michaux, G. and Cutler, D. F. (2004) How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Traffic*, 5, 69-78.
44. Sadler, J. E. (2009) von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 24-27.
45. Zenner, H. L., Collinson, L. M., Michaux, G. and Cutler D. F. (2007) High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. *Journal of Cell Science*, 120, 2117-2125.
46. Goligorsky, M. S., Patschan, D. and Kuo, M. C. (2009) Weibel-Palade bodies--sentinels of acute stress. *Nat Rev Nephrol*, 5, 423-426.
47. Rothman, J. E. (2014) The principle of membrane fusion in the cell (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 12676-94.
48. Chavrier, P. and Goud, B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 466-475.
49. Hutagalung, A. H. and Novick, P. J. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91, 119-149.
50. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 513-525.
51. Wennerberg, K., Rossman K. and Der, C. J. (2005) "The Ras superfamily at a glance". *J Cell Sci*, 118, 843-6.

52. Behnia, R. and Munro, S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438, 597–604.
53. Salminen, A. and Novick, P. J. (1987) A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell*, 49, 527–538.
54. Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol*, 2.
55. Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, I. M. and Houdusse, A. (2017) Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. *Small GTPases*, 9, 22-48.
56. Goitre, L., Trapani, E., Trabalzini, L. and Retta, S. F. (2013) "The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets". *MIMB*, 1120, 1–18.
57. Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol*, 313, 889–901.
58. Lipatova, Z., Hain, A. U., Nazarko, V. Y. and Segev, N. (2015) Ypt/Rab GTPases: principles learned from yeast. *Crit Re. Biochem Mol Biol*, 50, 203–211.
59. Leung, K. F., Baron, R. and Seabra, M. C. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res*, 47, 467-475.
60. Shi, M., Shi, C. and Xu, Y. (2017) Rab GTPases: The Key Players in the Molecular Pathway of Parkinson’s Disease. *Front Cell Neurosci*, 11.
61. Itzen, A. and Goody, R., S. (2016) Key Determinants of Rab Specificity. *Cell Press*, 16, 1437-1439.
62. Ali, B. R. and Seabra, M.C. (2005) Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem Soc Trans*, 33, 652-656.
63. Grosshans, B. L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci*, 103, 11821-7.
64. Ali, B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. and Seabra, M. C. (2004) Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci*, 117, 6401-6412.
65. Goody, R. S., Rak, A. and Alexandrov, K. (2005) The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci*, 62, 1657-1670.
66. Klooster, J. P. and Hordijk, P. L. (2007) Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biol Cell*, 99, 1-12.

67. Blümer, J., Rey J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y. W., Bastiaens, P., Goody, R. S. and Itzen, A. (2013) RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *JCB*, 200, 287.
68. Wandinger-Ness, A. and Zerial, M. (2014) Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10, a022616-1022616.
69. Pfeffer, S. (2013) Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol*, 25, 414-419.
70. Zhen, Y. and Stenmark, H. (2015) Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128, 3171-3176.
71. Angers, C. G. and Merz, A. J. (2010) New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 18–26.
72. Hales, C. M., Vaerman, J. P. and Goldenring, J. R. (2002) Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem*, 277, 50415-50421.
73. Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, JR., Matesic, L. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Hammer, J. A., 3rd. (2002) Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol*, 4, 271-278.
74. Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 107-117.
75. Mima, J. (2018) Reconstitution of membrane tethering mediated by Rab-family small GTPases. *Biophys Rev*, 10, 543–549.
76. Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. and Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, 62, 317–329.
77. Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. and Zerial, M. (1991) Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature*, 353, 769–772.
78. Brennwald, P. and Novick, P. (1993) Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature*, 362, 560–563
79. Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ullrich, O., Goud, B. and Zerial, M. (1994) Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *EMBO J*, 13, 575–583.

80. Pfeffer, S. (2005) A model for Rab GTPase localization: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*, 33, 627–630.
81. Aivazian, D., Serrano, R. L. and Pfeffer, S. (2006) TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol*, 173, 917–926.
82. Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, 149, 901-914.
83. Fukuda, M. (2010) How can mammalian Rab small GTPases be comprehensively analyzed? Development of new tools to comprehensively analyze mammalian Rabs in membrane traffic. *Histology and histopathology*, 25, 1473-80.
84. Caviglia, S., Flores-Benitez, D., Lattner, J., Luschnig, S. and Brankatschk, M. (2016) Rabs on the fly: Functions of Rab GTPases during development. *Small GTPase*, 0, 1-10.
85. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.
86. Nottingham, R. M. and Pfeffer, S. R. (2009) Defining the boundaries: Rab GEFs and GAPs, *PNAS*, 106, 14185–14186.
87. Vázquez-Martínez, R. and Malagón, M. M. (2011) Rab Proteins and the Secretory Pathway: The Case of Rab18 in Neuroendocrine Cells. *Front Endocrinol*, 2, 1.
88. Martelli, A. M., Baldini, G., Tabellini, G., Koticha, D. and Bareggi, R. (2000) Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells. *Traffic*, 1, 976–98610.
89. Schluter, O. M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C. (2004) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J Neurosci*, 24, 6629–663710.
90. Zografou, S., Basagiannis, D., Papafotika, A., Shirakawa, R., Horiuchi, H., Auerbach, D., Fukuda, M. and Christoforidis, S. (2012) A complete Rab screening reveals novel insights in Weibel-Palade body exocytosis. *Journal of Cell Science*, 125, 4780-4790.
91. Fukuda, M. (2005) Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J Biochem*, 137, 9-16.
92. Brunner, Y., Coute, Y., Iezzi, M., Foti, M., Fukuda, M., Hochstrasser, D. F., Wollheim, C. B. and Sanchez, J. C. (2007) Proteomics analysis of insulin secretory granules. *Mol Cell Proteomics*, 6, 1007-1017.

