



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ
ΤΗΣ RAB5 ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

**«Μελέτη του ρόλου της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2
στην ενδοκυττάρωση»**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ
ΤΗΣ RAB5 ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

**«Μελέτη του ρόλου της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2
στην ενδοκυττάρωση»**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γαλανοπούλου Αικατερίνης: 13-1-2014

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 του ρόλου των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της Rab5 στα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 906^α/25-11-2019

Φώτσης Θεόδωρος	τ. Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττας Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής-Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής 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)
Fackelmayer Frank,	Ερευνητής Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-2-2020

Ιωάννινα 17-2-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο Φεβρουάριος 2014-2020 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. Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε μέσω των ερευνητικών προγραμμάτων ΚΡΗΠΙΣ, ΙΚΥ και Ίδρυμα Σταύρος Νιάρχος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην ερευνητική του ομάδα. Η επιστημονική του καθοδήγηση υπήρξε πολύτιμη για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Θ. Φώτση και την Ερευνήτρια Β' κ. C. Murthy, 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. Ε. Κωλέττα για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου μου, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, Σοφία Ζωγράφου, Δημήτρη Μπασαγιάννη, Λαζάνη Βασιλική και Καραμάνη Βάλια για την πολύτιμη συνεργασία μας. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Γούλα και τη Δέσποινα Γκέκα, με τις οποίες ξεκινήσαμε μαζί την πορεία μας στο εργαστήριο. Η βοήθειά τους υπήρξε πολύτιμη καθώς εκτός από την άψογη συνεργασία μας, αναπτύξαμε και ισχυρούς δεσμούς φιλίας.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους εξωτερικούς συνεργάτες, τον κ. Μιχάλη Αϊβαλιώτη και την κ. Μαρίνα Ιωάννου για τα πειράματα φασματομετρίας μάζας, τον κ. Ανδρέα Τζάκο και την κ. Μαρία Χατζηαθανασιάδου για τα πειράματα Ισοθερμικής Τιτλοδότησης, τον Patrick Keller για τα πειράματα σύντηξης των ενδοσωμάτων καθώς και όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών για την πρόσχαρη διάθεσή τους για βοήθεια.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τον πατέρα μου Γιώργο, τη μητέρα μου Ζωή και την αδερφή μου Σοφία για τη συνεχή συμπαράσταση, αγάπη και κατανόηση σε κάθε μου προσπάθεια. Πιο πολύ από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βασίλη Γιαλελή για όλα τα χρόνια που είναι δίπλα μου και για την θερμή του συμπαράσταση σε ό,τι κάνω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Ενδοκυττάρωση.....	7
1.1.1 Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης.....	8
1.1.2 Ενδοκυττάρωση και ρύθμιση της σηματοδότησης	10
1.2 Οργάνωση του ενδοσωματικού συστήματος	11
1.2.1 Η οργάνωση των πρώιμων ενδοσωμάτων και ο ρόλος τους στην ενδοκυτταρική διακίνηση.....	14
1.3 Ο ρόλος των RabGTPασών στην ενδοκυττάρωση.....	16
1.3.1 Ο μηχανισμός μεμβανικής ανακύκλησης των Rab πρωτεϊνών	20
1.4 Η μικρή GTPασης Rab5 και ο ρόλος της στην ενδοκυτταρική και μεταγωγή σήματος.....	22
1.4.1 Η αλληλεπίδρασή της Rab5 με τους τελεστές της (effectors)	26
1.5 Η ανενεργή μορφή της Rab5 (GDP) αλληλεπιδρά με το κυταροπλασματικό ένζυμο ACAT2 (acetoacetyl-CoA thiolase II)	30
1.6 Ο ρόλος της ακετοακετυλοτρανσφεράσης 2 (ACAT2 ή κυταροπλασματική θειολάση, CT), στον μεταβολισμό και την ακετυλίωση πρωτεϊνών.	32
1.7 Σκοπός	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1 Υλικά	41
2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας και χειρισμού κυττάρων	42
2.2.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου	42
2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων	42
2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (cDNA) και με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs)	43
2.3 Μοριακές μέθοδοι.....	44
2.3.1 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	44
2.3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές cDNA	45
2.3.3 Μεταλλαξιγένεση με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων.	51
2.3.4 Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του DNA	54

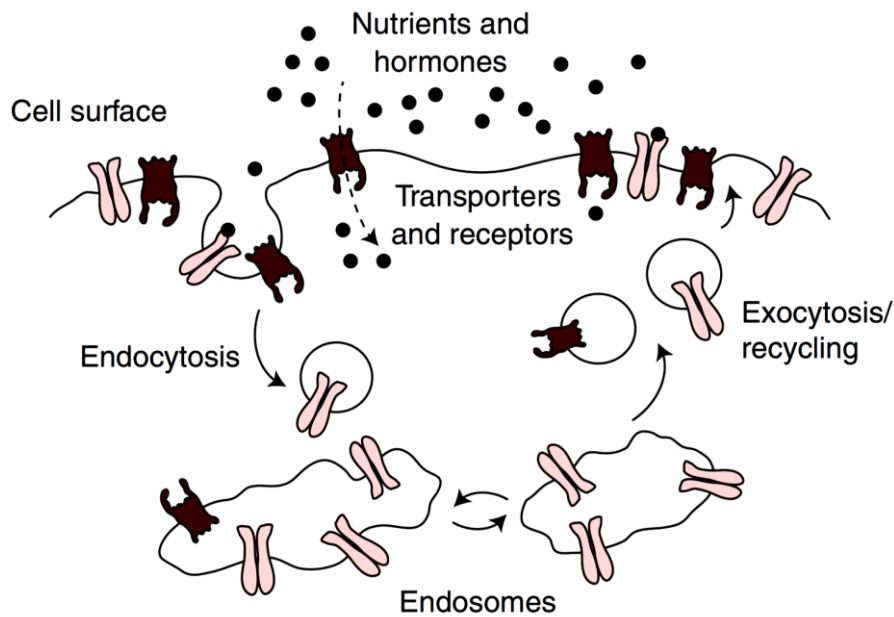
2.4 Βιοχημικές μέθοδοι.....	55
2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	55
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (Western blotting)	55
2.4.4 Δοκιμασία προσδιορισμού της αποικοδόμησης του VEGFR2	56
2.4.5 Παρασκευή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με πρόσδεμα GST ή His.....	57
2.4.6 Δοκιμασία της <i>in vitro</i> ομοτυπικής σύντηξης πρώιμων ενδοσωμάτων.....	59
2.4.7 Δοκιμασία μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της ACAT2.....	61
2.4.8 Δοκιμασία <i>in vitro</i> ακετυλίωσης της ανασυνδυασμένης Rab5-GDP και ταυτοποίηση της με φασματομετρία μάζας.....	61
2.4.9 Δοκιμασία ελέγχου της εξειδίκευσης της <i>in vitro</i> αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ACAT2 και Rab5-GDP/ Rab27a-GDP	62
2.4.10 Δοκιμασία της <i>in vitro</i> στρατολόγησης της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα ...	64
2.5 Μορφολογικές μέθοδοι.....	65
2.5.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	65
2.5.2 Μελέτη της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2 με <i>in vivo</i> δοκιμασία.....	65
2.5.3 Συνεστιακή μικροσκοπία.....	66
2.5.4 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση	66
2.6 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry, ITC).....	67
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
3.1 Δημιουργία μοριακών εργαλείων για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2.	71
3.2 Έλεγχος λειτουργικότητας των μοριακών εργαλείων	77
3.2.1 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της θειολάσης της ACAT2 και του ανενεργού μεταλλάγματός της, ACAT2 C92A	77
3.2.2 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Rab5 και ACAT2	81
3.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2, <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	83
3.3.1 Ημιοσοτικός προσδιορισμός της <i>in vitro</i> αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανασυνδυασμένων Rab5 και ACAT2.....	83
3.3.2 Ποσοτικοποίηση της ισχύος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Rab5-GDP και ACAT2 με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (isothermal titration calorimetry, ITC)	86
3.3.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Rab5 και ACAT2 <i>in vivo</i>	90

3.4	Μελέτη της λειτουργικής σημασίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2.....	109
3.4.1	Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στο ενδοσωματικό σύστημα <i>in vivo</i>	109
3.4.2	Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στο λυσοσωματικό σύστημα <i>in vivo</i>	113
3.4.3	Έλεγχος του ρόλου της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων	116
3.4.4	Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στην σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων ...	118
3.4.5	Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στην Rab5-διαμεσολαβούμενη στρατολόγηση της EEA1 στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων.....	128
3.5	Η Rab5 ακετυλίωεται από την ACAT2 <i>in vitro</i>	131
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	135
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	147
	SUMMARY.....	151
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	155

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ενδοκυττάρωση

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί την επιφάνεια επικοινωνίας μεταξύ κυττάρου και του περιβάλλοντός του. Τα κύτταρα ελέγχουν το σύνολο των μεμβρανικών υποδοχέων, μεταφορέων, καναλιών, λιπιδίων και άλλων συστατικών της μεμβράνης προκειμένου να επιτελέσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, όπως την σύνθεση του εξωκυττάρου υποστρώματος, την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, της επικοινωνίας με το εξωκυττάριο περιβάλλον και την ρύθμιση της ανάπτυξής τους. Η εξωκυττάρωση/έκκριση, δηλαδή η μεταφορά των νεοσυντιθέμενων ή ανακυκλημένων μορίων από το δίκτυο trans-Golgi (trans-Golgi network, TGN) και τα ενδοσώματα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, και η ενδοκυττάρωση, δηλαδή η εσωτερίκευση φορτίου, το οποίο οδηγείται στα πρώιμα ενδοσώματα (early endosomes, EEs) όπου καθορίζεται η στόχευση του σε άλλα τμήματα του κυττάρου, είναι δύο συμπληρωματικές οδοί κυστιδιακής διακίνησης, υπεύθυνες για την διατήρηση της σύστασης της μεμβράνης και της ομοιόστασης του κυττάρου² (εικόνα 1.1). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν την ενδοκυττάρωση προκειμένου να εσωτερικεύσουν τμήματα της μεμβράνης και μεμβρανικούς υποδοχείς, καθώς και ποικίλα διαλυτά μόρια του εξωκυττάρου περιβάλλοντος (συμπεριλαμβανομένων και των θρεπτικών ουσιών). Η ενδοκυττάρωση ξεκινά από τη κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως μεταφορείς αμινοξέων ή υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, εισέρχονται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, τα οποία αποκόπτονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα. Η μετέπειτα τύχη αυτών των ενδοκυτταρωμένων πρωτεϊνών καθορίζεται στο ενδοσωματικό σύστημα³.

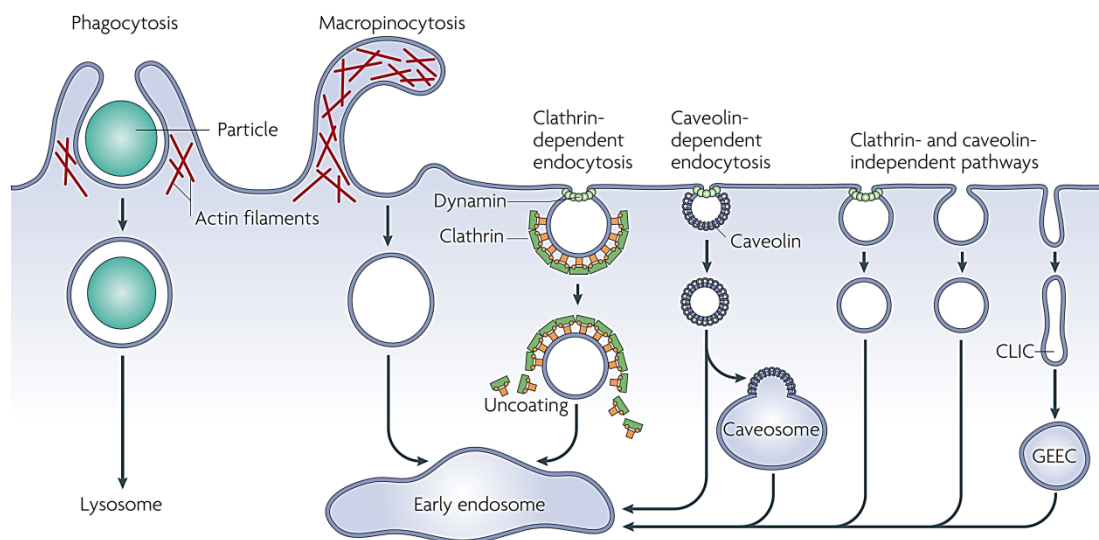


Εικόνα 1.1: Δυναμική ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύστασης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Η ποσοστιαία σύσταση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ εξωκυττάρωσης ή ανακύκλησης κυστιδίων, που περιέχουν πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, και ενδοκυττάρωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας. Αλλαγές στον ρυθμό εξωκυττάρωσης ή/και ενδοκυττάρωσης μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση της πρωτεϊνικής σύστασης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου⁴.

1.1.1 Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης

Η ενδοκυττάρωση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από πολλαπλές οδούς, μέσω των οποίων τα μόρια μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο. Το πιο καλά χαρακτηρισμένο μονοπάτι είναι η ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης, μια οδός που εμπλέκεται στην εσωτερίκευση και ανακύκληση υποδοχέων από ενδοκυτταρικά κυστίδια καλυμμένα με την πρωτεΐνη κλαθρίνη⁵. Μια ακόμα οδός είναι η ενδοκυττάρωση μέσω της πρωτεΐνης καβεολίνης (caveolin), που αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό δομικό συστατικό περιοχών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που είναι γνωστές ως «λιπιδιακές σχεδίες» (“lipid rafts”)^{6,7}. Οι «λιπιδιακές σχεδίες» λειτουργούν ως κέντρο διαμερισματοποίησης της κυτταρικής σηματοδότησης⁸. Και στις δυο περιπτώσεις τα κυστίδια ξεκινούν σαν εσοχές/εγκολπώσεις caveolae και κλαθρίνης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η επακόλουθη αποκοπή αυτών των εγκολπώσεων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, και κατά συνέπεια η ενδοκυττάρωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται εκεί, ελέγχεται από

την πρωτεΐνη δυναμίνη (dynamin dependent endocytosis). Ωστόσο, τα caveolae μπορούν, πέρα από το να ενδοκυτταρωθούν, να μετατραπούν σε επίπεδες περιοχές της μεμβράνης, απορροφώντας έτσι σημαντικό μέρος της μηχανικής τάσης της μεμβράνης⁹. Τέλος, δύο ακόμα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης ανεξάρτητα από κλαθρίνη, είναι η φαγοκυττάρωση και η μακροπinoκυττάρωση. Και οι δύο αυτές κατηγορίες ενδοκυττάρωσης αφορούν την εσωτερίκευση μεγάλων όγκων εξωκυτταρικού φορτίου που ελέγχεται κυρίως από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (πχ πολυμερισμός ακτίνης) και είναι ανεξάρτητη της δυναμίνης¹⁰⁻¹³ (εικόνα 1.2).

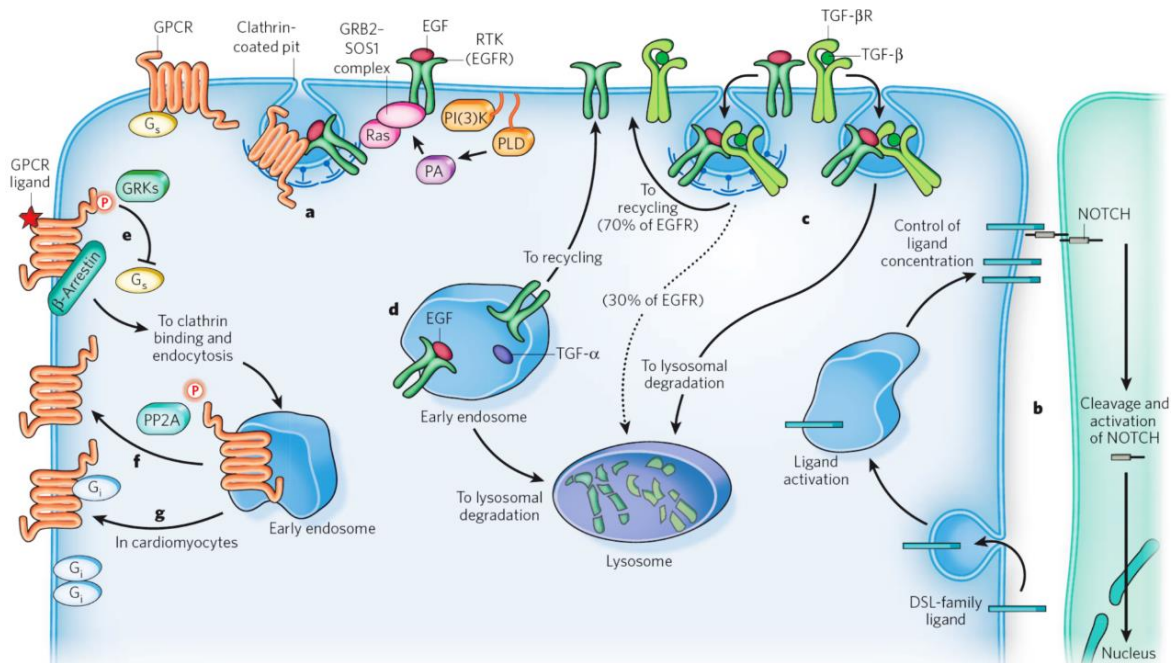


Εικόνα 1.2: Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης. Η ενδοκυττάρωση μεγάλων εξωκυτταρικών σωματιδίων πραγματοποιείται μέσω της φαγοκυττάρωσης, ενώ η πρόσληψη εξωκυτταρικού υγρού πραγματοποιείται μέσω μακροπinoκυττάρωσης (fluid phase endocytosis). Και οι δύο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν μετά από αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης του κυτταροσκελετού της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα περισσότερα εσωτερικευμένα φορτία καταλήγουν στα πρώιμα ενδοσώματα, είτε μέσω των κυστιδίων εξαρτώμενων από κλαθρίνη ή καβεολίνη είτε μέσω ενδιάμεσων κυστιδίων, που είναι ανεξάρτητα από τις πρωτεΐνες κλαθρίνη και δυναμίνη, γνωστά ως CLICs (clathrin and dynamin independent carriers), που επίσης προέρχονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδιάμεσος σταθμός πριν την είσοδο του εξωκυττάρου φορτίου στα ενδοσώματα αποτελεί το διαμέρισμα GEEC (πρώιμα ενδοσώματα που είναι πλούσια σε GPI-αγκυροβολημένες πρωτεΐνες, glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartment)¹².

1.1.2 Ενδοκυττάρωση και ρύθμιση της σηματοδότησης

Οι υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης «προσλαμβάνουν» τα εξωκυττάρια σήματα και τα «μεταβιβάζουν» στο εσωτερικό του κυττάρου, πυροδοτώντας μια σηματοδοτική ακολουθία η οποία ρυθμίζει τις κυτταρικές λειτουργίες. Η σύνδεση των εξωκυττάρων προσδετών στους υποδοχείς προκαλεί την μεταφορά του συμπλόκου προσδέτη/υποδοχέα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω του μηχανισμού της ενδοκυττάρωσης, όπως για παράδειγμα των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (G-Protein Coupled Receptors, GPCRs) και των υποδοχέων τυροσίνης-κινάσης (receptor tyrosine kinases, RTKs)^{14,15}.

Η ενδοκυττάρωση ελέγχει την σηματοδότηση σε διάφορα επίπεδα. Αρχικά, η δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα επάγει την ενδοκυττάρωσή του, άρα και την μετακίνησή του από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Για ορισμένους υποδοχείς, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έντασης και της διάρκειας του σήματος¹⁶. Σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή του σήματος παίζει και η μετέπειτα τύχη των υποδοχέων, καθώς μετά την εσωτερίκευσή τους, οι υποδοχείς μπορούν είτε να οδηγηθούν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, είτε να ανακυκληθούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη^{5,17,18} (εικόνα 1.3). Ενώ στην πρώτη περίπτωση συμβαίνει λήξη της σηματοδότησης, στην δεύτερη περίπτωση η σηματοδότηση παρατείνεται, αν φυσικά ο προσδέτης είναι διαθέσιμος. Εφόσον η αποικοδόμηση και η ανακύκλιση ενός υποδοχέα μπορούν να συμβαίνουν παράλληλα, η ισορροπία μεταξύ των δύο διαδικασιών μπορεί να καθορίσει το βιολογικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης⁵. Επιπλέον, καθώς οι υποδοχείς εισέρχονται στο κύτταρο, μεταφέρονται σε μία σειρά από ποικιλόμορφα κυστίδια, τα ενδοσώματα, τα οποία λειτουργούν ως σταθμός διαλογής για την ενδοκυττάρωση¹⁹. Την τελευταία δεκαετία, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ενδοσώματα δεν μεταφέρουν απλά την «πληροφορία» από την επιφάνεια του κυττάρου στο εσωτερικό του, αλλά ενορχηστρώνουν χώρο-χρονικά την σηματοδότηση, συμβάλλοντας στον ακριβή έλεγχο της²⁰⁻²².