93. Casey, T. M., Meade, J. L. and Hewitt, E. W. (2007) Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics*, 6, 767-780.
94. Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F. and Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127, 831-846.
95. Matsushita, K., Morrell, C. N., Cambien, B., Yang, S. X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M. R., Quick, R. A., Cao, W. and O'Rourke, B. (2003) Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell*, 115, 139-150.
96. Pulido, I. R., Jahn, R. and Gerke, V. (2011) VAMP3 is associated with endothelial weibel-palade bodies and participates in their Ca²⁺-dependent exocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1038-1044.
97. Zhu, Q., Yamakuchi, M., Ture, S., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Ko, K. A., Modjeski, K. L., LoMonaco, M. B., Johnson, A. D., O'Donnell, C. J. and Takai, Y. (2014) Syntaxin-binding protein STXBP5 inhibits endothelial exocytosis and promotes platelet secretion. *J Clin Invest*, 124, 4503-4516.
98. Han, X., Li, P., Yang, Z., Huang, X., Wei, G., Sun, Y., Kang, X., Hu, X., Deng, Q. and Chen, L. (2017) Zyxin regulates endothelial von Willebrand factor secretion by reorganizing actin filaments around exocytic granules. *Nat. Commun*, 8, 14639.
99. Fu, J., Naren, A. P., Gao, X., Ahmmed, G. U. and Malik, A. B. (2005) Protease-activated receptor-1 activation of endothelial cells induces protein kinase Calpha-dependent phosphorylation of syntaxin 4 and Munc18c: role in signaling p-selectin expression. *J Biol Chem*, 280, 3178-3184.
100. Van Breevoort, D., van Agtmaal, E. L., Dragt, B. S., Gebbinck, J. K., Dienava-Verdoold, I., Kragt, A., Bierings, R., Horrevoets, A. J., Valentijn, K. M. and Eikenboom, J. C. (2012) Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel–Palade bodies. *J Proteome Res*, 11, 2925-2936.
101. Knop, M., Aareskjold, E., Bode, G. and Gerke, V. (2004) Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *Embo J*, 23, 2982-2992.

102. Nightingale, T. D., Pattni, K., Hume, A. N., Seabra, M. C. and Cutler, D. F. (2009) Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of VWF released from endothelial cells. *Blood*, 113, 5010-5018.
103. Bierings, R., Hellen, N., Kiskin, N., Knipe, L., Fonseca, A. V., Patel, B., Meli, A., Rose, M., Hannah, M. J. and Carter, T. (2012) The interplay between the Rab27A effectors Slp4-a and MyRIP controls hormone-evoked Weibel–Palade body exocytosis. *Blood*, 120, 2757-2767.
104. Chehab, T., Santos, N. C., Holthenrich, A., Koerdt, S. N., Disse, J., Schuberth, C., Nazmi, A. R., Neeftm, M., Koch, H., Man, M., Wojcik, S. M., Martin, T. F. J., van der Sluijs, P., Brose, N. and Gerkea, V. (2016) A novel Munc13-4/S100A10/annexin A2 complex promotes Weibel–Palade body exocytosis in endothelial cells. *MBoc*, 28, 1688–1700.
105. Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2006) Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci*, 119, 2196–2203.
106. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
107. Snapp, E. (2005) *Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology*. *Curr Protoc Cell Biol*, 27, 2141-21413.
108. Zuk, P. A. and Elferink, L. A. (1999) Rab15 Differentially Regulates Early Endocytic Trafficking. *JBC*, 275, 26754-26764.
109. Mourik, M. J., Faas, F., Zimmermann, H., Voorberg, J., Koster, A. and Eikenboom, J. (2015) Content delivery to newly forming Weibel-Palade bodies is facilitated by multiple connections with the Golgi apparatus, *Blood*, 125, 3509-3516.
110. Dong, J.F., Moake, J. L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C. N., Schade, A. J., McIntire, L.V., Fujikawa, K. and Lopez, J. A. (2002) ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*, 100, 4033–9.
111. Torisu, T., Torisu, K., Hye, L. I., Liu, J., Malide, D., Combs, C. A., Wu, X. S., Rovira, I. I., Fergusson, M. M., Weigert, R., Connelly, P. S., Daniels, M. P., Komatsu, M., Cao, L. and Finkel, T. (2013) Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat Med*, 19, 1281–1287.