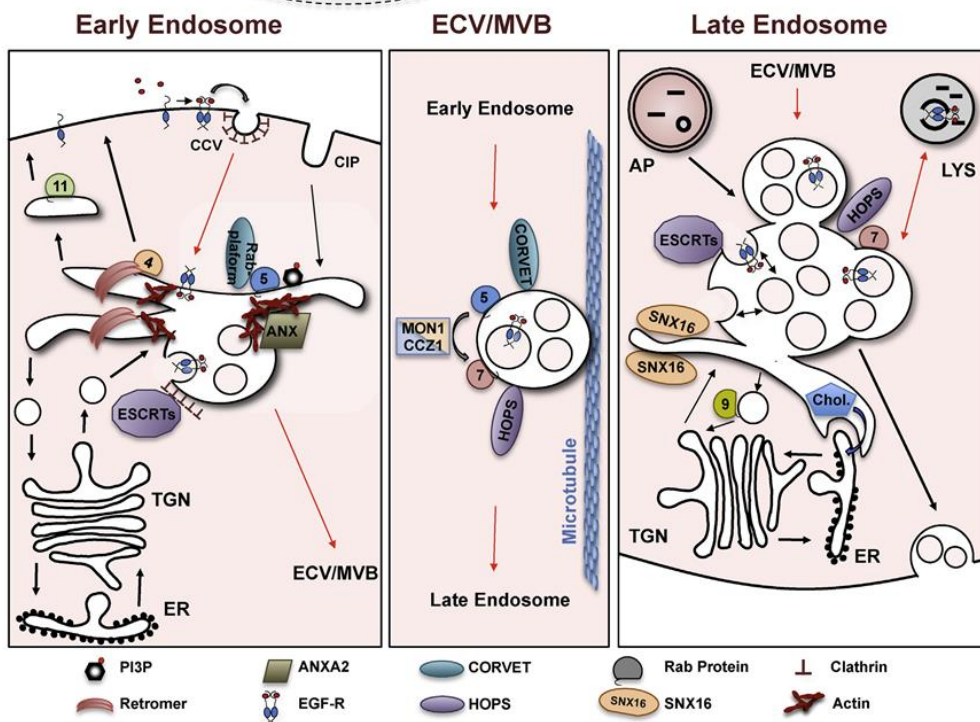
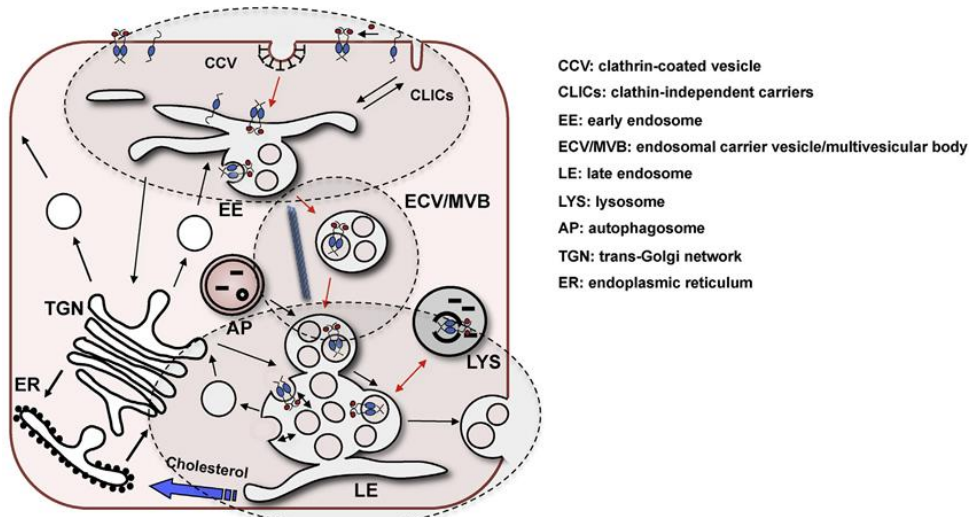
Εικόνα 1.3: Η ενδοκυττάρωση ρυθμίζει την κυτταρική σηματοδότηση. Υπάρχουν διάφορα επίπεδα στα οποία η ενδοκυττάρωση ρυθμίζει την σηματοδότηση υποδοχέων. Η απομάκρυνση των ενεργοποιημένων από προσδέτη υποδοχέων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω του εξαρτώμενου από κλαθρίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης, εξασθενεί το σήμα (GPCRs & RTKs) (a). Σε άλλες περιπτώσεις η ενδοκυττάρωση ενεργοποιεί τους προσδέτες και αυξάνει την συγκέντρωσή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Delta/Serrate/Lag2 προσδέτες και οι υποδοχείς της οικογένειας των NOTCH) (b). Επιπλέον, η ενδοκυττάρια οδός, την οποία ακολουθούν οι υποδοχείς, ρυθμίζει την σηματοδότηση. Οι υποδοχείς, μετά την ενεργοποίησή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, εισέρχονται σε κυστίδια του μονοπατιού που εξαρτάται από κλαθρίνη είτε του μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο από κλαθρίνη (c) Στη συνέχεια, τα κυστίδια συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα όπου πραγματοποιείται διαλογή των υποδοχέων, οι οποίοι μπορούν είτε να επιστρέψουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε να οδηγηθούν στα λυσοσώματα για πρωτεόλυση (d-g). Η πρωτεόλυση των υποδοχέων προκαλεί παύση της σηματοδότησης⁵.

1.2 Οργάνωση του ενδοσωματικού συστήματος

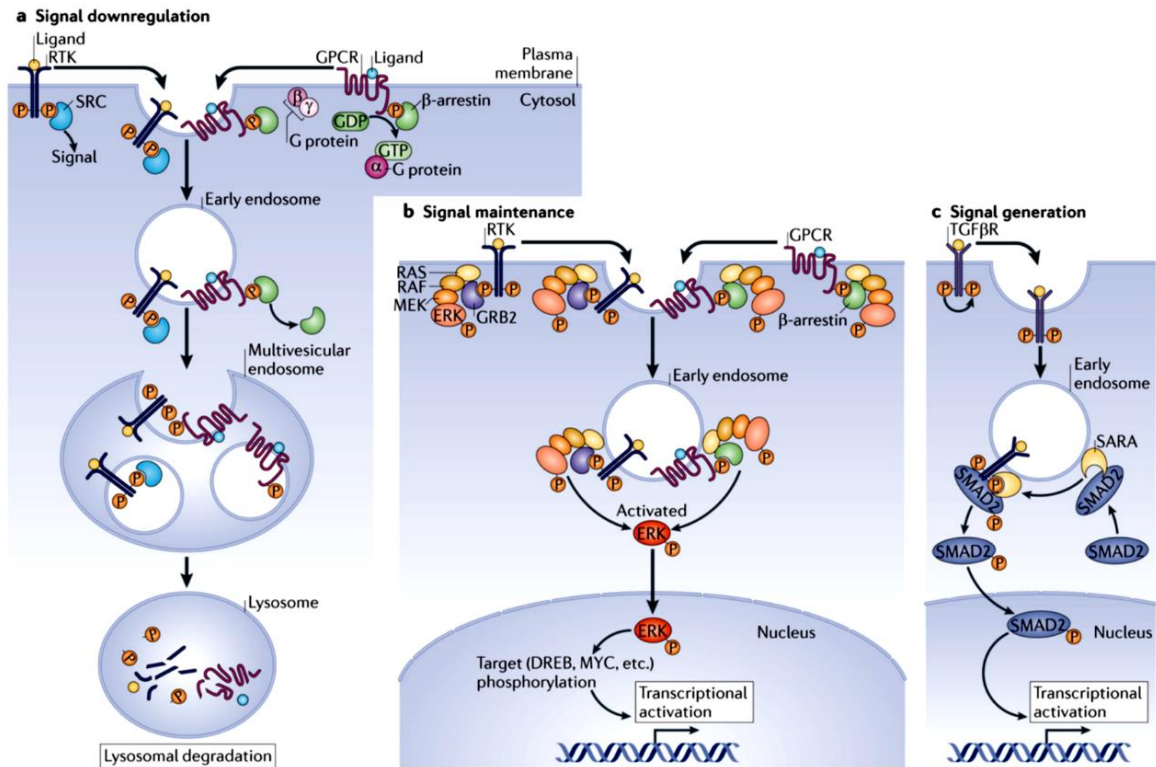
Το ενδοσωματικό σύστημα αποτελεί ένα διασυνδεδεμένο και δυναμικό δίκτυο οργανιδίων, τα οποία εκτός από βιοχημικά, διαφέρουν και ως προς τον εντοπισμό τους στο κύτταρο, και ρυθμίζουν την διάρκεια, την ένταση και την ειδικότητα της μεταγωγής του σήματος^{22,23}. Μόρια που εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης εξαρτώμενης ή ανεξάρτητης από κλαθρίνη, φτάνουν στο πρώιμο ενδόσωμα όπου γίνεται η διαλογή τους. Από εκεί είτε θα οδηγηθούν προς τα όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα για αποικοδόμηση, είτε θα ανακυκλωθούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω των περικεντρικών ενδοσωμάτων ανακύκλησης (εικόνα 1.4). Επιπλέον, πρώιμα και όψιμα

ενδοσώματα ανταλλάσσουν φορτίο με το trans-Golgi δίκτυο. Η πολυπλοκότητα των διαδρομών της ενδοκυττάρωσης σημαίνει ότι κάθε είδος μεταφορικού κυστιδίου διαθέτει μια διαφορετική ομάδα μορίων, όπως μεμβρανικά λιπίδια, μικρές GTPases (Rabs, ARF και Rho GTPases), πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (ακτίνη και τουμπουλίνη), κινητήριες πρωτεΐνες, παράγοντες κυστιδιακής σχάσης και σύντηξης. Η διαφορετική πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύσταση των κυστιδίων του ενδοσωματικού συστήματος προσδίδει στα κυστίδια λειτουργική εξειδίκευση η οποία συμβάλλει στην διαφορική κυστιδιακή διακίνηση²³⁻²⁶.

Τα ενδοσώματα, εκτός από το να ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια διακίνηση των υποδοχέων, αποτελούν και ένα κέντρο διαμερισματοποίησης, οργάνωσης και ελέγχου της κυτταρικής σηματοδότησης (εικόνα 1.5). Ο εντοπισμός των υποδοχέων στους διαφορετικούς τύπους ενδοσωμάτων καθορίζει την εξειδίκευση της σηματοδότησης, καθώς επιτρέπει την ειδική αλληλεπίδραση των υποδοχέων με σηματοδοτικά μόρια τα οποία εντοπίζονται σε εξειδικευμένα ενδοσώματα, και κατ' επέκταση την διαφορική γονιδιακή έκφραση. Για παράδειγμα, υπάρχουν τα SARA-ενδοσώματα, τα οποία εμπλέκονται στην σηματοδότηση του TGFβ υποδοχέα, και τα APPL-ενδοσώματα, τα οποία εμπλέκονται στην σηματοδότηση των RTKs¹⁶. Επιπλέον, τα ενδοσώματα μπορούν να λειτουργήσουν ως ενδιάμεσοι σταθμοί μεταγωγής σήματος μεταξύ κυτταροπλασματικής μεμβράνης και πυρήνα, όπως στην περίπτωση της EGF επαγόμενης σηματοδότησης όπου η APPL1 πρωτεΐνη μεταφέρεται από τα ενδοσώματα στον πυρήνα, και αλληλεπιδρά με παράγοντες αναδιαμόρφωσης του νουκλεοσώματος και με αποακετυλάσες ιστονών, προκαλώντας αναδιοργάνωση της χρωματίνης και κατά συνέπεια της γονιδιακής έκφρασης^{27,28}. Επίσης, ο χρόνος παραμονής των υποδοχέων στα ενδοσώματα καθορίζει τη διάρκεια της σηματοδότησης καθώς ελέγχει την ενεργότητα των υποδοχέων και τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους με τα ενδοσωμικά σηματοδοτικά μόρια^{20,29-31}. Παράδειγμα, για την συνέχεια της κυτταρικής σηματοδότησης στα ενδοσώματα, αποτελούν οι RTKs (tyrosine kinase receptors) και ο TGFβ υποδοχέας, οι οποίοι παραμένουν ενωμένοι με τον προσδέτη τους και ενεργοποιούνται μόλις εισαχθούν στα ενδοσώματα, παραμένοντας έτσι ενεργοί³²⁻³⁵. Επιπλέον, έχουν βρεθεί ενδοσωματικές πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλουν στη διατήρηση της σηματοδότησης, όπως η p18 που χρησιμεύει ως άγκυρα για ένα ικρίωμα ενεργοποίησης της ERK και απαιτείται για αύξηση της φωσφορυλίωσης των ERK1/2³⁶.



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση της διαμερισματοποίησης και οργάνωσης του ενδοσωματικού συστήματος. Στην πάνω εικόνα παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση των διακριτών διαμερισμάτων του ενδοσωματικού συστήματος με άλλα οργάνια του κυττάρου. Στην κάτω εικόνα παρουσιάζονται σε μεγέθυνση το πρώιμο ενδόσωμα, το πολυκυστιδιακό σωματίο (MVB) και το όψιμο ενδόσωμα μαζί με μερικές από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που είναι χαρακτηριστικές για τα διαμερίσματα αυτά και διευκολύνουν την κυστιδιακή διακίνηση. Συνοπτικά η ενδοκυττάρωση του φορτίου ξεκινά με την εκβλάστηση ενός κυστιδίου (CCV, CLICs) από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το κυστίδιο συντήκεται με το πρώιμο ενδόσωμα (early endosome). Στη συνέχεια, είτε θα γίνει ανακύκλωση του φορτίου στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω ενδοσωμάτων που συμμετέχουν στην οδό ανακύκλωσης, είτε θα γίνει ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων και ωρίμανση τους προς όψιμα ενδοσώματα (MVB & late endosome), οδός που οδηγεί προς τα λυσοσώματα¹⁹.



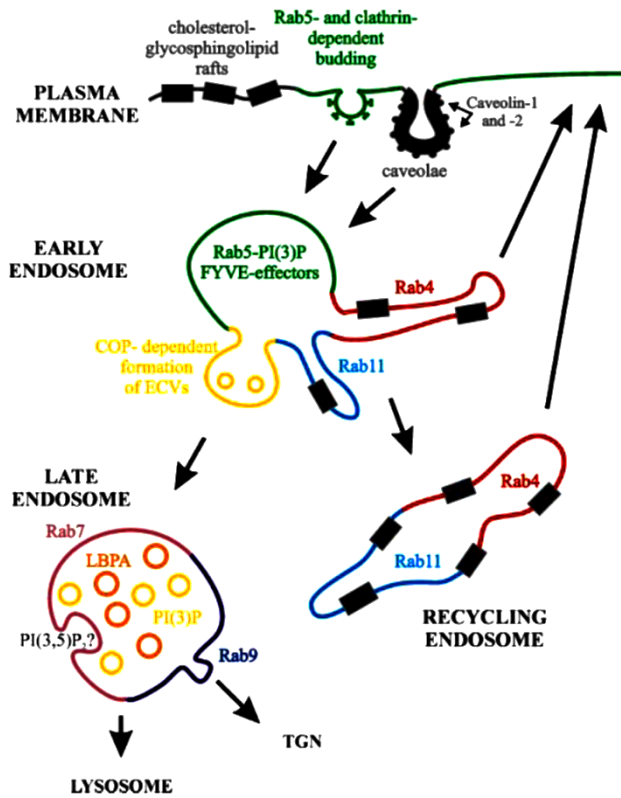
Εικόνα 1.5: Παραδείγματα διασύνδεσης της ενδοκυττάρωσης με την σηματοδότηση μέσω ενδοσωμάτων. (a) Τερματισμός της μεταγωγής σήματος μέσω μετακίνησης των υποδοχέων από τα ενδοσώματα προς το λυσοσωμικό μονοπάτι για αποικοδόμηση. (b) Συνέχεια της κυτταρικής σηματοδότησης καταρροϊκά των RTKs ή GPCRs μέσω ενεργοποίησης των ERKs από το ενδόσωμα. (c) Εξειδικευμένος τύπος ενδοσωμάτων (SARA-ενδοσώματα) εμπλέκεται στην σηματοδότηση του TGFβ υποδοχέα, που ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων στον πυρήνα³⁷.

1.2.1 Η οργάνωση των πρώιμων ενδοσωμάτων και ο ρόλος τους στην ενδοκυτταρική διακίνηση

Η εσωτερίκευση υποδοχέων, λιπιδίων, και εξωκυττάριου υλικού επιτυγχάνεται με ένα πλήθος ετερογενών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης. Πολλά από αυτά τα μόρια επιστρέφουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού ανακύκλησης ή οδηγούνται στα όσιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Συνεπώς, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να συγκλίνουν την ενδοκυττάρωση μέσω διαφορετικών μονοπατιών σε ένα κοινό σημείο ελέγχου της κυστιδιακής κυκλοφορίας, το οποίο δεν είναι άλλο από τα πρώιμα ενδοσώματα^{25,38,39}. Τα οργανίδια αυτά είναι το πρώτο τμήμα το οποίο δέχεται το ενδοκυτταρωμένο φορτίο και αποτελούν δυναμικές δομές οι οποίες έχουν την ικανότητα να υφίστανται ομοτυπική σύντηξη⁴⁰.

Τα πρώιμα ενδοσώματα χαρακτηρίζονται από περιοχές με διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία περιλαμβάνουν εκτεταμένες σωληνοειδής δομές (~60 nm διάμετρος), μεγάλα κυστίδια (~300-400 nm διάμετρος) και υποπεριοχές με εκτενείς μεμβρανικές εγκολλώσεις οι οποίες αποδίδουν ένα πολυκυστιδιακό φαινόμενο⁴¹. Αυτές οι μορφολογικά διακριτές περιοχές αποτελούν σημεία διαλογής και διαμερισματοποίησης των πρωτεϊνών από όπου καθορίζεται η μετέπειτα πορεία τους στο κύτταρο (ανακύκληση ή αποικοδόμηση). Γνωρίζουμε ότι, η βιογένεση των υπόλοιπων διαμερισμάτων της ενδοκυττάριας διακίνησης, όπως των ενδοσωμάτων ανακύκλησης, των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων, γίνεται από εξειδικευμένες υποπεριοχές του ίδιου πρώιμου ενδοσώματος (οι διακριτές μεμβρανικές περιοχές παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα στην εικόνα 1.6)^{3,19,23,25,42,43}.

Εκτός από τη μορφολογική ετερογένεια των τμημάτων του πρώιμου ενδοσώματος, σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνική διακίνηση παίζουν και τα βασικά συστατικά τα οποία συνθέτουν την ενδοσωματική μεμβράνη και την αρχιτεκτονική της^{41,44-46}. Η προσάραξη και σύντηξη κυστιδίων, προερχόμενα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη ή το δίκτυο trans Golgi, με τα πρώιμα ενδοσώματα ελέγχεται από μέλη της οικογένειας των SNAREs, οι οποίες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Η ομοτυπική σύντηξη των ενδοσωμάτων ελέγχεται από την μικρή GTPάση Rab5, της οικογένειας των Rabs, καθώς και από την Rabartin-5 και άλλους κυτταροπλασματικούς τελεστές της. Η Rab5 επίσης επάγει τον σχηματισμό τμημάτων πλούσιων σε λιπίδια PI3P, τα οποία είναι χαρακτηριστικά των πρώιμων ενδοσωμάτων⁴⁷⁻⁴⁹. Εκτός από τη Rab5, οι Rab4 και Rab11 αποτελούν επίσης κύριες πρωτεΐνες του πρώιμου ενδοσώματος. Ενώ η Rab5 οργανώνει την είσοδο των πρωτεϊνών στο πρώιμο ενδοσώμα, η Rab4 και η Rab11, που είναι υπεύθυνες για την ταχεία και αργή ανακύκληση, αντίστοιχα, ελέγχουν την κατανομή του πρωτεϊνικού φορτίου των ενδοσωμάτων στις περιοχές ανακύκλησης και ρυθμίζουν την έξοδο και επιστροφή των πρωτεϊνών αυτών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα 1.6). Αντίθετα, η προοδευτική απομάκρυνση της Rab5, από τις περιοχές με πολυκυστιδιακή μορφολογία στο πρώιμο ενδοσώμα, και η ενσωμάτωση της Rab7, οδηγούν στη σταδιακή δημιουργία του όψιμου ενδοσώματος και τη μετάβαση των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση μέσω σύντηξης του όψιμου ενδοσώματος με τα λυσοσώματα^{3,39,50,51}. Μια ακόμα χαρακτηριστική πρωτεΐνη των πρώιμων ενδοσωμάτων είναι η EEA1, η οποία συνδέεται με το λιπίδιο PI3P και παίζει σημαντικό ρόλο στην προσάραξη και σύντηξη των ενδοσωμάτων⁵²⁻⁵⁵.



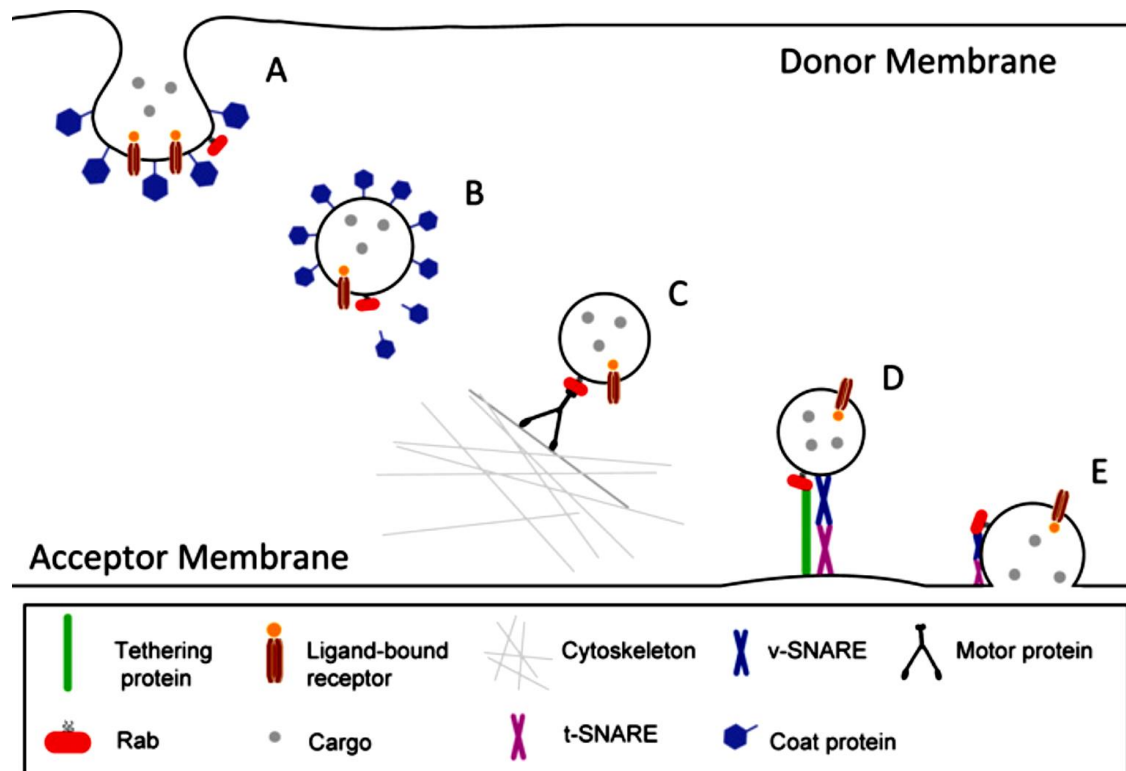
Εικόνα 1.6: Μοντέλο οργάνωσης των πρώιμων ενδοκυτταρικών κυστιδίων ως μωσαϊκό μεμβρανικών περιοχών. Η κατανομή των περιοχών που εντοπίζονται οι τρεις Rab πρωτεΐνες, Rab4, Rab5 και Rab11 απεικονίζεται με κόκκινο, πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Η διαμερισματοποίηση επιτυγχάνεται με λειτουργικά δυναμικές ανακατατάξεις αυτών των περιοχών. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση των μονοπατιών της εσωτερίκευσης, της ανακύκλησης, ή/και της αποικοδόμησης. Το φορτίο εισέρχεται στο κύτταρο μέσω, κυρίως, δομών που περιέχουν Rab5. Η ταχεία ανακύκληση επιτυγχάνεται με ταχεία διαλογή από Rab5 σε Rab4-θετικές περιοχές στο ίδιο ενδόσωμα. Η ανακύκληση επιβραδύνεται μόλις το φορτίο εισέλθει σε περικεντρικές μεμβρανικές δομές που κυριαρχούνται από Rab4 και Rab11. Η αποικοδόμηση του φορτίου επιτυγχάνεται με

προοδευτική απομάκρυνση της Rab5 από τις περιοχές με πολυκυστιαδική μορφολογία του πρώιμου ενδοσώματος και ενσωμάτωση της Rab7, οδηγώντας στη δημιουργία του όψιμου ενδοσώματος και τη μετάβαση του φορτίου προς αποικοδόμηση στα λυσοσώματα²³.

1.3 Ο ρόλος των RabGTPασών στην ενδοκυττάρωση

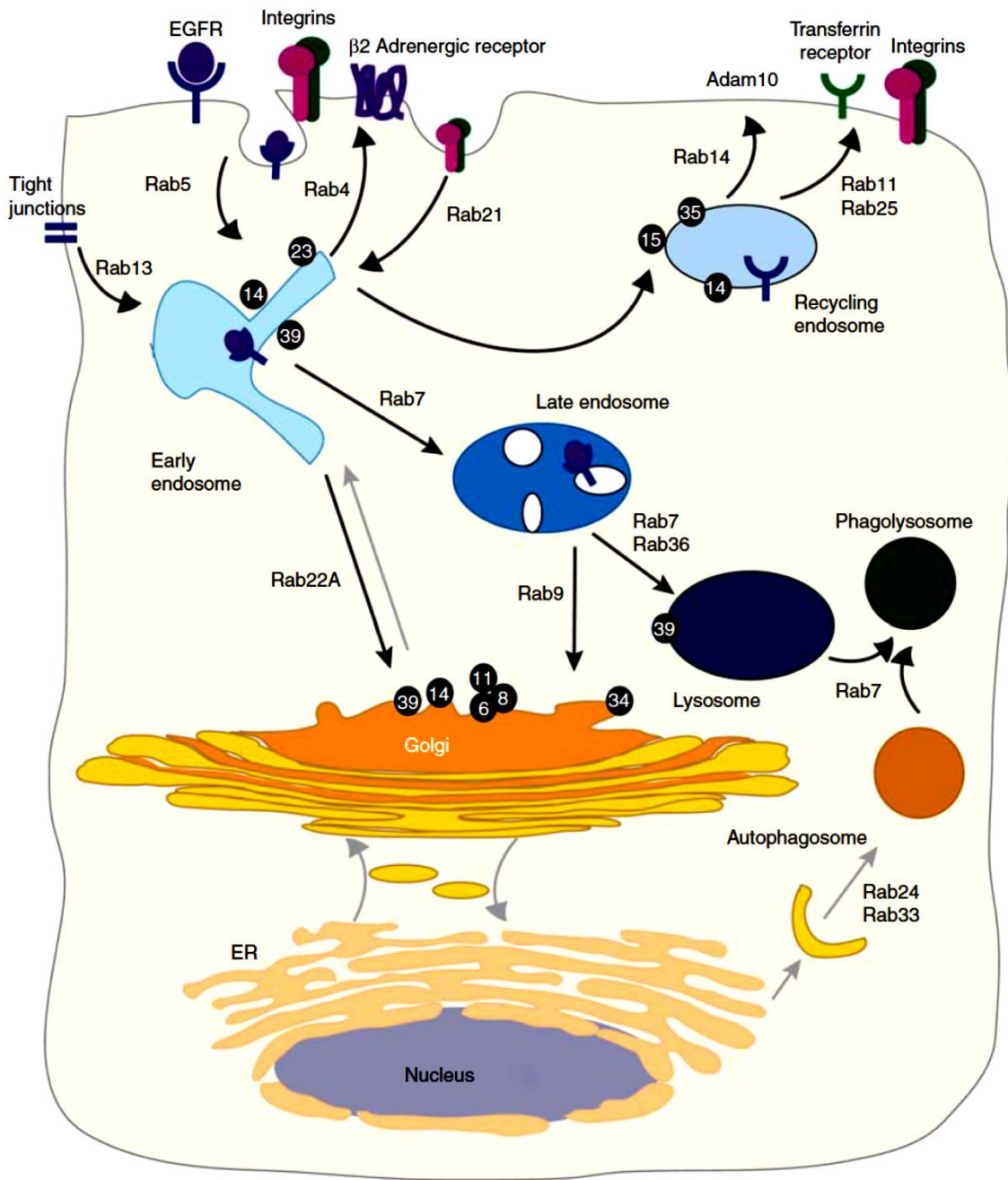
Όλα τα μονοπάτια μεμβρανικής διακίνησης μέσω κυστιδίων χαρακτηρίζονται από τα εξής κοινά στάδια: την εκβλάστηση των κυστιδίων, την μετακίνησή τους κατά μήκος του κυτταροσκελετού προς τον σωστό προορισμό, και την προσάραξη και σύντηξή τους με τη μεμβράνη στόχο⁵⁶. Η ενορχήστρωση και η ακρίβεια της κυστιδιακής διακίνησης προϋποθέτει την πολύπλοκη αλληλεπίδραση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, με κεντρικούς ρυθμιστές σε όλα τα παραπάνω τις Rab πρωτεΐνες. Οι Rabs αποτελούν τη μεγαλύτερη υποοικογένεια μικρών GTPασων της υπεροικογένειας των Ras πρωτεϊνών, αριθμώντας στον άνθρωπο περίπου 70 μέλη⁵⁷. Έχουν διακριτή ενδοκυττάρια κατανομή και εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια σχεδόν όλων των γνωστών μεμβρανικών δομών του κυττάρου⁵⁸. Διαθέτουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τα νουκλεοτίδια GTP και GDP και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, εναλλάσσοντας την νουκλεοτιδική τους κατάσταση μεταξύ μιας ενεργής (Rab:GTP) και μιας ανενεργής (Rab:GDP) κατάστασης, γεγονός που οδηγεί στην αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής τους και κατ' επέκταση στην

αναγνώρισή τους από διαφορετικές πρωτεΐνες⁵⁹. Οι RabGTPασες ρυθμίζουν γεγονότα διαλογής φορτίου, εκβλάστησης, ελλιμενισμού και σύντηξης κυστιδίων, επάγοντας την στρατολόγηση ποικίλων τελεστών (effectors) στις αντίστοιχες μεμβράνες στόχους, και διευκολύνοντας την συγκρότηση των SNARE πρωτεϊνικών συμπλόκων κατά τα γεγονότα κυστιδιακής σύντηξης^{57,59} (Εικόνα 1.7).

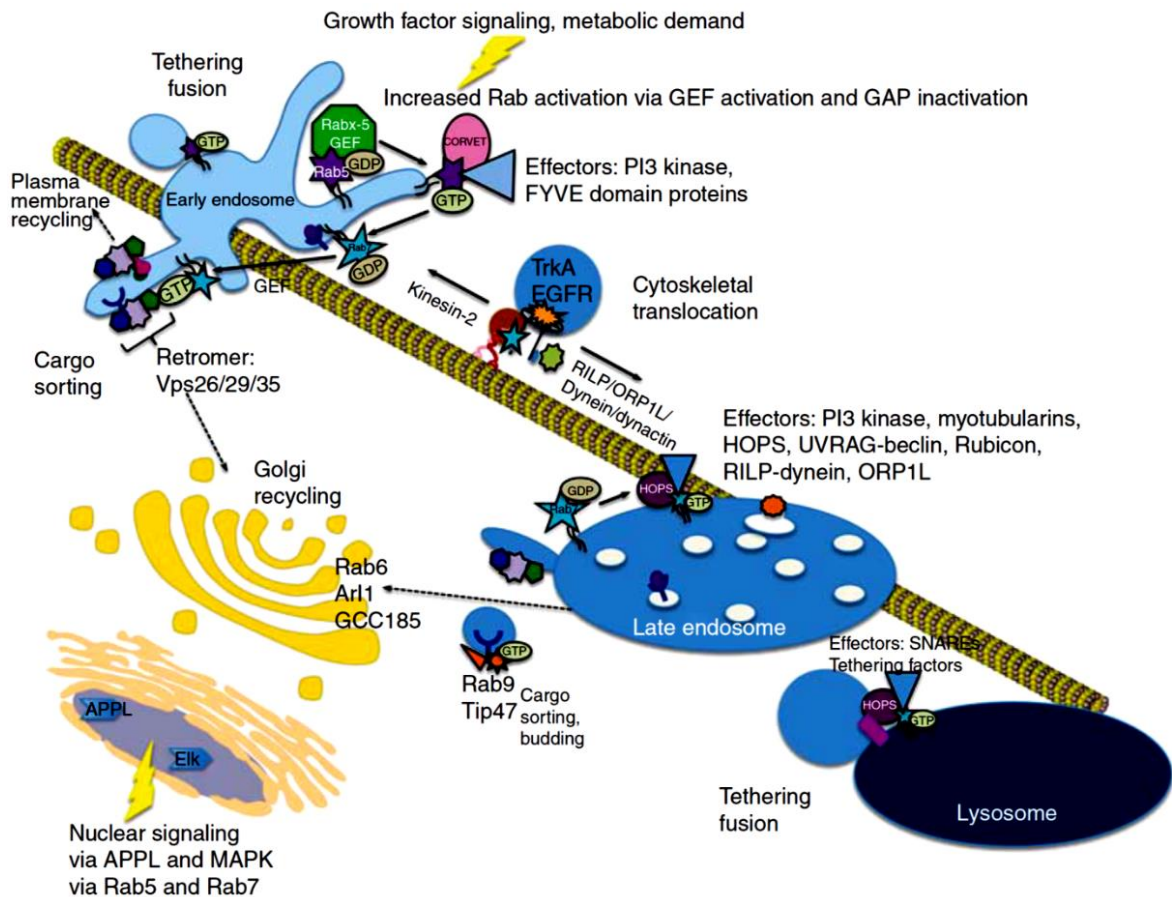


Εικόνα 1.7: Τα διαφορετικά στάδια κυστιδιακής διακίνησης ελέγχονται από πρωτεΐνες Rab. (A) Δημιουργία καλύμματος και εκκόλαψη του κυστιδίου: Οι Rabs κατευθύνουν τη συναρμολόγηση πρωτεϊνικού καλύμματος στην εξωτερική επιφάνεια της εσοχής που έχει δημιουργηθεί στη μεμβράνη δότη, διευκολύνοντας έτσι τη διαδικασία εκβλάστησης του δημιουργούμενου κυστιδίου. (B) Αφαίρεση του καλύμματος: Οι Rabs ελέγχουν την απομάκρυνση των πρωτεϊνών καλύμματος από το νεοσυντιθέμενο κυστίδιο ώστε να διευκολυνθεί η σύντηξή του με τη μεμβράνη στόχο. (Γ) Μετακίνηση: Για την μετακίνηση του κυστιδίου, οι Rabs αλληλεπιδρούν άμεσα και έμμεσα με κινητήριες πρωτεΐνες που μετακινούνται ενεργά κατά μήκος του κυτταροσκελετού. (Δ) Προσάραξη: Οι Rabs αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα πρωτεϊνών μεμβρανικής σύντηξης στη μεμβράνη στόχο, και το κυστίδιο αγκυροβολείται στην μεμβράνη. (Ε) Σύντηξη: Οι Rabs παίζουν ρόλο στη σύντηξη των μεμβρανών ρυθμίζοντας τη λειτουργία των πρωτεϊνών SNARE⁵⁷.

Έχουν βρεθεί αρκετές Rabs οι οποίες εντοπίζονται στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι, και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διακίνηση του εσωτερικευμένου φορτίου, όπως οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς. Η διαφορετική μεμβρανική κατανομή των Rabs στην ενδοκυττάρια οδό έχει ως επακόλουθο την διαμερισματοποίηση της κυστιδιακής διακίνησης σε πρώιμο, όψιμο και μονοπάτι ανακύκλωσης φορτίου, καθώς και στο λυσοσωματικό μονοπάτι (αποικοδόμηση φορτίου). Έτσι, η Rab5 προωθεί την εσωτερίκευση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και στη συνέχεια στα πρώιμα ενδοσώματα^{52,60}, ενώ η Rab4 ελέγχει την ανακύκλωση των υποδοχέων απευθείας στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα 1.8). Ακόμη, η Rab11 βρίσκεται στα ενδοσώματα ανακύκλωσης και ελέγχει την επιστροφή των υποδοχέων στη μεμβράνη από αυτό το κυτταρικό διαμέρισμα, ενώ η Rab9 ελέγχει την κυστιδιακή διακίνηση μεταξύ όψιμων ενδοσωμάτων και του trans-Golgi δικτύου (trans-Golgi network, TGN)^{61,62}. Από την άλλη, για την μετακίνηση των κυστιδίων προς τα όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα κεντρικό ρόλο παίζει η Rab7^{38,40}. Τέλος, η σωστή ρύθμιση της ενδοκυττάριας μεταφοράς και της κυτταρικής σηματοδότησης βασίζεται στη χωροχρονική ρύθμιση της λειτουργίας αυτών των Rabs και στην αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες-τελεστές (effectors). Για παράδειγμα, καταρράκτες διαδοχικών ενεργοποιήσεων των Rab5/Rab7, και των αντίστοιχων τελεστών τους, συμβάλουν στην συντονισμένη αναδιαμόρφωση του ενδοσωματικού συστήματος κατά τη διάρκεια της προώθησης του φορτίου από τα πρώιμα προς τα όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα^{63,64} (εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.8: Ανασκόπηση των Rab GTPασων στην ενδοκυτταρική οδό. Οι Rab GTPases συμμετέχουν στην ενδοκυττάρωση και μετακίνηση προς αποικοδόμηση, καθώς και ανακύκλωση στη μεμβράνη και στο Golgi.⁶⁵

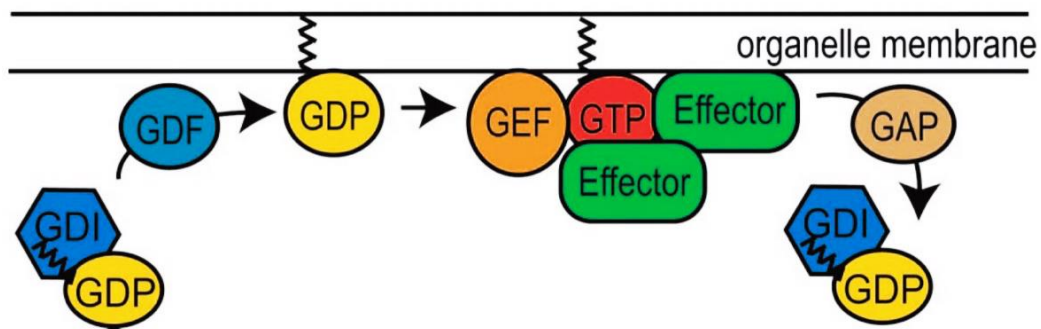


Εικόνα 1.9: Ο ρόλος Rab GTPασων σε γεγονότα μεμβρανικής διακίνησης και σηματοδότησης. Στην εικόνα παρουσιάζεται ο ρόλος των Rab GTPασων που συμμετέχουν στα πρώιμα στάδια της ενδοκυττάρωσης και σηματοδότησης. Μαζί με του τελεστές τους, οι Rabs ρυθμίζουν τη διαλογή του φορτίου, την εκβλάστηση των κυστιδίων, την μεμβρανική εξειδίκευση, την μετατόπιση κατά μήκος του κυτταροσκελετού, τον ελλιμενισμό και την σύντηξη των κυστιδίων. Οι Rab GTPασες αποκωδικοποιούν τα εξωκυττάρια σήματα έτσι ώστε να συντονίζουν τις φυσιολογικές και μεταβολικές λειτουργίες του κυττάρου⁶⁵.

1.3.1 Ο μηχανισμός μεμβρανικής ανακύκλισης των Rab πρωτεϊνών

Οι RabGTPασες λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες που εναλλάσσονται μεταξύ των διαμορφώσεων "on" και "off" που αντιστοιχούν στις διαμορφώσεις που προκύπτουν μετά από πρόσδεση του GTP ή GDP, αντίστοιχα. Οι Rabs προσδένοντας GDP βρίσκονται στην ανενεργό, ενώ προσδένοντας GTP στην ενεργό μορφή τους, σε αυτή δηλαδή που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες τελεστές. Η ανταλλαγή νουκλεοτιδίου είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον εντοπισμό τους μεταξύ κυτταροπλάσματος και μεμβράνης. Μετά την σύνθεσή τους, οι Rab πρωτεΐνες συνδέονται με την συνοδό πρωτεΐνη των Rab (REP) και

πρενυλιώνονται από το ένζυμο μεταφοράση II του γερανυλ γερανυλίου (geranylgeranyl transferase II – GGTaseII) στα κατάλοιπα κυστεΐνης του μοτίβου πρενυλίωσης στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η πρενυλιωμένες Rabs για να καταστούν διαλυτές στο κυτταρόπλασμα παραμένουν σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη GDI (GDP Dissociation Inhibitor), καθώς η δεύτερη προστατεύει τις υδρόφοβες γερανυλ-γερανύλ ομάδες από το υδρόφιλο κυτταρόπλασμα. Για την πρόσδεσή των Rabs στην μεμβράνη στόχο χρειάζεται ο παράγοντας εκτόπισης της GDI (GDF, displacement factor). Αφού λοιπόν οι Rabs αποδεσμευθούν από την GDI, ακολουθεί η ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου GDP με το GTP, μια διαδικασία που ελέγχεται από τους GEF παράγοντες (Guanine Nucleotide – exchange Factors). Στην ενεργό μορφή (GTP μορφή), οι Rabs αλληλεπιδρούν με κατάλληλες πρωτεΐνες – τελεστές, γεγονός που επιτρέπει τη μεταφορά των κυστιδίων προς τη σωστή κατεύθυνση, δηλαδή προς το οργανίδιο-προορισμό. Στη συνέχεια, η μετάβαση των Rabs από την ενεργή στην ανενεργή μορφή καταλύεται από τις πρωτεΐνες GAPs (GTPase Activating Proteins), οι οποίες επάγουν την ενεργότητα GTPάσης των Rabs προκαλώντας έτσι την υδρόλυση του GTP και την μετάβασή τους στην GDP-ανενεργή μορφή. Στη συνέχεια, οι Rabs εξάγονται από την μεμβράνη με την βοήθεια της πρωτεΐνης GDI και μεταφέρονται μαζί στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο, μέχρι να συνδεθούν ξανά με την μεμβράνη στόχο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.10, οι Rabs υπόκεινται σε διαδοχικούς κύκλους μεμβρανικής εισαγωγής και εξαγωγής, όπου στην ενεργή μορφή (GTP) βρίσκονται αποκλειστικά στην μεμβράνη, ενώ στην ανενεργή μορφή (GDP) βρίσκονται και στο κυτταρόπλασμα και στην μεμβράνη, λίγο πριν την ενεργοποίησή τους από τον αντίστοιχο GEF⁶⁶⁻⁷⁰.