112. Hewlett, L., Zupančič, G., Mashanov, G., Knipe, L., Ogden, D., Hannah, M. J. and Carter, T. (2011) Temperature-Dependence of Weibel-Palade Body Exocytosis and Cell Surface Dispersal of von Willebrand Factor and Its Propolypeptide. *PLoS ONE*, 6, e27314.
113. Hannah, M. J., Skehel, P., Erent, M., Knipe, L., Ogden, D. and Carter, T. (2005) Differential kinetics of cell surface loss of von Willebrand factor and its propolypeptide after secretion from Weibel-Palade bodies in living human endothelial cells. *JBC*, 280, 22827-30.
114. Valentijn, K. M., Sadler, J. E., Valentijn, J. A., Voorberg, J. and Eikenboom J. (2011) Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*, 117, 5033-5043.
115. Conte, I. L., Cookson, E., Hellen, N., Bierings, R., Mashanov, G. and Carter, T. (2015) Is there more than one way to unpack a Weibel-Palade body? *Blood*, 126, 2165–2167.
116. Hannah, M. J., Hume, A. N., Arribas, M., Williams, R., Hewlett, L. J., Seabra, M. C. and Cutler, D. F. (2003) Weibel-Palade bodies recruit Rab27 by a content-driven, maturation-dependent mechanism that is independent of cell type. *J Cell Sci*, 116, 3939-48.
117. Shaner, Nc., Mckeown, L., Steinbach, P., Hazelwood, K. l., Davidson, M. W. and Tsien, R. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature*, 5, 545-551.
118. Siegel, A. P., Baird, M. A., Davidson, M. W. and Day, R. N. (2013) Strengths and Weaknesses of Recently Engineered Red Fluorescent Proteins Evaluated in Live Cells Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Int J Mol Sci*, 14 20340–20358.
119. Marks, M. S., Heijnen, H. F. G. and Raposo, G. (2013) Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 495–505.
120. Kobayashi, T., Vischer, U. M., Rosnoblet, C., Lebrand, C., Lindsay, M., Parton, R. G., Kruithof, E. K. O. and Gruenberg, J. (2000) The Tetraspanin CD63/lamp3 Cycles between Endocytic and Secretory Compartments in Human Endothelial Cells. *Mol Biol Cell*, 11, 1829–1843.
121. Mc Clauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osbourne, A., West, M. and Smythe, E. (1998) A novel role for rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin coated pits. *Curr Biol*, 8, 34–45.

122. Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991) Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 64, 915-925.
123. Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000) Rab7. A key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell*, 11, 467–480.
124. Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C. and Bucci, C. (1997) Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem*, 272, 4391–4397.
125. Menasche, G., Menager, M. M., Lefebvre, J. M., Deutsch, E., Athman, R., Lambert, N., Mahlaoui, N., Court, M., Garin, J., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (2008) A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates in cytotoxic granule secretion. *Blood*, 112, 5052-5062.
126. Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B. and Nilsson, T. (2001) Identification of rabaptin5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER. *FEBS Lett*, 508, 201-209.
127. Nakazawa, H., Sada, T., Toriyama, M., Tago, K., Sugiura, T., Fukuda, M. and Inagaki, N. (2012) Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *J Neurosci*, 32, 12712-25.
128. Shijie, L. and Storrie, B. (2012) Are Rab Proteins the Link Between Golgi Organization and Membrane Trafficking? *Cell Mol Life Sci*, 24, 4093–4106.
129. Ljubicic, S., Bezzi, P., Brajkovic, S., Nesca, V., Guay, C., Ohbayashi, N., Fukuda, M., Abderrhamani, A. and Regazzi, R. (2013) The GTPase Rab37 Participates in the Control of Insulin Exocytosis. *PLoS One*, 6, e68255.
130. Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F. and Südhof, T. C. (1997) The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion, *Nature*, 387, 810-4.
131. Handley, M. T. W., Haynes, L. P. and Burgoyne, R. D. (2007) Differential dynamics of Rab3A and Rab27A on secretory granules. *Journal of Cell Science*, 120, 973-984.
132. Kiskin, N. I., Hellen, N., Babich, V., Hewlett, L., Knipe, L., Hannah, M. J. and Carter, T. (2010) Protein mobilities and P-selectin storage in Weibel–Palade bodies. *J Cell Sci*, 123, 2964-2975.

133. Müller, M. P. and Goody, R. S. (2017) Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases*, 9, 5-21.
134. Encarnação, M., Espada, L., Escrevente, C., Mateus, D., Ramalho, J., Michelet, X., Santarino, I., Hsu, V. W., Brenner, M. B., Barral, D. C. and Vieira, O. V. (2016) A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. *Cell Biol*, 213, 631-40.