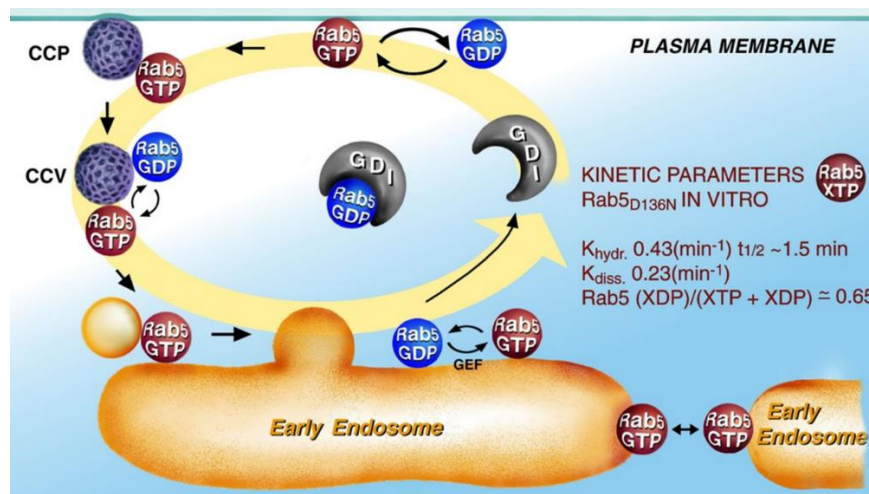
Εικόνα 1.10: Ο κύκλος δέσμευσης/αποδέσμευσης του νουκλεοτιδίου γουανίνης και της μεμβράνης στόχου των Rab πρωτεϊνών. Οι Rab πρωτεΐνες εναλλάσσονται μεταξύ της GTP ενεργούς διαμόρφωσης και της GDP ανενεργούς διαμόρφωσης, που ορίζονται εδώ ως κατάσταση ON και OFF, αντίστοιχα. Οι Rab GTPases υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή διαμόρφωση (OFF), που δεσμεύονται με την Rab-GDI. Μετά την αποδέσμευση από την Rab-GDI, που καταλύεται από τον παράγοντα GDI-Displacement (GDF), οι Rab πρωτεΐνες υφίστανται συνεχείς κύκλους ανταλλαγής νουκλεοτιδίων και υδρόλυσης. Η ανταλλαγή GDP / GTP νουκλεοτιδίων καταλύεται από τους GEF και η υδρόλυση του GTP στο σε GDP από τις GAP. Στην GTP διαμόρφωση, οι Rab πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με ένα σύνολο πρωτεϊνών τελεστών (π.χ. EEA1 και Rabartin-5 για την Rab5) που σταθεροποιούν την ενεργή κατάσταση (ON) και επιτελούν λειτουργίες μεμβρανικής διακίνησης, παρέχοντας δομική και λειτουργική εξειδίκευση στο οργανίδιο (εδώ πρώιμο ενδόσωμα). Μετά την υδρόλυση του GTP, η GDI διευκολύνει την αποδέσμευσή των Rabs τους από την μεμβράνη και την μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα¹.

1.4 Η μικρή GTPασης Rab5 και ο ρόλος της στην ενδοκυτταρωση και μεταγωγή σήματος.

Η μικρή GTPαση Rab5 είναι ο κύριος ρυθμιστής των πρώιμων σταδίων της ενδοκυττάρωσης σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στα πρώιμα ενδοσώματα και ρυθμίζει την μεταφορά των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων (clathrin-coated vesicles) από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα πρώιμα ενδοσώματα, την σύντηξη κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη (CCV) με τα πρώιμα ενδοσώματα, την ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων καθώς και την διακίνησή τους με την βοήθεια του κυτταροσκελετού (Εικόνα 1.11)⁷¹⁻⁷⁶. Η Rab5 λειτουργεί ως χρονοδιακόπτης της σύντηξης των ενδοκυτταρικών κυστιδίων και των πρώιμων ενδοσωμάτων, καθορίζει τον ρυθμό κυστιδιακής διακίνησης, και τον προορισμό, είτε προς το μονοπάτι της αποικοδόμησης είτε προς το μονοπάτι της ανακύκλησης^{74,77-79}. Η αγκυροβόληση της Rab5 στην μεμβράνη εξαρτάται από την προσθήκη μιας ομάδας ισοπρενοειδούς (πρενυλίωση) κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο των νεοσυντιθέμενων

μορίων της⁸⁰, αφού η μη πρενυλιωμένη Rab5 δεν συνδέεται σταθερά με τα λιπίδια της μεμβράνης και αποδεσμεύεται αμέσως στο κυτταρόπλασμα^{81,82}. Επιπλέον η σύνδεση της Rab5 με την μεμβράνη εξαρτάται από τον κύκλο υδρόλυσης του GTP. Έτσι, η GTP διαμόρφωσή της (ενεργή μορφή) βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των ενδοσωμάτων, καθώς και στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αντιθέτως, στην GDP διαμόρφωσή της (ανενεργή μορφή) εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με την Rab-GDI. Η Rab-GDI εξυπηρετεί την απελευθέρωση της Rab5-GDP από τις μεμβράνες, την διατήρηση της κυτταροπλασματικής Rab5 σε διαλυτή μορφή και την αποτελεσματική πρόσδεση της Rab5 στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων⁸³. Επιπρόσθετα, στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των ενδοσωμάτων το 50% της συνολικής Rab5 βρίσκεται στην ανανεργή μορφή (λίγο πριν την ενεργοποίησή της)⁷⁸.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Rab5 είναι ο κύριος ρυθμιστής της βιογένεσης του ενδοσωματικού, και κατ' επέκταση του λυσοσωματικού συστήματος. Συγκεκριμένα, η μείωση των επιπέδων έκφρασης της Rab5 σε ηπατικά κύτταρα, προκαλεί την μείωση του αριθμού των πρώιμων ενδοσωμάτων, και ακολούθως των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων, γεγονός που, στην περίπτωση των LDL υποδοχέων, παρεμποδίζει την ενδοκυττάρωση της LDL πρωτεΐνης⁴³.

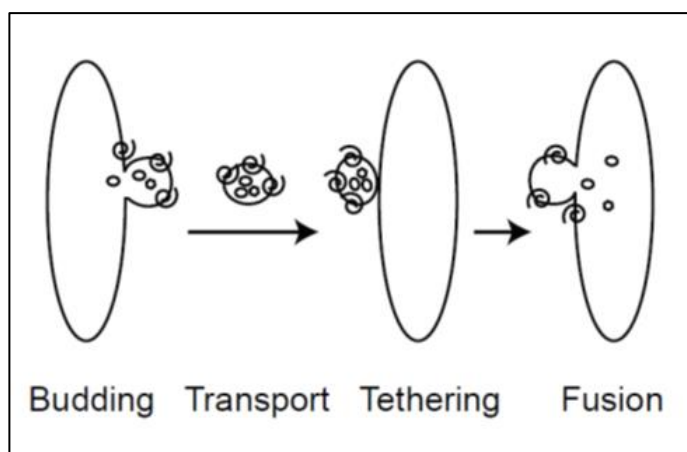


Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση ανακύκλισης της Rab5 από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη. Στην εικόνα φαίνεται ο εντοπισμός της Rab5 στο κύτταρο, ο ρυθμός ανακύκλισής της από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, καθώς και η σύντηξη των ενδοκυτταρικών κυστιδίων και των πρώιμων ενδοσωμάτων. (<http://zerial.mpi-cbg.de/multimedia/images/10>)

Λόγω των παραπάνω λειτουργιών της, η Rab5 είναι σημαντικός ρυθμιστής της μεταγωγής του σήματος. Για παράδειγμα, τα σηματοδοτικά μόρια μπορούν να ενεργοποιήσουν την Rab5 και την PI3-κινάση. Με την σειρά τους οι ενεργοποιημένες Rab5 και PI3-κινάση επάγουν την στρατολόγηση ή ενεργοποίηση κινητήριων πρωτεϊνών των μικροσωληνίσκων, ρυθμίζοντας την ενδοκυττάρια κατανομή των πρώιμων ενδοσωμάτων και ως εκ τούτου την μετακίνηση των σηματοδοτικών μορίων στο σωστό προορισμό τους^{20,70,84,85}. Επιπλέον η ενεργότητα της Rab5 παίζει σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης και ενδοκυττάρωσης υγρής φάσης (fluid-phase endocytosis)^{60,71,74,76,79,86}. Η υπερέκφραση του συνεχώς ενεργού (Rab5 Q79L) ή ανενεργού (Rab5 S34N) μεταλλάγματος της Rab5 επιταχύνει ή παρεμποδίζει, αντίστοιχα, την ενδοκυττάρωση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και ορμονών (π.χ. EGFR, LHR κτλ). Επιπλέον, η Rab5 παίζει σημαντικό ρόλο στην διακίνηση μεταγραφικών παραγόντων γονιδίων της γλυκονεογένεσης - όπως αυτού της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (glucose-6-phosphatase, G6Pase) - από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Βρέθηκε ότι σε ηπατικά κύτταρα, η έλλειψη της Rab5 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του ενζύμου G6Pase, προκαλώντας σημαντικές μεταβολικές διαταραχές (Εικόνα 1.12)⁸⁷. Τέλος, μείωση των επιπέδων της Rab5 σχετίζεται με την αδυναμία μετάθεσης των πρωτεϊνών από την κορυφαία πλευρά των ηπατικών κυττάρων στους χοληφόρους πόρους, υποδηλώνοντας την σημασία της Rab5 στη διακίνηση πολωμένου φορτίου⁴³.

1.4.1 Η αλληλεπίδρασή της Rab5 με τους τελεστές της (effectors)

Όπως περιγράφεται και σε προηγούμενη ενότητα, η μεμβρανική διακίνηση περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα, την εκβλάστηση, τη μετακίνηση, τον ελλιμενισμό και τη σύντηξη της μεμβράνης του κυστιδίου με την μεμβράνη στόχο (εικόνα 1.13).



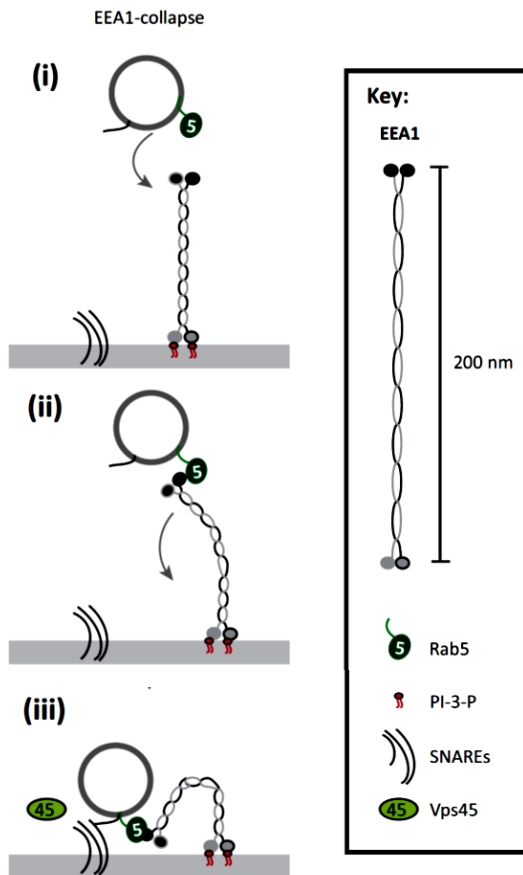
Οι παραπάνω διαδικασίες εκτελούνται από μία σειρά πρωτεϊνών -τελεστών (effectors) οι οποίοι δεσμεύονται ή

Εικόνα 1.13: Τα βήματα της κυστιδιακής διακίνησης: εκβλάστηση, μετακίνηση, ελλιμενισμός, σύντηξη.¹

αλληλεπιδρούν ειδικά με τις Rab GTPάσες, κυρίως στην ενεργή τους μορφή. Παρά την μεγάλη δομική ομοιότητα και τον υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των Rab GTPασων, έχουν βρεθεί πρωτεϊνικές περιοχές που παρουσιάζουν διαφορές στην δομή, και σε αυτές οφείλεται η λειτουργική εξειδίκευσή τους, καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με διαφορετικούς τελεστές⁶⁸. Ο αριθμός των τελεστών που ανακαλύπτονται για κάθε μια Rab πρωτεΐνη αυξάνεται ραγδαία, ενώ εκτιμάται ότι υπάρχουν έως και 30 διαφορετικοί τελεστές για την Rab5^{53,88}. Η Rab5 ελέγχει δύο γεγονότα σύντηξης μεμβρανών: την σύντηξη των προερχόμενων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη (CCV) με τα πρώιμα ενδοσώματα, και την ομοτυπική σύντηξη μεταξύ πρώιμων ενδοσωμάτων. Αρκετοί τελεστές της Rab5 απαιτούνται για την σύντηξη ενδοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένου της EEA1, του συμπλόκου Rabartin5-Rabex-5, της Rabenosyn-5 και της κινάσης της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης, hVPS34.

Η EEA1 (Early Endosome antigen-1), ένας από τους πιο γνωστούς και σημαντικούς τελεστές της Rab5, έχει δομή διμερούς σπειροειδούς έλικας (coiled-coil), δεσμεύεται στη 3-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PtdIns(3)-P) της μεμβράνης των πρώιμων ενδοσωμάτων και καθοδηγεί την μεταφορά κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα πρώιμα ενδοσώματα. Έχει βρεθεί ότι οι Rab5 και EEA1 αποτελούν τους ελάχιστους απαραίτητους παράγοντες για να επιτευχθεί η σύντηξη

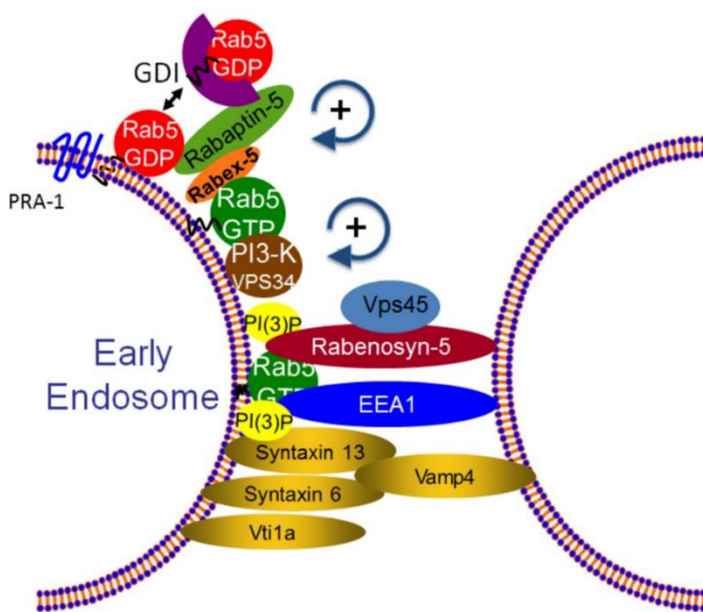
των ενδοσωμάτων σε *in vitro* συνθήκες⁵². Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, η Rab5-GTP της μεμβράνης των πρώιμων ενδοσωμάτων προκαλεί αλλοστερική αλλαγή στη διαμόρφωση της EEA1, από εκτεταμένη σε ευέλικτη, λειτουργώντας σαν ένα «λάσο» που συλλαμβάνει και «τραβάει» το δεσμευμένο κυστίδιο προς την μεμβράνη στόχο για σύντηξη (εικόνα 1.14)^{52,54,55,89-91}.



Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση της EEA1 μεσολαβούμενης πρόσδεσης και σύντηξης των πρώιμων ενδοσωμάτων. (i) Η EEA1 προσδένεται στο PI(3)P της μεμβράνης του ενδοσώματος. (ii) Η πρόσδεση της Rab5 στην απέναντι μεμβράνη προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της EEA1, από εκτεταμένη σε ευέλικτη, φέρνοντας το κυστίδιο πολύ κοντά στο ενδόσωμα, (iii) γεγονός που επιτρέπει την μεμβρανική σύντηξη μέσω των SNARE πρωτεϊνών⁹².

Για να επιτελέσει τις λειτουργίες της, η ενεργή Rab5 πρέπει να συνδεθεί τόσο στη μεμβράνη των ενδοκυτταρικών κυστιδίων όσο και στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Αρχικά, η πρόσδεση και σταθεροποίηση της Rab5 στην μεμβράνη στόχο περιλαμβάνει την ενεργοποίησή της μέσω του GEF της, δηλαδή της Rabex-5. Στη συνέχεια, η GTP-Rab5 είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με τους διάφορους τελεστές της, συμπεριλαμβανομένης της Rabartin5, η οποία με τη σειρά της συνδέεται με την Rabex5, αυξάνοντας την δραστηριότητα της δεύτερης για ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου της Rab5. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις δημιουργούν έναν βρόχο θετικής ανάδρασης, ο οποίος παρεμποδίζει την

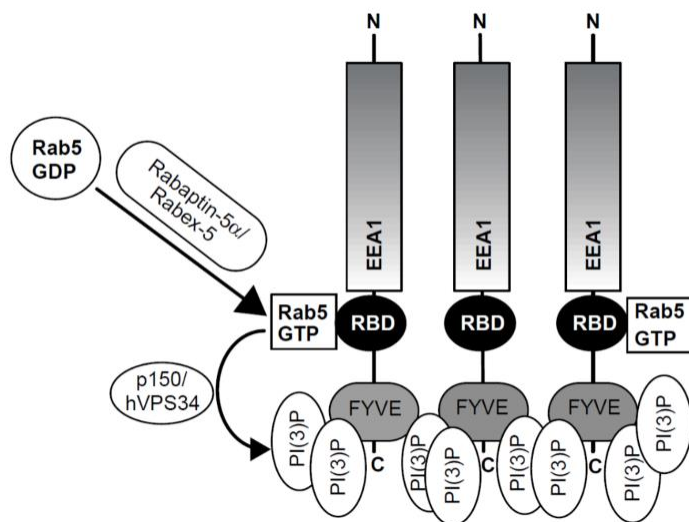
απενεργοποίηση της Rab5 μέσω GAP και την εξαγωγή της από την μεμβράνη μέσω GDI, διασφαλίζοντας έτσι ότι η Rab5 παραμένει στην GTP ενεργή διαμόρφωση και εξακολουθεί να είναι συνδεδεμένη με τα ενδοκυτταρικά κυστίδια ή τα πρώιμα ενδοσώματα^{49,91,93-95}. Τελεστής της Rab5 είναι και η Rabenosyn-5, η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με την ενεργή μορφή της Rab5 στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Η Rabenosyn-5 δεσμεύεται στη 3-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PtdIns(3)-P) της μεμβράνης των πρώιμων ενδοσωμάτων, και χρησιμεύει ως σύνδεσμος μεταξύ της Rab5 και της hVPS45, η οποία συμμετέχει στην ενεργοποίηση των SNARE πρωτεϊνών (Εικόνα 1.15)⁹⁶. Επιπλέον, μαζί με την EEA1 παίζει σημαντικό ρόλο στην σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Ένας ακόμα τελεστής της Rab5, η Rabankyrin-5, εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα και επάγει τόσο την ομοτυπική σύντηξη, όσο και την ετεροτυπική σύντηξη με τα κυστίδια κλαθρίνης. Πέραν όμως από τα πρώιμα ενδοσώματα, η Rabankyrin-5 εντοπίζεται και στα μακροπρινοσώματα σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, και σχετίζεται με την ενδοκυττάρωση υγρής φάσης (fluid phase endocytosis)⁹⁷.



Εικόνα 1.15: Οργάνωση της μεμβράνης από την Rab5. Η συναρμολόγηση των Rab5-περιοχών απαιτεί έναν πολύπλοκο καταρράκτη μοριακών αλληλεπιδράσεων που επιτελεί εξειδικευμένες λειτουργίες, όπως η στρατολόγηση της Rab5 στη μεμβράνη με αποδέσμευση από την GDI (GDF, π.χ. PRA-1), η ρύθμιση του κύκλου ανταλλαγής (GEFs, π.χ., σύμπλοκο Rabarin-5/Rabex-5) και υδρόλυσης του νουκλεοτιδίου (GAPs, π.χ. RN-Tre), ο μεταβολισμός της φωσφατιδυλινοσιτόλης (hVps34 PI3-K που φωσφορυλιώνει τη PI σε PI3P), και ο ελλιμενισμός και η σύντηξη (EEA1, Rabenosyn-5 /

hVps45, Rabankyrin-5). Η συναρμολόγηση και λειτουργία των Rab5-περιοχών επομένως εξαρτάται από τη συνεργασία μεταξύ των τελεστών (effectors) της Rab5 και μεταξύ των τελεστών της Rab5 και των SNAREs. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο Rabartin-5/Rabex-5 δημιουργεί έναν βρόχο θετικής ανάδρασης ενισχύοντας την δραστηριότητα της Rab5 κατά την πρόσληψη του τελεστή στην ενδοσωματική μεμβράνη. Η δραστηριότητα PI3-K της hVps34 επεκτείνει τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης για τους τελεστές της Rab5 που αλληλεπιδρούν με το PI(3)P, παρέχοντας έτσι έναν άλλο βρόχο θετικής ανάδρασης. (<http://zerial.mpi-cbg.de/page/project-rab-gtpases>)

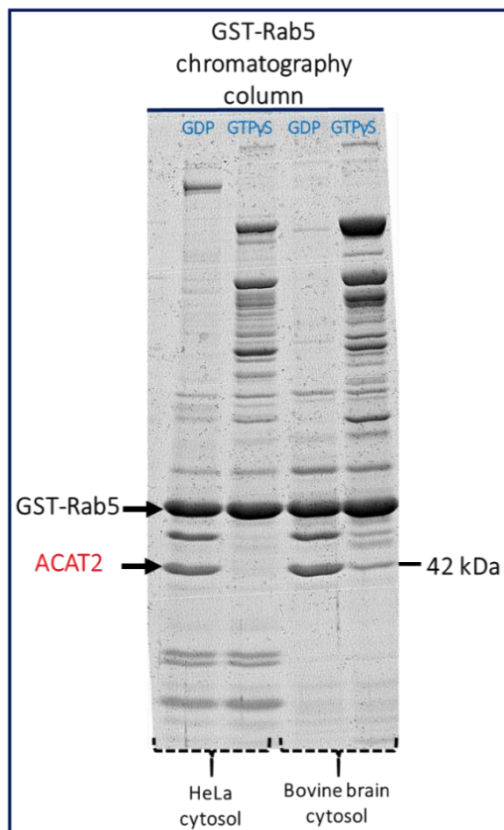
Ως μηχανισμός για την στρατολόγηση πολλών πρωτεϊνών τελεστών στα πρώιμα ενδοσώματα, έχει εξελιχθεί ο σχηματισμός Rab5-περιοχών της μεμβράνης των ενδοσωμάτων, οι οποίες εξυπηρετούν πολλαπλές λειτουργίες, ανάλογα με την διαφορική δράση των τελεστών. Για τον σχηματισμό των περιοχών αυτών, η ενεργοποιημένη GTP-Rab5, επάγει την στρατολόγηση της PI(3)κινάσης hVPS34/p150, η οποία εμπλουτίζει την μεμβράνη των ενδοσωμάτων με PI3P (3-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη), ένα μεμβρανικό λιπίδιο το οποίο προσδένει, στην ενδοσωματική μεμβράνη, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή δέσμευσης PI3P FYVE^{98,99}. Μεταξύ των πρωτεϊνών που περιέχουν περιοχή FYVE είναι οι EEA1, Rabankyrin-5, Rabenosyn5, καθώς και άλλοι τελεστές^{55,96,98,100,101}. Οι περιοχές FYVE αυτών των πρωτεϊνών μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από PI3P στρατολόγησή τους στην ενδοσωματική μεμβράνη, ενώ ανεξάρτητες περιοχές διευκολύνουν αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων είναι και η Rab5, οδηγώντας στη σύντηξη των μεμβρανών (εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16: Η συνδυαστική δράση Rab5 και PI3-κινάσης για την στρατολόγηση της EEA1. Αρχικά η αλληλεπίδραση της Rab5-GTP με την hVPS34 οριοθετεί την παραγωγή του PI(3)P στη μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Έπειτα, πραγματοποιείται η στρατολόγηση της EEA1, η οποία, εξαρτάται τόσο από το λιπίδιο PI(3)P, όσο και από την Rab5-GTP. Το καρβοξυτελικό άκρο της EEA1 περιέχει την περιοχή δέσμευσης με την Rab5 (RBD, Rab-Binding domain) και την περιοχή σύνδεσης με το PI(3)P (FYVE domain)⁹⁸

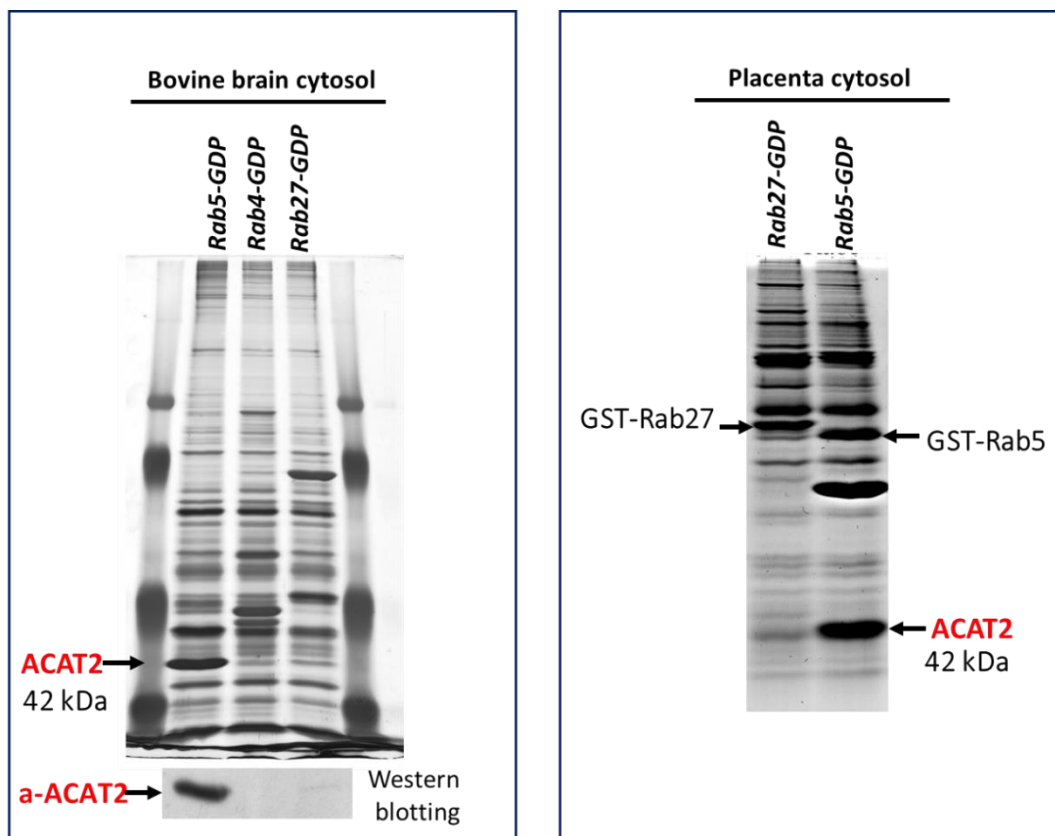
1.5 Η ανενεργή μορφή της Rab5 (GDP) αλληλεπιδρά με το κυταροπλασματικό ένζυμο ACAT2 (acetoacetyl-CoA thiolase II)

Σε προηγούμενες μελέτες είχε αναπτυχθεί μια μεθοδολογία χρωματογραφίας συγγένειας μεγάλης κλίμακας με την οποία ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες που συνδέονται είτε με την ενεργή μορφή της Rab5 (Rab5-GTP) είτε με την ανενεργή (Rab5-GDP)^{53,88}. Από την παραπάνω μεθοδολογία προέκυψε ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών/τελεστών που συνδέονταν με την ενεργό μορφή της Rab5, ενώ αρκετά λιγότερες πρωτεΐνες συνδέονταν με την ανενεργό μορφή της Rab5 (Εικόνα 1.17). Από τις πρωτεΐνες που συνδέονταν με την ανενεργό μορφή της Rab5, η πιο έντονη ζώνη προέρχεται από το κυταροπλασματικό ένζυμο ακετοακέτυλο-CoA θειολάση (ACAT2) (αδημοσίευτα αποτελέσματα, μεταδιδακτορική έρευνα Σάββα Χριστοφορίδη, EMBL/Heidelberg). Όπως φαίνεται στις στήλες της Rab5-GDP, είτε στην περίπτωση του εκχυλίσματος εγκεφάλου βοός ή του κυταροπλάσματος HeLa κυττάρων (Εικόνα 1.17), η ACAT2 εμφανίζεται ως μια έντονη ζώνη στο μοριακό βάρος των 42kDa. Η αχνή ζώνη στο μοριακό βάρος των 42kDa, που εμφανίζεται στην Rab5-GTP στήλη του εκχυλίσματος εγκεφάλου βοός, είναι ενδεχομένως αποτέλεσμα της μερικής μετατροπής της Rab5GTPγS σε Rab5GDP, λόγω μερικής υδρόλυσης του GTPγS νουκλεοτιδίου από την Rab5.



Εικόνα 1.17: Ταυτοποίηση της ACAT2 ως μια νέα πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη Rab5-GDP. Η GST-Rab5 εκφράστηκε σε βακτήρια και δεσμεύτηκε σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Ακολούθησε ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου, ώστε να δημιουργηθούν οι δύο μορφές της Rab5 (GDP και GTPγS), και τα σφαιρίδια επώαστηκαν με κυταροπλάσμα από HeLa κύτταρα ή από εγκέφαλο βοός. Οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε χρώση με νιτρικό άργυρο. Με βέλος δείχνεται η ζώνη που ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ως ACAT2 (αδημοσίευτα αποτελέσματα μεταδιδακτορικής έρευνας Σάββα Χριστοφορίδη).

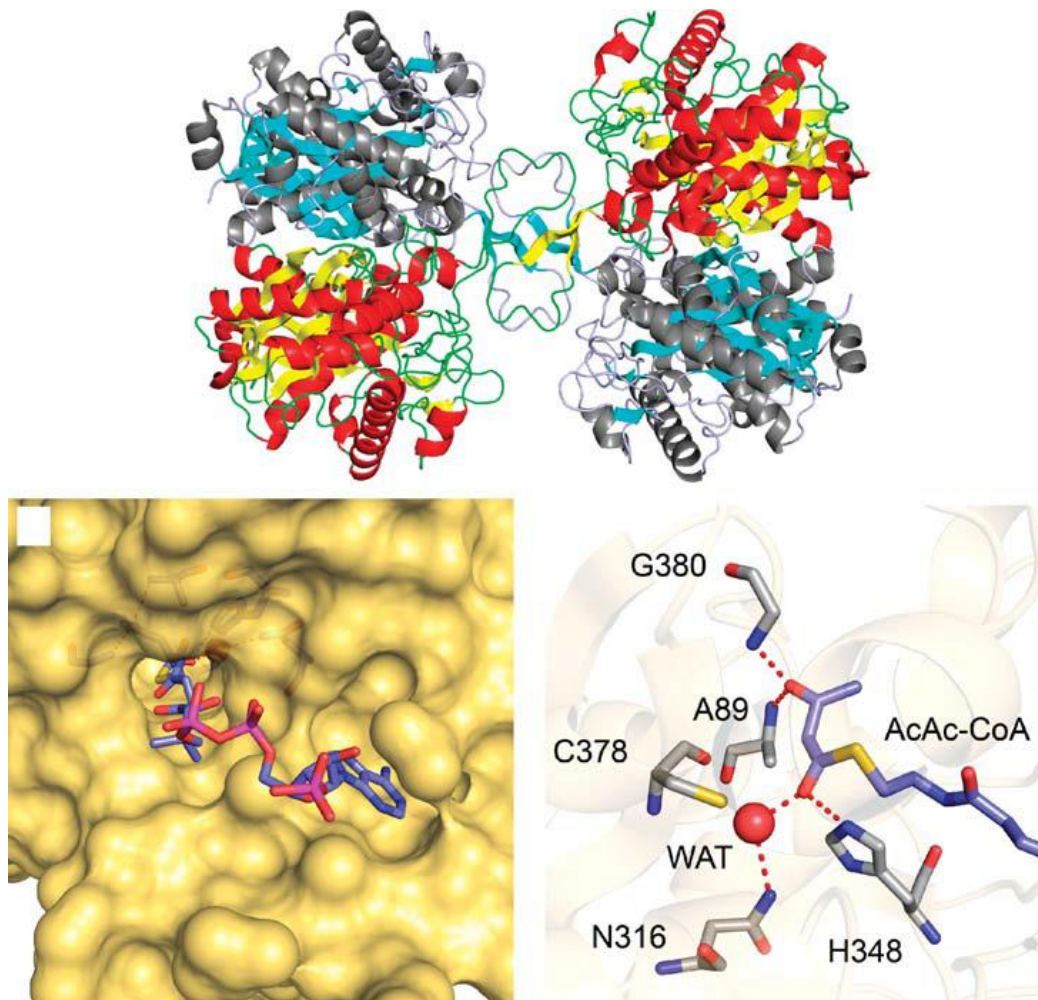
Η ταυτοποίηση της ACAT2 μεταξύ των πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την Rab5 αποτέλεσε ένα νέο και πολύ ενδιαφέρον εύρημα, καθώς ελάχιστες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί να αλληλεπιδρούν με την ανενεργό μορφή της Rab5 (Rab5-GDP). Για το λόγο αυτό ακολούθησε έλεγχος της εξειδίκευσης της πρόσδεσης της ACAT2 στην Rab5-GDP με δοκιμασία χρωματογραφίας συγγένειας μικρής κλίμακας (pull-down), χρησιμοποιώντας ως αρνητικούς μάρτυρες τις Rab4 και Rab27, συζευγμένες με το πρόσδεμα GST. Έτσι, σφαιρίδια γλουταθειόνης που είχαν προσδεσμένες τις πιο πάνω Rabs επώαστηκαν με κυτταρόπλασμα από εγκέφαλο βοός και πλακούντα. Παρατηρήθηκε ότι η ACAT2 προσδέθηκε μόνο στο δείγμα που περιείχε την Rab5-GDP (Εικόνα 1.18). Φαίνεται λοιπόν ότι η σύνδεση της ACAT2 με την Rab5-GDP είναι ειδική.



Εικόνα 1.18: Η ACAT2 αλληλεπιδρά ειδικά με την Rab5-GDP. Οι πρωτεΐνες GST-Rab4GDP, GST-Rab5GDP και GST-Rab27GDP εκφράστηκαν σε βακτήρια, δεσμεύτηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και επώαστηκαν με κυτταρόπλασμα εγκέφαλου βοός (πηκτή αριστερά) ή με κυτταρόπλασμα από πλακούντα (πηκτή δεξιά). Οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε χρώση με νιτρικό άργυρο. Επιπλέον, τα δείγματα αριστερά αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με το ειδικό αντίσωμα έναντι της ACAT2 (μεταδιδακτορική έρευνα Αγαθής Παπανικολάου).

1.6 Ο ρόλος της ακετοακετυλοτρανσφεράσης 2 (ACAT2 ή κυτταροπλασματική θειολάση, CT), στον μεταβολισμό και την ακετυλίωση πρωτεϊνών.

Οι θειολάσες, είναι καθολικά ένζυμα τα οποία βρίσκονται τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, και συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές βιοχημικές οδούς, όπως η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, και η σύνθεση λιπαρών οξέων, στεροειδών και πολυκετιδίων. Τα μέλη της οικογένειας των θειολασών προέρχονται από ομοδιμερή τα οποία διμερίζονται και σχηματίζουν ομοτετραμερή ένζυμα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1.19¹⁰². Μόνο οι θειολάσες των υπεροξεισωμάτων είναι διμερείς. Η οικογένεια των θειολασών χωρίζεται σε δύο τύπους, τις βιοσυνθετικές και τις αποικοδομητικές θειολάσες. Ο αποικοδομητικός τύπος αφορά την 3-κετοακυλ-CoA θειολάση (3-Ketoacyl-CoA thiolase) ή αλλιώς θειολάση I (thiolase I), η οποία είναι υπεύθυνη για την θειολυτική διάσπαση οξειδωμένου ακυλο-CoA, και περιλαμβάνει δύο μιτοχονδριακές και μία υπεροξεισωμική θειολάση. Ο βιοσυνθετικός τύπος αφορά την ακετοακετετοακετυλο-CoA θειολάση (acetoacetyl-CoA thiolase) ή αλλιώς θειολάση II (thiolase II), η οποία είναι υπεύθυνη για την σύνθεση ή αποικοδόμηση του ακετοακετυλο-CoA, και περιλαμβάνει μια μιτοχονδριακή και μία κυτταροπλασματική θειολάση¹⁰³. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, και ειδικά στα κύτταρα των θηλαστικών, οι θειολάσες παρουσιάζουν ποικιλομορφία στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους, η οποία, μάλιστα, σχετίζεται με τις μεταβολικές τους λειτουργίες, καθώς και με την εξειδίκευση υποστρώματος. Για παράδειγμα, θειολάσες που συμβάλλουν στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων εντοπίζονται στα υπεροξυσώματα και τα μιτοχόνδρια, αυτές που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των κετονοσωμάτων βρίσκονται στα μιτοχόνδρια¹⁰⁴, ενώ όσες συμμετέχουν στα πρώτα βήματα της οδού του μεβαλονικού οξέος εντοπίζονται στα υπεροξυσώματα και το κυτταρόπλασμα¹⁰⁵. Οι θειολάσες χρησιμοποιούν αποκλειστικά υποστρώματα με βάση το CoA, τα οποία τοποθετούνται σε μια καθορισμένη θέση δέσμευσης και έχουν πρόσβαση στο ενεργό κέντρο μέσω μιας “σήραγγας” (Εικόνα 1.19, κάτω αριστερά). Αν και οι αποικοδομητικές θειολάσες έχουν μια ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος για διαφορετικού μήκους αλυσίδες β-ketoacyl-CoA, οι βιοσυνθετικές θειολάσες καταλύουν αποκλειστικά τη σύνθεση του acetoacetyl-CoA από δύο μόρια acetyl-CoA. Το ενεργό κέντρο αυτών των ενζύμων περιλαμβάνει τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα, συμπεριλαμβανόμενων δύο καταλοίπων κυστεΐνης, μιας ιστιδίνης και μίας ασπαραγίνης (εικόνα 1.19, κάτω δεξιά).



Εικόνα 1.19: Η βιοσυνθετική θειολάση της *Z. Ramigera*. Στην εικόνα πάνω παρουσιάζεται η δομή της θειολάσης που δείχνει το μοτίβο τετραμερισμού. Στην εικόνα κάτω αριστερά παρουσιάζεται η επιφάνεια δέσμευσης του CoA και η σήραγγα που παρέχει πρόσβαση στην (ενεργό) θέση της ακυλομάδας. Στην εικόνα κάτω δεξιά φαίνεται το AcAc-CoA το οποίο περιβάλλεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στη δομή που παρουσιάζεται, η κυστεΐνη (C89) του ενεργού κέντρου έχει αντικατασταθεί από μια αλανίνη¹⁰².

Η ACAT2 είναι μια κυτταροπλασματική θειολάση τύπου II, το πρώτο ένζυμο στο μονοπάτι του μεβαλονικού που οδηγεί στην παραγωγή χοληστερόλης (Εικόνα 1.20). Καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης Claisen, όπου δύο μόρια ακετυλ-CoA (Ac-CoA) μετατρέπονται σε ακετοακετυλ-CoA (AcAc-CoA) και CoA, και αντιστρόφως (Εικόνα 1.20, κίτρινο πλαίσιο). Θερμοδυναμικά ευνοείται περισσότερο η αποικοδομητική κατεύθυνση, δηλαδή ο σχηματισμός του ακετυλ-CoA. Η ανθρώπινη κυτταροπλασματική θειολάση έχει μοριακό βάρος περίπου 42 kDa και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την

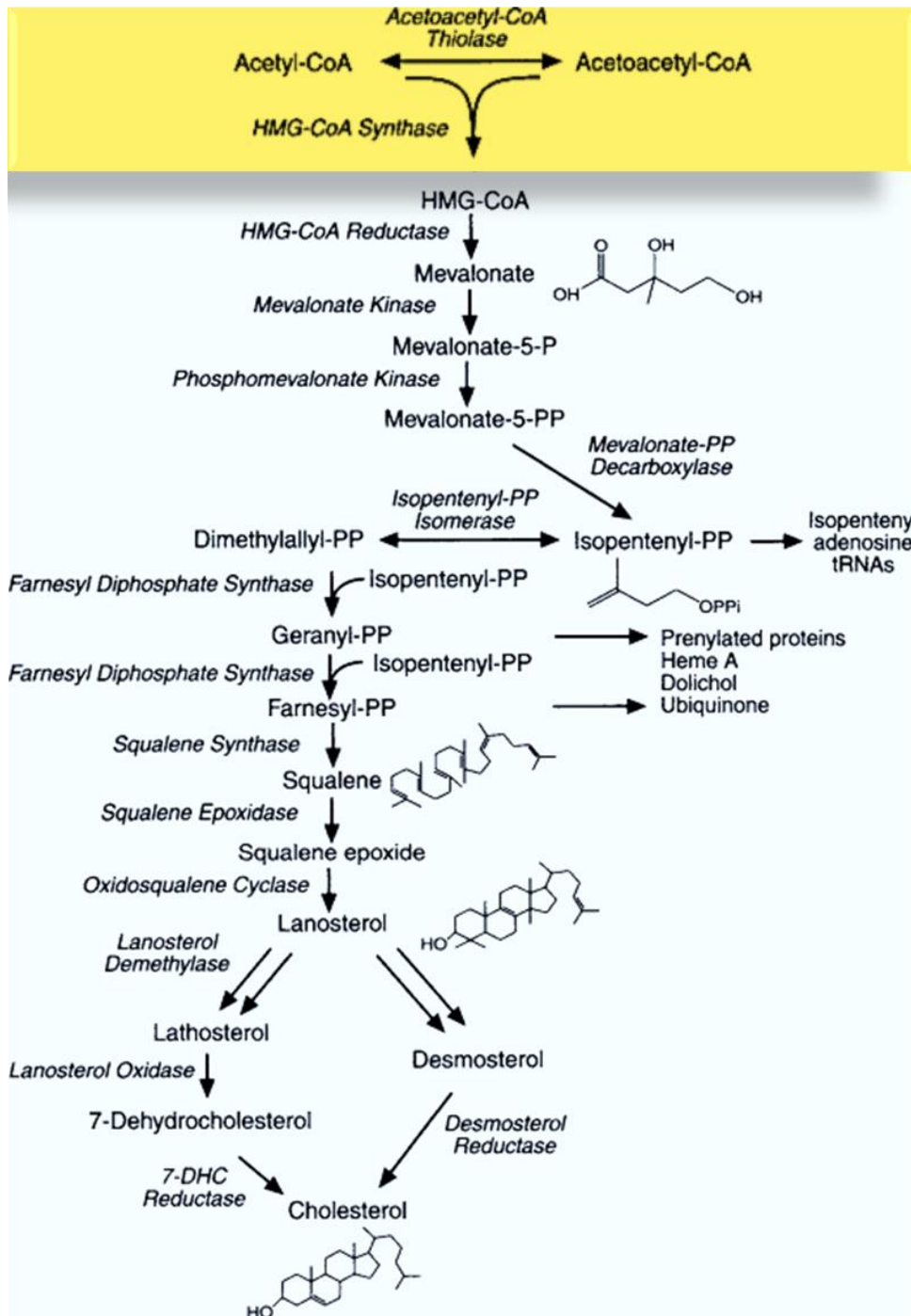
βακτηριακή θειολάση της *Z.Ramigera*, ενώ η δομή της έχει κρυσταλλογραφηθεί (Εικόνα 1.21). Είναι ένα ομοτετραμερές ένζυμο με το ενεργό της κέντρο να περιλαμβάνει τα αμινοξικά καταλοιπα κυστεΐνη 92, ασπαραγίνη 321, ιστιδίνη 353 και κυστεΐνη 383, τα οποία διαθέτουν υψηλή συντήρηση ανάμεσα στην ανθρώπινη και τη βακτηριακή θειολάση (Εικόνα 1.22). Μεταλλαγές στην κυστεΐνη 92 καθώς και στην ασπαραγίνη 321, καθιστούν το ένζυμο πλήρως ανενεργό^{106,107}. Η ενζυματικές ιδιότητες της κυτταροπλασματικής θειολάσης έχουν μελετηθεί σε διάφορους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της ζύμης, του αρουραίου και της όρνιθας. Στους ανθρώπινους ιστούς, η ACAT2 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο ήπαρ, γεγονός που συμφωνεί με την σημασία του ήπατος στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης¹⁰⁸.

Το μονοπάτι του μεβαλονικού αφορά τη μετατροπή του ακετυλο-CoA σε 5-διφωσφορικό ισοπεντενυλεστέρα, τον ευπροσάρμοστο πρόδρομο των πολυισοπρενοειδών μεταβολιτών και άλλων φυσικών προϊόντων. Η οδός αυτή απαντάται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, στα Αρχαία και κάποια ευβακτήρια¹⁰⁹, και οδηγεί στη σύνθεση στερολών και ισοπρενοειδών. Σημαντικό παράγωγο του μεβαλονικού είναι το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP), ένα σημείο διακλάδωσης που οδηγεί σε διάφορα τελικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, των στεροειδών και των δολιχολών¹¹⁰. Επιπλέον, το FPP μπορεί να μετατραπεί σε πυροφωσφορικό γερανυλγερανύλιο (GGPP), το οποίο είναι απαραίτητο για την μετα-μεταφραστική τροποποιητική διαδικασία της ισοπρενυλίωσης αρκετών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και οι πρωτεΐνες Rab¹¹¹. Άλλο παράγωγο του FPP είναι το σκουαλένιο που οδηγεί το μονοπάτι στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και παίζει ρόλο στην κατεύθυνση των ενδιάμεσων προϊόντων είτε προς την παραγωγή στερόλης, είτε μη στερολικών παραγώγων¹¹⁰. Πολλά ένζυμα αυτής της οδού αναγνωρίζονται ως απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων.

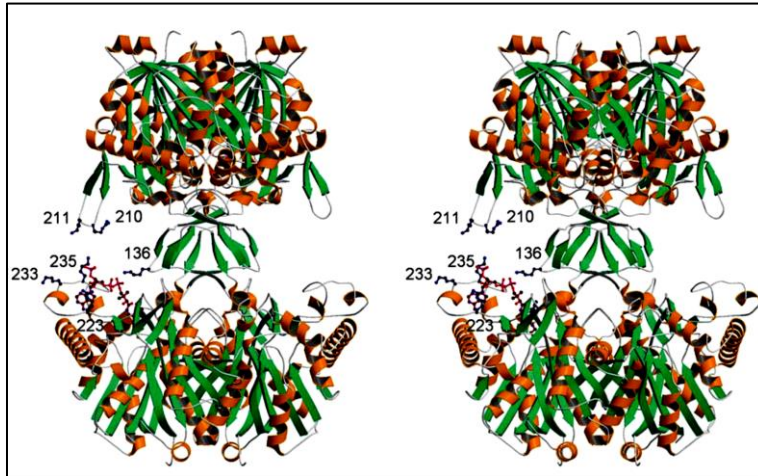
Πέρα από την παραπάνω μεταβολική δράση της ACAT2, πρόσφατα βρέθηκε ότι το ένζυμο αυτό έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η 6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση (6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD), του μονοπατιού οξειδωσης των πεντοζών, ακετυλιώνεται στα κατάλοιπα λυσίνης 76 και 294, από δύο διαφορετικές ακετυλοτρανσφεράσες, την DLAT και την ACAT2, αντίστοιχα. Η ακετυλίωση της 6PGD έχει ως επακόλουθο την ενεργοποίησή της και την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού¹¹². Είναι ενδιαφέρον ότι σε περιπτώσεις πρώιμων σταδίων λευχαιμίας στον άνθρωπο, ο

εξαρτώμενος από ακετυλίωση μηχανισμός ενεργοποίησης της 6PGD παρακάμπτεται και η 6PGD παραμένει διαρκώς ενεργή λόγω των αυξημένων πρωτεϊνικών επιπέδων των ακετυλοτρανσφεράσων DLAT και ACAT2¹¹².

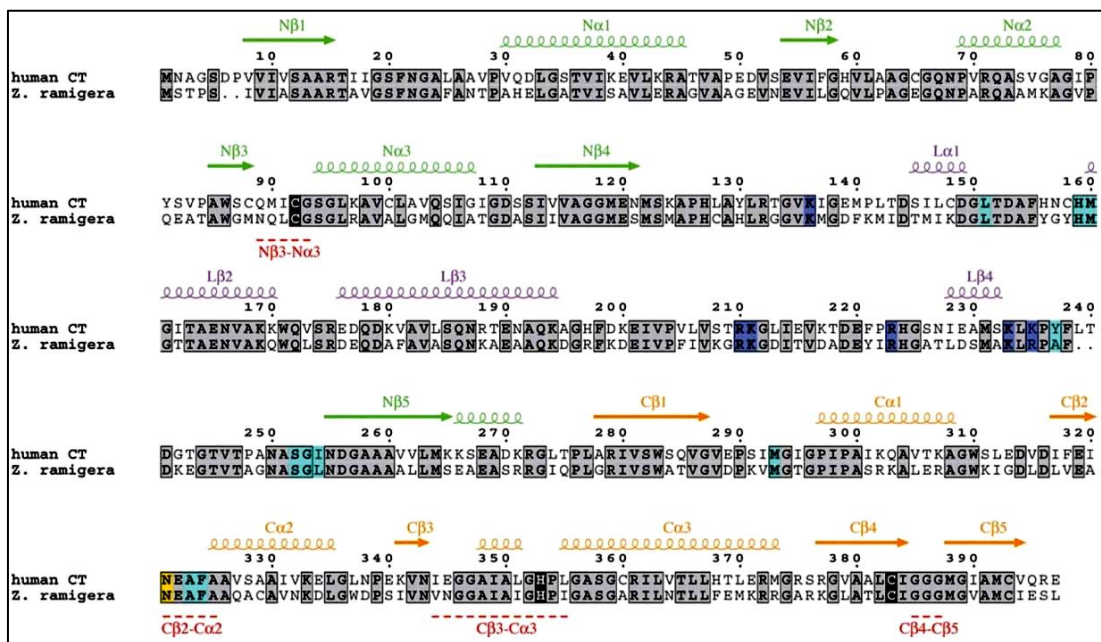
Μελέτες σε ασθενείς, έχουν δείξει πως η έλλειψη της ACAT2 μπορεί να προκαλέσει σοβαρή νοητική καθυστέρηση, σημαντικές νευρολογικές διαταραχές και άλλα κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με τη λειτουργία του ήπατος^{113,114}. Πολλές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των επιπέδων χοληστερόλης και του γονιδίου της ACAT2^{115,116}. Η υπερλιπιδαιμία είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή, όπου η αύξηση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, της ολικής χοληστερόλης και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης-χοληστερόλης, ή η μείωση των επιπέδων υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης-χοληστερόλης, συμβάλλουν στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου, όπως η στεφανιαία νόσος. Πρόσφατα βρέθηκαν πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο της ACAT2 οι οποίοι σχετίζονται με ευαισθησία στην υπερλιπιδαιμία στον ανθρώπινο πληθυσμό¹¹⁷. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της ACAT2 σχετίζονται με το στάδιο του καρκίνου, με το μέγεθος του όγκου και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα¹¹⁸.



Εικόνα 1.20: Η ACAT2 καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι του μεβαλονικού. Στο μονοπάτι σύνθεσης του μεβαλονικού η ACAT2 καταλύει την σύνθεση του acetoacetyl-CoA από δύο μόρια acetyl-CoA, και ακολουθεί μια δεύτερη συμπύκνωση για να σχηματιστεί 3-υδροξυ-3-μεθυλ-γλουταρυλ-CoA (HMG-CoA). Στην συνέχεια, με αναγωγή του HMG-CoA παράγεται μεβαλονικό. Η μεταβολική αυτή οδός παράγει δύο δομικά στοιχεία με πέντε άτομα άνθρακα (IPP και DMAPP), τα οποία χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ισοπrenoειδών, μια ομάδα μορίων που περιλαμβάνει πάνω από 30.000 βιομόρια, όπως χοληστερόλη, αίμη, βιταμίνη K κ.α.¹¹⁹.



Εικόνα 1.21: Η ανθρώπινη κυτταροπλασματική θειολάση έχει δομή τετραμερούς. Το τετραμερές σχηματίζεται από την συναρμολόγηση των δύο διμερών, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μέσω ενός μικρού βρόχου που προεξέχει από κάθε υπομονάδα. Το τετραμερές περιστρέφεται γύρω από τον κατακόρυφο άξονα έτσι ώστε οι προεξέχοντες βρόχοι του άνω διμερούς (κοντά στα κατάλοιπα 210-211 κάθε υπομονάδας) να είναι στραμμένοι στον ενδιάμεσο χώρο των δύο διμερών, προς το δεσμευμένο CoA του κάτω διμερούς¹⁰⁷.



Εικόνα 1.22 Στοιχίση της αλληλουχίας της ανθρώπινης κυτταροπλασματικής θειολάσης (CT) και της *Z. Ramigera*. Η δευτεροταγής δομή της αμινοτελικής περιοχής, της περιοχής του βρόχου (κατάλοιπα 121-254) και της καρβοξυτελικής περιοχής είναι χρωματισμένες με πράσινο, μωβ και πορτοκαλί, αντίστοιχα. Τα ταυτόσημα κατάλοιπα είναι σε γκρι κουτιά. Τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου είναι σε μαύρο φόντο και το κατάλοιπο της δραστηρικής θέσης Asn321 είναι σε κίτρινο χρώμα. Οι τέσσερις βρόχοι του ενεργού κέντρου υπογραμμίζονται και επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τα έξι βασικά κατάλοιπα κοντά στο τμήμα CoA είναι σε σκούρο μπλε. Τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το τμήμα της πανθεινης είναι κυανό¹⁰⁷.

1.7 Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η μικρή GTPάση Rab5 είναι ο κύριος ρυθμιστής της ενδοκυττάρωσης και της λειτουργίας των πρώιμων ενδοσωμάτων. Παρά τον μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που έχει αποδειχθεί πως συνδέονται με την ενεργή μορφή της Rab5 (Rab5-GTP), παραμένουν ελάχιστες οι πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να συνδέονται με την ανενεργό της μορφή (Rab5-GDP). Προηγούμενα αδημοσίευτα αποτελέσματα οδήγησαν στην ταυτοποίηση μιας νέας πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά μόνο με την ανενεργή μορφή της Rab5 (Rab5-GDP). Η νέα αυτή πρωτεΐνη είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο ακετοακέτυλο CoA θειολάση (ACAT2), που καταλύει την μετατροπή του ακέτυλο-CoA σε ακετοακέτυλο-CoA, δηλαδή την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, που οδηγεί στη σύνθεση χοληστερόλης. Επιπλέον, η ACAT2 είναι ακετυλο-τρανφεράση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.

Με βάση τα παραπάνω, στην παρούσα διατριβή θέσαμε τους εξής στόχους:

- Να μελετήσουμε την εξειδίκευσή της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2 τόσο *in vitro* όσο και σε ανέπαφα κύτταρα (*in vivo*) και να προσδιορίσουμε την ισχύ και την κινητική της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών.
- Να μελετήσουμε την λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, κάνοντας χρήση δοκιμασιών που εξαρτώνται από την δράση της Rab5.
- Να διερευνήσουμε το μηχανισμό με τον οποίο η ACAT2 επηρεάζει τις λειτουργίες της Rab5.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Οι πρωτεΐνες HRP (Horse Raddish Peroxidase) και BSA (bovine serum albumin) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Ο ανθρώπινος ανασυνδυασμένος VEGF165 (50 ng/ml) αποκτήθηκε από την εταιρεία Immunotools. Η δεξτράνη μοριακού βάρους 70.000 συζευγμένη με τη φθορίζουσα χρωστική Texas-Red (1.5 mg/ml) αποκτήθηκε από την εταιρεία Invitrogen. Τα αντιδραστήρια MESNA, Iodoacetamide, acetoacetyl-CA, acetyl-CoA, CoA και OPD αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ACAT2 (acetyl-Coenzyme A acetyltransferase) παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Ο πολυκλωνικός ορός κονίκλου έναντι της πρωτεΐνης EEA-1 (Early Endosome Antigen-1) ήταν ευγενική προσφορά του M. Zerial (Max Plank, Δρέσδη, Γερμανία). Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακτίνης αποκτήθηκε από την εταιρεία Millipore. Το μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος (150 aa) του ανθρώπινου VEGFR2 αποκτήθηκε από την εταιρεία Cell Signaling Technology. Το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι του προσδέματος flag (κλώνος M2, F3165) αποκτήθηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Το πολυκλωνικό anti-GFP είναι προϊόν συνεργασίας μας με το εργαστήριο της Χ.Μπολέτη (Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα). Το πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι του mcherry (AB0040-200) προήλθε από την SICGEN. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα Alexa (Alexa 488, 594, 568, 633, 680) αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen. Το δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα CF 568 (20106) αγοράστηκε από την εταιρεία Biotium. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) αγοράστηκαν από την εταιρεία Jackson Immunoresearch.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων για κάθε πειραματική διάταξη αναφέρονται αντίστοιχα, σε επόμενες ενότητες στις οποίες αναπτύσσονται οι μέθοδοι της παρούσας μελέτης.

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 αρουραίου 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 εταιρείας 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.

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa cells) και ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος (Hep G2 cells) καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FCS, 100 units/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM L-γλουταμίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά σε αραιώση 1:4.

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 πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (cDNA) και με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs)

Για τη διαμόλυνση κυττάρων HUVE και Hep G2 με DNA χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontex). Τα κύτταρα, τη στιγμή της διαμόλυνσης, βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 50-60% 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 ACAT2, πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE και Hep G2 (τα οποία βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 30-50% και είχαν ομοιόμορφη κατανομή στο τρυβλίο) με τη χρήση του λιπιδίου RNAiMax LIPOFECTAMINE (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αραιώση των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε το χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό υλικό OptiMEM I (Gibco). Η τελική συγκέντρωση του siRNA έναντι της ACAT2 ήταν 20 nM. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν, στις διάφορες

πειραματικές διαδικασίες, μετά από 72 ώρες επώασης τους. Το siRNA έναντι της ACAT2 προήλθε από την εταιρεία Biospring, και είχε αλληλουχία στόχευσης 5'-CCUUUAGCACGGAUAGUUUTT -3'.

2.3 Μοριακές μέθοδοι

2.3.1 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε τόσο για τη δημιουργία κατάλληλων άκρων στα PCR προϊόντα, ώστε να είναι δυνατή η ένθεσή τους στις κατάλληλες θέσεις κλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα pGEX6P, pCMV-flag, pCMV-mcherry και pEgfpC. Σύμφωνα με τις αρχές της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, η αντίδραση καταλύεται από μία σειρά επιμέρους σταδίων:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA και
- ακόλουθη επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA με χρήση μιας DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs).

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές σε θερμικό κυκλοποιητή. Συγκεκριμένα, για την κατάλυση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν 10 ng πλασμιδίου που έφερε την αλληλουχία cDNA του γονιδίου ενδιαφέροντος, 0.3 μM από τον κάθε εκκινητή (οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στην ενότητα 2.5), DNA πολυμεράση (KAPA HiFi Fidelity, 1U/μl) μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM) και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα της DNA πολυμεράσης (σε τελική συγκέντρωση 1x, περιέχει 2 mM ιόντα Mg²⁺), όλα σε τελικό όγκο 25 μl. Ενδεικτικά, στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται για το κάθε επιμέρους στάδιο οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των παραπάνω προϊόντων PCR (ίδιες συνθήκες για όλες τις υπό μελέτη αντιδράσεις PCR).

2.3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές cDNA

Για τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πλασμίδια. Οι πειραματικές διαδικασίες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια, περιγράφονται αναλυτικά σε επόμενες ενότητες.

CMV flag 2 ActA: ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης CMV flag 2 ActA κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του τμήματος ActA, το οποίο παρασκευάστηκε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο ActA-FRB-FRB-mcherry. Για την σύνθεση του ActA, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1.

CMV cassette m-cherry: ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης CMV cassette m-cherry κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του τμήματος mCherry από την Δέσποινα Γκέκα, και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση σε κύτταρα θηλαστικών.

gfp-Rab5: κατασκευάστηκε παλιότερα στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5, συζευγμένη με την GFP αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-Rab5 S34N: κατασκευάστηκε παλιότερα στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5 S34N (ανενεργή μορφή), συζευγμένη με το πρόσδεμα flag στο αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών. με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-Rab5Q79L: κατασκευάστηκε παλιότερα στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5 Q79L (ενεργή μορφή), συζευγμένη με το πρόσδεμα flag στο αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

gfp-Rab5 ΔC4: το γονίδιο της Rab5 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEGFPC3 στις θέσεις XhoI/HindIII. Από το γονίδιο αφαιρέθηκαν οι 4 τελευταίες τριπλέτες νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο λήξης. Επομένως, σε επίπεδο πρωτεΐνης απουσιάζουν τα 4 τελευταία αμινοξέα (ΔC4), τα οποία αποτελούν την θέση πρενυλίωσής της. Για την σύνθεση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1

ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο gfp-Rab5. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5 ΔC4, συζευγμένη με την GFP αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

gfp-Rab5 S34N ΔC4: το γονίδιο της Rab5 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEGFPC3 στις θέσεις XhoI/HindIII. Από το γονίδιο αφαιρέθηκαν οι 4 τελευταίες τριπλέτες νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο λήξης. Επομένως, σε επίπεδο πρωτεΐνης απουσιάζουν τα 4 τελευταία αμινοξέα (ΔC4), τα οποία αποτελούν την θέση πρενυλίωσής της. Για την σύνθεση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1 2.1 ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο flag-Rab5S34N. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5S34N ΔC4, συζευγμένη με την GFP αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

gfp-Rab5Q79L ΔC4-ActA: το γονίδιο της Rab5 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEGFPC3 στις θέσεις XhoI/HindIII. Από το γονίδιο αφαιρέθηκαν οι 4 τελευταίες τριπλέτες νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο λήξης. Επομένως, σε επίπεδο πρωτεΐνης απουσιάζουν τα 4 τελευταία αμινοξέα (ΔC4), τα οποία αποτελούν την θέση πρενυλίωσής της. Για την σύνθεση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1 2.1 ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο flag-Rab5Q79L. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5Q79L ΔC4, συζευγμένη με την GFP αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-Rab5 ΔC4-ActA: το γονίδιο της Rab5 κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV flag 2 ActA στις θέσεις HindIII/XbaI. Από το γονίδιο αφαιρέθηκαν οι 4 τελευταίες τριπλέτες νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο λήξης. Επομένως, σε επίπεδο πρωτεΐνης απουσιάζουν τα 4 τελευταία αμινοξέα (ΔC4), τα οποία αποτελούν την θέση πρενυλίωσής της. Για την σύνθεση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1 ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο gfp-Rab5. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5 ΔC4, συζευγμένη με το πρόσδεμα flag στο

αμινοτελικό της άκρο και την αλληλουχία ActA αμέσως μετά το καρβοξυτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-Rab5 S34N ΔC4-ActA: το γονίδιο της Rab5 κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV flag 2 ActA στις θέσεις HindIII/XbaI. Από το γονίδιο αφαιρέθηκαν οι 4 τελευταίες τριπλέτες νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο λήξης. Επομένως, σε επίπεδο πρωτεΐνης απουσιάζουν τα 4 τελευταία αμινοξέα (ΔC4), τα οποία αποτελούν την θέση πρενυλίωσης της. Για την σύνθεση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1 ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο flag-Rab5S34N. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5S34N ΔC4, συζευγμένη με το πρόσδεμα flag στο αμινοτελικό της άκρο και την αλληλουχία ActA αμέσως μετά το καρβοξυτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-Rab5Q79L ΔC4-ActA: το γονίδιο της Rab5 κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV flag 2 ActA στις θέσεις HindIII/XbaI. Από το γονίδιο αφαιρέθηκαν οι 4 τελευταίες τριπλέτες νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο λήξης. Επομένως, σε επίπεδο πρωτεΐνης απουσιάζουν τα 4 τελευταία αμινοξέα (ΔC4), τα οποία αποτελούν την θέση πρενυλίωσης της. Για την σύνθεση του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1 ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο flag-Rab5Q79L. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της Rab5Q79L ΔC4, συζευγμένη με το πρόσδεμα flag στο αμινοτελικό της άκρο και την αλληλουχία ActA αμέσως μετά το καρβοξυτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

GST-Rab5: κατασκευάστηκε παλιότερα στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

GST-Rab27a: κατασκευάστηκε παλιότερα στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

pRSET A GD1a: το πλασμίδιο αυτό φέρει το πρόσδεμα His στο αμινοτελικό άκρο της GD1a και χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της. Είναι ευγενική προσφορά του M. Zerial (Max Plank, Δρέσδη, Γερμανία).

pCDNA3-ACAT2: το γονίδιο της ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCDNA3 στις θέσεις HindIII/XhoI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-ACAT2: το γονίδιο της ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCMV flag 2 στις θέσεις HindIII/XbaI με αποκοπή του τμήματος της ACAT2 από πλασμίδιο pCDNA3-ACAT2. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

gfp-ACAT2: το γονίδιο της ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEGFPC3 στις θέσεις HindIII/XhoI με SalI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με την GFP αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

gfp-ACAT2 C88S: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 C88S κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEGFPC3 στις θέσεις HindIII/XhoI με SalI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε με σημειακή μεταλλαξιγένεση με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω ενότητα. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με την GFP αμινοτελικό

της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

mcherry-ACAT2: το γονίδιο της ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV cassette m-cherry στις θέσεις XhoI/NotI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με την mCherry αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

mcherry-ACAT2 C88S: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 C88S κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV cassette m-cherry στις θέσεις XhoI/NotI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε με σημειακή μεταλλαξιγένεση με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω ενοτητα. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με την mCherry αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

mcherry-ACAT2 C92A: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 C92A κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV cassette m-cherry στις θέσεις XhoI/NotI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε με σημειακή μεταλλαξιγένεση με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω ενοτητα. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με την mCherry αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

mcherry-ACAT2 N321D: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 N321D κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV cassette m-cherry στις θέσεις XhoI/NotI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε με σημειακή μεταλλαξιγένεση με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω ενοτητα. Το πλασμίδιο

αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με την mCherry αμινοτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

flag-ACAT2-ActA: το γονίδιο της ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα CMV flag 2 ActA στις θέσεις HindIII/XbaI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιείται για υπερέκφραση της ACAT2, συζευγμένη με το πρόσδεμα flag στο αμινοτελικό της άκρο και την αλληλουχία ActA αμέσως μετά το καρβοξυτελικό της άκρο, σε κύτταρα θηλαστικών, με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

GST-ACAT2: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEX6P1 στις θέσεις XhoI/ XhoI με αποκοπή του τμήματος της ACAT2 από πλασμίδιο pCDNA3-ACAT2. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης GST-ACAT2 πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

GST-ACAT2 C88S: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEX6P1 στις θέσεις XhoI/NotI με αποκοπή του τμήματος της ACAT2 από πλασμίδιο mcherry-ACAT2 C88S. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης GST-ACAT2 C88S πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

GST-ACAT2 C92A: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEX6P1 στις θέσεις XhoI/NotI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε με σημειακή μεταλλαξιγένεση με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω ενότητα. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης GST-ACAT2 C92A πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

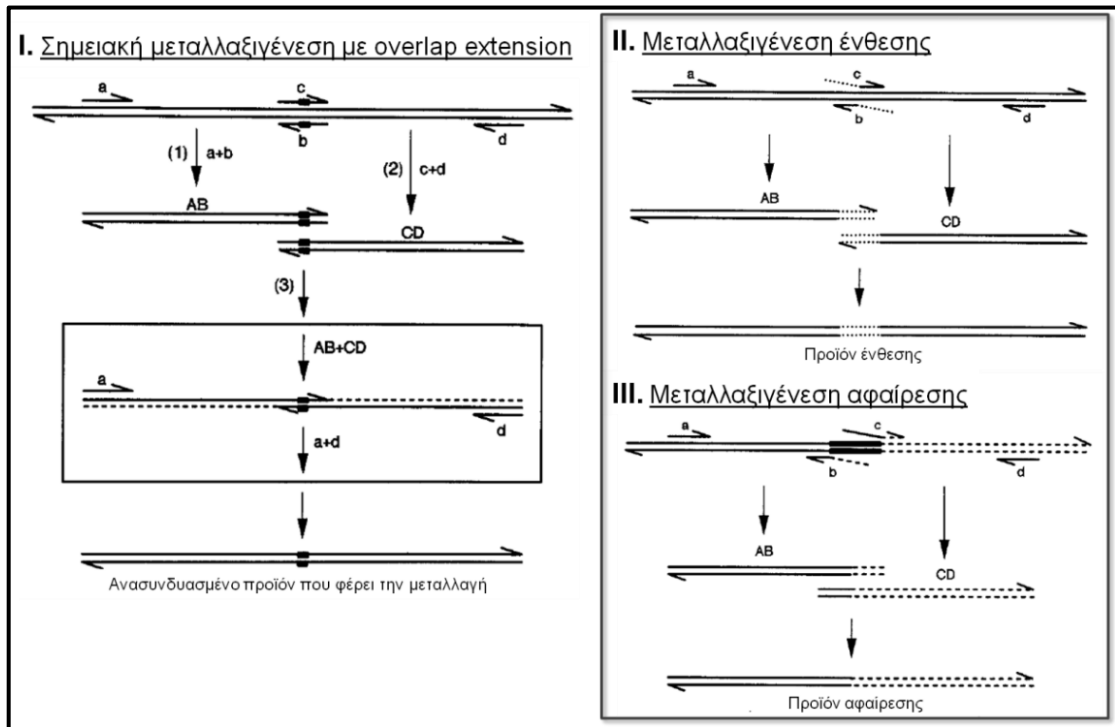
GST-ACAT2 N321D: το γονίδιο της μεταλλαγμένης ανθρώπινης ACAT2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEX6P1 στις θέσεις XhoI/NotI. Για την σύνθεση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω στον πίνακα 2.1. Η μεταλλαγή πραγματοποιήθηκε με σημειακή μεταλλαξιγένεση με αλληλεπικαλυπτόμενη

επέκταση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω ενότητα. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης GST-ACAT2 N321D πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

GST-Rab5 S34N: το γονίδιο της ανθρώπινης Rab5 S34N κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEX6P3 στις θέσεις EcoRI/SalI με αποκοπή του τμήματος της Rab5 από πλασμίδιο CMV flag Rab5 S34N. Το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για έκφραση της ανασυνδυασμένης GST-Rab5 S34N, πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη και απομόνωσή της (η πειραματική διαδικασία περιγράφεται σε επόμενη ενότητα).

2.3.3 Μεταλλαγμένη με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων.

Στη PCR δύο σταδίων¹²⁰, χρησιμοποιούνται συμπληρωματικοί εκκινητές (primers) μαζί με κατάλληλους εκκινητές εξωτερικά του γονιδίου, ώστε να δημιουργηθούν από τα γονίδια-στόχοι τμήματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (1ο στάδιο). Τα προϊόντα του 1ου σταδίου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν, και χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στο 2ο στάδιο, όπου με τη χρήση των ίδιων εξωτερικών εκκινητών του 1ου σταδίου, αυτά επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από τη συνεχόμενη συνθετική αλληλουχία όλων των προηγούμενων τμημάτων (2ο στάδιο). Η παραπάνω μεθοδολογία, περιγράφεται και ως PCR επικάλυψης/επέκτασης (overlap/extension). Η τεχνική της PCR δύο σταδίων χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων της ACAT2 (C88S, C92A, N321D). Για την δημιουργία των μεταλλαγών σχεδιάστηκαν συμπληρωματικοί εκκινητές, που στο μέσον περίπου της αλληλουχίας τους έχει γίνει αντικατάσταση ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων έναντι της αρχικής αλληλουχίας του γονιδίου της ACAT2. Τα αντικατεστημένα έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να δημιουργείται νέο κωκόνιο στην θέση του αρχικού κωδικονίου στο γονίδιο της ACAT2, με αποτέλεσμα την εισαγωγή του αντιστοίχου νέου αμινοξέως σε επίπεδο πρωτεΐνης. Οι συμπληρωματικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των παραπάνω μεταλλαγμάτων αναγράφονται στον Πίνακα 2.1.



Εικόνα 2.1: Διάγραμμα μεταλλαγμένης με αλληλεπικαλυπτόμενη επέκταση (overlap extension). Το δίκλωνο DNA και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (primers) απεικονίζονται ως γραμμές με βέλη που δείχνουν τον προσανατολισμό 5'-προς-3'. Η θέση της σημειακής μεταλλαγμένης (I) ή της αφαίρεσης (III) υποδεικνύεται με ένα μαύρο ορθογώνιο. Οι εκκινητές συμβολίζονται με μικρά γράμματα και τα αντίστοιχα προϊόντα PCR που προκύπτουν από αυτούς με ζεύγη κεφαλαίων (1 & 2). Εντός του πλαισίου δείχνεται το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (3), όπου τα νεοσύστατα τμήματα ανασυνδυάζονται επικαλυπτόμενα και επεκτείνονται (διακεκομμένη γραμμή) προς το 3' άκρο για να σχηματιστεί το τελικό προϊόν. (II) Στην ένθεση η εισαγόμενη αλληλουχία στους εκκινητές b & c, απεικονίζεται με τη στικτά διακεκομμένη γραμμή. Τα 5' και 3' άκρα των εκκινητών είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία στόχο εκατέρωθεν της ένθεσης. (III) Στη διαγραφή, οι γραμμές (συνεχής και διακεκομμένη) των εκκινητών b & c υποδηλώνουν τη συμπληρωματική αλληλουχία με τη μητρική εκατέρωθεν του σημείου διαγραφής. Τα προϊόντα AB και CD που παράγονται χρησιμοποιώντας αυτούς τους εκκινητές αλληλεπικαλύπτονται στο σημείο της διαγραφής¹²⁰.

Πίνακας 2.1 Συνοπτική παρουσίαση των πλασμιδιακών και κατασκευών και των αντιστοιχών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

<i>Plasmid</i>	<i>gene</i>	<i>PCR product</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reversed primer</i>
<i>CMV flag 2 ActA</i>	<i>ActA</i>	<i>80bp</i>	<i>GCTCTAGATTAAT TCTTGCAATGTTA GC</i>	<i>GCCCTAGGTTAATT ATTTTTCTTAATTG AATAATTTGATAA ACG</i>
<i>gfp-Rab5 ΔC4</i>	<i>Rab5 ΔC4</i>	<i>633bp</i>	<i>CCGCTCGAGATGG CTAATCGAGGAGC</i>	<i>CCGGAATTCTTACT GACTCCTGGTTGGC TG</i>
<i>gfp-Rab5 S34N ΔC4</i>	<i>Rab5 S34N/ΔC4</i>	<i>633bp</i>	<i>CCGCTCGAGATGG CTAATCGAGGAGC</i>	<i>CCGGAATTCTTACT GACTCCTGGTTGGC TG</i>
<i>gfp-Rab5Q79L ΔC4-ActA</i>	<i>Rab5 Q79L/ΔC4- ActA</i>	<i>633bp</i>	<i>CCGCTCGAGATGG CTAATCGAGGAGC</i>	<i>CCGGAATTCTTACT GACTCCTGGTTGGC TG</i>
<i>flag-Rab5 ΔC4- ActA</i>	<i>Rab5 ΔC4-ActA</i>	<i>633bp</i>	<i>CCCAAGCTTATGG CTAATCGAGGAGC</i>	<i>GATGCTAGCCTGAC TCCTGGTTGGCTG</i>
<i>flag-Rab5 S34N ΔC4-ActA</i>	<i>Rab5 S34N/ΔC4- ActA</i>	<i>633bp</i>	<i>CCCAAGCTTATGG CTAATCGAGGAGC</i>	<i>GATGCTAGCCTGAC TCCTGGTTGGCTG</i>
<i>flag-Rab5 Q79L ΔC4-ActA</i>	<i>Rab5 Q79L/ΔC4- ActA</i>	<i>633bp</i>	<i>CCCAAGCTTATGG CTAATCGAGGAGC</i>	<i>GATGCTAGCCTGAC TCCTGGTTGGCTG</i>
<i>pCDNA3-ACAT2</i>	<i>ACAT2</i>	<i>1194bp</i>	<i>CCCAAGCTTATGA ATGCAGGCTCAGA TC</i>	<i>CCGCTCGAGTCATT CTCTCTGAACACAC A</i>
<i>gfp-ACAT2</i>	<i>ACAT2</i>	<i>1194bp</i>	<i>CCCAAGCTTATGA ATGCAGGCTCAGA TC</i>	<i>CCGCTCGAGTCATT CTCTCTGAACACAC A</i>
<i>gfp-ACAT2 C88S</i>	<i>ACAT2 C88S</i>	<i>274 bp</i>	<i>CCCAAGCTTATGA ATGCAGGCTCAGA TC</i>	<i>CAGATCATCTGGCT GCTCCATGCTG</i>
		<i>944 bp</i>	<i>CAGCATGGAGCA GCCAGATGATCTG</i>	<i>CCGCTCGAGTCATT CTCTCTGAACACAC A</i>
<i>mcherry-ACAT2</i>	<i>ACAT2</i>	<i>1194bp</i>	<i>CCGCTCGAGATGA ATGCAGGCTCAGA TC</i>	<i>GAATGCGGCCGCTC ATTCTCTCTGAACAC A</i>
<i>mcherry-ACAT2 C88S</i>	<i>ACAT2 C88S</i>	<i>274 bp</i>	<i>ATGAATGCAGGCT CAGATC</i>	<i>CAGATCATCTGGCT GCTCCATGCTG</i>
		<i>944 bp</i>	<i>CAGCATGGAGCA GCCAGATGATCTG</i>	<i>GAATGCGGCCGCTC ATTCTCTCTGAACAC A</i>

<i>mcherry-ACAT2 C92A</i>	ACAT2 C92A	285	CCGCTCGAGATGA ATGCAGGCTCAGA TC	GCCTGACCCAGCGA TCATCTGGCAG
		934	CTGCCAGATGATC GCTGGGTCAGGC	GAATGCGGCCGCTC ATTCTCTCTGAACAC A
<i>mcherry-ACAT2 N321D</i>	ACAT2 N321D	977 bp	CCGCTCGAGATGA ATGCAGGCTCAGA TC	GCTGCAAAGGCTTC ATCGATTTCAAATAT G
		247 bp	CATATTTGAAATC GATGAAGCCTTTG CAGC	GAATGCGGCCGCTC ATTCTCTCTGAACAC A
<i>flag-ACAT2-ActA</i>	ACAT2-ActA	1194bp	CCCAAGCTTATGA ATGCAGGCTCAGA TC	GCCTCTAGATTCTCT CTGAACACACATTG C
<i>GST-ACAT2 C92A</i>	ACAT2 C92A	285 bp	CCGCTCGAGATGA ATGCAGGCTCAGA TC	GCCTGACCCAGCGA TCATCTGGCAG
		934 bp	CTGCCAGATGATC GCTGGGTCAGGC	GAATGCGGCCGCTC ATTCTCTCTGAACAC A
<i>GST-ACAT2 N321D</i>	ACAT2 N321D	977 bp	CCGCTCGAGATGA ATGCAGGCTCAGA TC	GCTGCAAAGGCTTC ATCGATTTCAAATAT G
		247 bp	CATATTTGAAATC GATGAAGCCTTTG CAGC	GAATGCGGCCGCTC ATTCTCTCTGAACAC A
<i>GST-Rab5 S34N</i>	<i>Rab5 S34N</i>	650bp	-	-

2.3.4 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

2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Για τη μέτρηση συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (BCA™ Protein Assay Kit της εταιρείας 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 60°C 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 πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (Western blotting)

Για τη συλλογή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με διάλυμα 1% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, Sigma) σε PBS. 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. Ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά στους 100 °C και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.200 rpm, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Millipore). Για τον έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες βάφτηκαν με τη χρωστική Ponceau S (Serva) για 30 δευτερόλεπτα και πλύθηκαν με ddH₂O.

Οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου (RT), με διάλυμα δέσμευσης (5% γάλα σε διάλυμα 0.1% Tween 20 σε 1% PBS) για τη δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Ακολούθως, επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης στόχου.

Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης ACAT2 (42 kDa) πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης με το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, σε αραιώση 1:3.000, για την ανίχνευση 8 μg ολικής πρωτεΐνης εκχυλίσματος κυττάρων και ακολούθησε επώαση 1 ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ανίχνευση του υποδοχέα VEGFR2 χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της κυτταροπλασματικής του περιοχής (Cell Signaling, 1:3000) (επώαση O/N στους 4°C ή 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου). Για έλεγχο της ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι της πρωτεΐνης ακτίνη (MAB1501, κλώνος C4, Millipore, 1:10.000) με επώαση στους 4°C, O/N 4°C ή 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς και το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδοσωματικής πρωτεΐνης EEA1 (Early Endosomal Antigen 1, 170 kDa) σε αραιώση 1:3.000, με επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Ακολούθως, οι μεμβράνες πλύθηκαν 4 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα 0.1 % Tween 20 + 1 % PBS και επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP, Jackson Immunoresearch, 1:5000 σε διάλυμα δέσμευσης) για 1 ώρα, υπό ανάδευση, RT. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών σε διάλυμα Tween 20 + 1 % PBS, επώαση για 5 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Roche Diagnostics GmbH, Germany) και εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο.

2.4.4 Δοκιμασία προσδιορισμού της αποικοδόμησης του VEGFR2

Για την μελέτη της αποικοδόμησης του υποδοχέα VEGFR2, κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24-φρεατίων επιστρωμένα με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I. Μετά το πέρας των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών τα κύτταρα στερήθηκαν ορού για 2 ώρες και στην συνέχεια επώαστηκαν με κυκλοεξιμίδιο (Cycloheximide, Sigma, 25μg/ml), έναν αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στη συνέχεια τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF165 (50 ng/ml) για 0, 10, 20 και 30 λεπτά, αντίστοιχα. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με PBS και ακολούθησε λύση τους με διάλυμα 1% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, Sigma) σε PBS. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της αποικοδόμησης του υποδοχέα έγινε με ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (Western blotting). Με την παραπάνω μεθοδολογία είναι δυνατή η μελέτη του ποσοστού της

αποικοδόμησης του υποδοχέα μετά από επώαση με τον αυξητικό του παράγοντα για διαφορετικά χρονικά διαστήματα συγκρίνοντας τα επίπεδά του με τα αρχικά επίπεδα σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα (χρόνος 0 λεπτά).

2.4.5 Παρασκευή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με πρόσδεμα GST ή His

1. GST συνδεδεμένες πρωτεΐνες

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21 με το cDNA των υπό μελέτη πρωτεϊνών (GST-Rab5-GDP, ή GST-Rab27-GDP, ή GST-ACAT2, ή GST-ACAT2 C88S, ή GST-ACAT2 C92A). Προκαλλιέργεια των υπό μελέτη πρωτεϊνών αναπτύχθηκε υπό ανάδευση (200 rpm) έως $O.D_{600nm} \sim 0.6$ στους 25°C (η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 4 lt θρεπτικού LB). Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη IPTG (100 μM) και η καλλιέργεια παρέμεινε υπό ανάδευση (200 rpm) ολονυκτίως στους 25°C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιέχει 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 μg/ml RNase, 5 μg/ml DNase, protease inhibitors, 1 mM EDTA και 1 mM DTT. Για την περίπτωση των Rab πρωτεϊνών το διάλυμα λύσης περιέχει επιπλέον 100 μM GDP, 5 mM MgCl₂, ενώ δεν προστέθηκε το EDTA. Το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων λύθηκε χρησιμοποιώντας French press, συσκευή η οποία επιτρέπει την λύση των βακτηριακών τοιχωμάτων με εφαρμογή πίεσης 800-1000 psi και παράλληλη εξώθηση του κυτταρικού περιεχομένου από μία μικρή οπή. Στη συνέχεια, το προϊόν της κυτταρικής λύσης φυγοκεντρήθηκε στις 37.000 rpm για 90 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επώαστηκε για 2-3 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C με 600 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης (sepharose 4B beads).

Μετά την επώαση, το μίγμα τοποθετήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας και οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν μετά από πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA και 1 mM DTT (ή στην περίπτωση των Rab πρωτεϊνών με 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 μM GDP, 5 mM MgCl₂, και 1 mM DTT). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με διάλυμα έκλουσης (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 μM GDP, 5 mM

MgCl₂, 15 mM reduced glutathione, 1 mM DTT), και η ελευθέρη πρωτεΐνη συλλέχθηκε από τις στήλες χρωματογραφίας, ενώ ακολούθησε διαπύδηση για την απομάκρυνση της εναπομένουσας γλουταθειόνης.

Στις περιπτώσεις που η αφαίρεση του GST προσδέματος ήταν απαραίτητη (πχ για την παραγωγή ACAT2) εφαρμόστηκε ακόμα ένα βήμα μετά το στάδιο της έκπλυσης των σφαιριδίων. Συγκεκριμένα, αφού έγιναν οι απαραίτητες πλύσεις, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με την πρωτεάση PreScission, η οποία περιέχει το πρόσδεμα GST και επομένως παραμένει προσδεδεμένη στα σφαιρίδια μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης σχάσης. Πριν την προσθήκη της πρωτεάσης, η ποσότητα της GST-πρωτεΐνης που είναι συνδεδεμένη στα σφαιρίδια προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad), αφού προηγήθηκε επώαση μίας μικρής ποσότητας (20 μl) σφαιριδίων (τα οποία είναι συνδεδεμένα με την GST-πρωτεΐνη) με ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 15 mM ανηγμένη γλουταθειόνη/reduced glutathione, pH 8.5). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με την πρωτεάση PreScission (10 units/mg της GST-πρωτεΐνης) για 12 ώρες στους 4°C, υπό ανάδευση. Η απαλλαγμένη από το πρόσδεμα GST πρωτεΐνη συλλέχθηκε και επώαστηκε ξανά με 100 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης (glutathione-Sepharose 4B beads) για 2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν μόρια GST-PreScission ή GST πρωτεΐνης που πιθανώς να είχαν διαφύγει στο προηγούμενο στάδιο επώασης με την πρωτεάση.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bio-Rad. Το πρωτεϊνικό προφίλ όλων των σταδίων του πρωτοκόλλου καθαρισμού εξετάστηκε με χρωματογραφία SDS-PAGE και χρώση coomassie blue.

2. His-GDIa

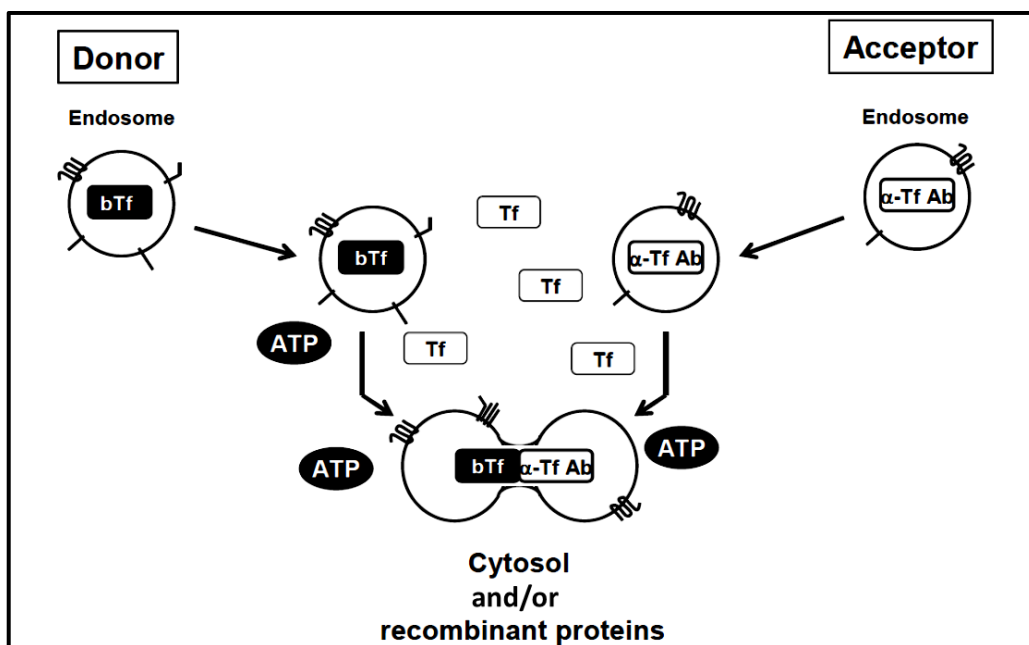
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21 με το cDNA της His-GDIa. Εν συντομία, 4 λίτρα θρεπτικού μέσου LB-αμπικιλίνης και χλωραμφενικόλης σε 4 φιάλες 5 λίτρων αναπτύχθηκαν στους 25°C σε κυτταρική πυκνότητα 2,0 κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιέχει 500 mM NaCl, 50 mM NaH₂P0₄ pH 8.0, 5 μg/ml RNase, 5 μg/ml DNase, 10 mM ιμιδαζόλιο και protease inhibitors. Το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων λύθηκε

χρησιμοποιώντας French press στα 800-1000 psi. Στη συνέχεια, το προϊόν της κυτταρικής λύσης φυγοκεντρήθηκε στις 37.000 rpm για 90 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο επώαστηκε με 500 μl σφαιριδίων νικελίου (nikel beads), για 2 ώρες στους 4 ° C υπό ανάδευση. Οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης που περιείχε 500 mM NaCl, 50 mM NaH₂P₀₄ pH 8,0 και 20 mM ιμιδαζόλιο. Τα σφαιρίδια επώαστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (500 mM NaCl, 50 mM NaH₂P₀₄ pH 8.0, 250 mM ιμιδαζόλιο). Η εκλούμενη πρωτεΐνη συλλέχθηκε από τις στήλες χρωματογραφίας και ακολούθησε διαπύδηση σε ρυθμιστικό που περιείχε 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης His-GDI μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bio-Rad. Το πρωτεϊνικό προφίλ όλων των σταδίων του πρωτοκόλλου καθαρισμού εξετάστηκε με χρωματογραφία SDS-PAGE και χρώση coomassie blue (Εικόνα 2.6).

2.4.6 Δοκιμασία της *in vitro* ομοτυπικής σύντηξης πρώιμων ενδοσωμάτων

Η *in vitro* ομοτυπική σύντηξη πρώιμων των ενδοσωμάτων είναι μία καλά καθιερωμένη δοκιμασία^{52,96-98}, με την οποία προσδιορίζεται ο βαθμός της σύντηξης μεταξύ ενδοσωμάτων "δοτών" και ενδοσωμάτων "δεκτών" παρουσία κυτταροπλάσματος (Εικόνα 2.7). Τα ενδοσώματα "δότες" και "δέκτες" απομονώθηκαν από δύο ξεχωριστές καλλιέργειες κυττάρων HeLa μετά την εσωτερίκευση βιοτινυλιωμένης τρανσφερίνης και αντισωμάτων έναντι τρανσφερίνης, αντιστοίχως. Αυτοί οι ενδοσωματικοί πληθυσμοί αναμίχθηκαν με κυτταρόπλασμα απομονωμένο από κύτταρα HeLa και ATP και στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37 °C για 20 λεπτά. Κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης, η σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων οδήγησε στο σχηματισμό βιοτινυλιωμένων ανοσοσυμπλεγμάτων, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα ενδοσώματα λύθηκαν με επώαση σε Triton X-100 και τα σύμπλοκα βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων προσδέθηκαν σε επικαλυμμένες με στρεπταβιδίνη επιφάνειες (τρυβλία 96-φρεατίων). Η ποσότητα των συμπλόκων (η οποία είναι ευθέως ανάλογη με τον βαθμό της σύντηξης των ενδοσωμάτων), εκτιμήθηκε με επώαση των επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη επιφανειών με δευτερογενή αντισώματα κονίκλου έναντι προβάτου συζευγμένα με MSD SULFO-TAG (Ruthenium (II) tris-bipyridine). Μετά από τρεις πλύσεις, η ηλεκτροχημειοφωταύγεια προσδιορίζεται ποσοτικά από το SECTOR Imager 6000 (MSD). Αυτό το σύστημα ηλεκτροχημειοφωταύγειας έχει τα πλεονεκτήματα της υψηλής ευαισθησίας και της δυναμικής εμβέλειας, καθώς και τα μειωμένα σήματα υποβάθρου⁵². Η προσθήκη μη σημασμένης τρανσφερίνης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης

σύντηξης εμποδίζει τον σχηματισμό μη ειδικών ανοσο-συμπλόκων που προκύπτουν από διαρροή των εσωτερικευμένων δεικτών κατά τη λύση της μεμβράνης, καθώς και κατά τη διάρκεια της λύσης με απορρυπαντικό.



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της *in vitro* ομοτυπικής σύντηξης των πρώιμων ενδοσωμάτων. Δύο ξεχωριστοί πληθυσμοί *HeLa* κυττάρων επωάστηκαν με biotin-transferrin (**bTf**) ή sheep anti-transferrin αντισώματα (**a-Tf Ab**), τα οποία -μέσω ενδοκυττάρωσης- εισήχθησαν σε ενδοσώματα “δότες” (“*donor*” endosomes) ή “δέκτες” (“*acceptor*” endosomes), αντίστοιχα. Στην συνέχεια, αφού οι δύο ομάδες ενδοσωμάτων απομονώθηκαν από τα κύτταρα, αναμείχθηκαν και έγινε προσθήκη **κυτταροπλάσματος** και **ATP**, ενώ ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στους 37°C. Οι παραπάνω συνθήκες επιτρέψαν σύντηξη την μεταξύ ενδοσωμάτων, άρα και την ανάμειξη του περιεχομένου τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ της **bTf** και των **a-Tf Abs**. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερης **Tf** (μη σημασμένης με biotin) στο μίγμα της αντίδρασης, εξασφάλισε την δέσμευση αντισώματος, το οποίο μπορεί να εξέλθει από τα ενδοσώματα, αποφεύγοντας έτσι την μέτρηση συμπλόκων τα οποία σχηματίστηκαν ανεξάρτητα της σύντηξης των ενδοσωμάτων. Επομένως, μετρήθηκαν μόνο όσα σύμπλοκα **bTf** και **a-Tf Abs** δημιουργήθηκαν λόγω σύντηξης των ενδοσωμάτων. Να σημειωθεί ότι όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της σύντηξης των ενδοσωμάτων, τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό του συμπλόκου που σχηματίζεται. Έπειτα, οι ενδοσωματικές μεμβράνες λύθηκαν παρουσία διαλύματος Triton X-100 και τα σύμπλοκα δεσμεύτηκαν σε με επιφάνειες τρυβλίων 96-φρεατίων με επικάλυψη στρεπταβιδίνης (streptavidin). Η ποσότητα του συμπλόκου που σχηματίστηκε (η οποία είναι ευθέως ανάλογη του ποσοστού της σύντηξης των ενδοσωμάτων), εκτιμήθηκε μετά από επώαση των επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη τρυβλίων με δευτερογενή αντισώματα έναντι προβάτου, τα οποία είναι συνδεδεμένα με Ρουδένιο (rabbit anti-sheep secondary antibodies coupled to MSD sulfo-TAG). Τέλος, μετά από τρεις πλύσεις, η ηλεκτροχημειοφωτάγεια μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Sector Imager 6,000 (MSD)⁴⁶.

2.4.7 Δοκισία μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της ACAT2

Οι ανασυνδυασμένες ACAT2 και ACAT2 C92A πρωτεΐνες παρασκευάστηκαν απομονώθηκαν από βακτήρια, όπως αναφέρεται και την ενότητα 2.4.5. Η μέτρηση της ενζυμικής τους ενεργότητας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της μετατροπής του υποστρώματος του ενζύμου σε προϊόν, δηλαδή της διάσπασης ακετοακέτυλο συνενζύμου A (acetoacetyl-CoA) σε ακέτυλο συνένζυμο A (acetyl-CoA). Το acetoacetyl-CoA δημιουργεί ένα ενολικό σύμπλοκο με τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) και το ενολικό σύμπλοκο acetoacetyl-CoA με το Mg^{2+} απορροφά στα 303nm, με την απορρόφηση να είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του στο διάλυμα¹²¹⁻¹²³.

Γνωστές ποσότητες ενζύμου επώαστηκαν με acetoacetyl-CoA 200μM και CoA 200μM σε διάλυμα που περιείχε 100 mM Tris-HCl pH 7.5 και 5 mM $MgCl_2$. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε γυάλινη κυψελίδα και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αρχικής απορρόφησης του acetoacetyl-CoA στα 303nm. Στη συνέχεια, έγινε η προσθήκη γνωστής ποσότητα από το ένζυμο και σύντομη ανάδευση του συνολικού μίγματος. Αμέσως μετά, μετρήθηκε η απορρόφηση του ενολικού συμπλόκου acetoacetyl-CoA με το Mg^{2+} (με απλό φωτόμετρο) για περίπου 1 με 5 λεπτά, μέχρι την λήξη της αντίδρασης ή της εξάντλησης του υποστρώματος. Οι τιμές της απορρόφησης καταγράφονταν κάθε 10 με 20 δευτερόλεπτα.

2.4.8 Δοκιμασία *in vitro* ακετυλίωσης της ανασυνδυασμένης Rab5-GDP και ταυτοποίηση της με φασματομετρία μάζας

Για την μελέτη της ακετυλίωσης της Rab5-GDP καθαρίστηκαν και απομονώθηκαν οι εξής ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, Rab5-GDP, Rab27a-GDP, ACAT2 και ACAT2C92A, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4.5. Στη συνέχεια, γνωστές συγκεντρώσεις των Rab5-GDP και Rab27a-GDP επώαστηκαν με ACAT2, σε μοριακή αναλογία 1:1 και 1:10. Επιπλέον, Rab5-GDP επώαστηκε και με ACAT2C92A, με μοριακή αναλογία 1:10. Ο συνδυασμός Rab27a-GDP- ACAT2 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας για την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης, ενώ ο συνδυασμός Rab5-GDP- ACAT2C92A χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την εξάρτηση της ακετυλίωσης από την ενζυμική δραστηριότητα της ACAT2. Στο μίγμα της αντίδρασης σε όλες τις περιπτώσεις προστέθηκαν 40mM Tris-HCl pH 7.5, 75mM KCl, 100μM GDP, 1mM DTT και 5mM

MgCl₂. Τα δείγματα επώαστηκαν αρχικά στον πάγο για 2 ώρες ώστε να επιτραπεί η σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, στο μίγμα προστέθηκε 1mM acetyl-CoA και τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 30°C. Ακολούθησε προσθήκη 1x διαλύματος Laemmli στα δείγματα και βρασμός τους στους 95°C για 5 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα αναλύθηκαν με ν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Οι ζώνες κοντά στο μοριακό βάρος της Rab5 και της Rab27a, αντίστοιχα, απομονώθηκαν από την πηκτή. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας σε επίπεδο νανοκλίμακας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (nano LC-MS/MS) και η ταυτοποίηση των ακετυλιωμένων καταλοίπων πραγματοποιήθηκε με εργαλεία βιοπληροφορικής (η ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία μάζας πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του κ. Αϊβαλιώτη, Μ., ΙΤΕ/IMBB, Ηράκλειο).

2.4.9 Δοκιμασία ελέγχου της εξειδίκευσης της *in vitro* αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ACAT2 και Rab5-GDP/ Rab27a-GDP

Η παρασκευή και ο καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-Rab5-GDP, GST-Rab27-GDP και ACAT2 πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.5. Για τις περιπτώσεις των GST-Rab5-GDP και GST-Rab27-GDP ο καθαρισμός σταμάτησε πριν την έκλουση έτσι ώστε να παραμείνουν οι πρωτεΐνες δεσμευμένες στα σφαιρίδια. Στην συνέχεια, αφού προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των GST-Rab5-GDP και GST-Rab27-GDP ανά ml σφαιριδίων, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με γνωστές ποσότητες ACAT2 για 2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

Αρχικά, 2mg GST-Rab5 GDP ή GST-Rab27 GDP προσδέθηκαν σε 100μl σφαιριδίων γλουταθειόνης (Sephrose 4B glutathione beads), αντίστοιχα, και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες των 1,5ml (eppendorf) ενώ ακολούθησαν πλύσεις με διάλυμα που περιείχε 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM GDP, 5 mM MgCl₂, και 1 mM DTT. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 1,2mg της ανασυνδυασμένης ACAT2, τα οποία βρίσκονταν σε 50μl διαλύματος με την ίδια σύσταση με τις παραπάνω πρωτεΐνες, και τα δείγματα επώαστηκαν για δύο ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των πρωτεϊνών. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ήπια για σύντομο χρονικό διάστημα στους 4°C, ώστε να

γίνει καθίζηση των σφαιριδίων και να διαχωριστούν από το διάλυμα το οποίο βρίσκονταν. Το υπερκείμενο διάλυμα που αφαιρέθηκε από τα δείγματα περιείχε την πρωτεΐνη ACAT2, η οποία δεν συνδέθηκε στις ανασυνδυασμένες GST-Rab5 GDP και GST-Rab27 GDP, αντίστοιχα. Ακολούθησαν πέντε πλύσεις των σφαιριδίων με 1ml διαλύματος 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM GDP, 5 mM MgCl₂, και 1 mM DTT, για την πλήρη απομάκρυνση της ελεύθερης ACAT2. Έγινε μία ακόμα πλύση των σφαιριδίων με 500μl διαλύματος 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 και 1 mM DTT, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό στους 4°C και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.

Τα 100μl σφαιριδίων που περιείχαν την GST-Rab5 GDP ή την GST-Rab27 GDP, αντίστοιχα, διαχωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη και τοποθετήθηκαν σε νέους πλαστικούς σωλήνες των 1,5ml ώστε να γίνει έκλυση της συνδεδεμένης ACAT2 με δύο διαφορετικούς τρόπους σύμφωνα με πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν^{88,124}. Στην πρώτη περίπτωση, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με 100μl διαλύματος έκλυσης με EDTA (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1 mM DTT). Το EDTA χρησιμοποιήθηκε για την αφαίρεση του Mg²⁺-GDP από τις GST-Rabs, απελευθερώνοντας έτσι και την ACAT2 που ήταν συνδεδεμένη στην GST-Rab5a. Στην δεύτερη περίπτωση, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με 100μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1mM GDP, 15 mM ανηγμένη γλουταθειόνη/reduced glutathione, pH 8.5), ώστε να απελευθερωθούν από τα σφαιρίδια οι GST-Rabs. Στο δείγμα που περιείχε GST-Rab5a, η ACAT2 εκλούστηκε ως σύμπλεγμα με την GST-Rab5a. Γνωστές ποσότητες των δειγμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τέλος, για τα δείγματα που περιείχαν είτε ελεύθερη ACAT2 είτε EDTA-εκλουσμένη ACAT2, έγινε έλεγχος της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με Bradford. Για τα δείγματα της ACAT2 στα οποία έγινε έκλυση με ανηγμένη γλουταθειόνη δεν ήταν δυνατή η μέτρηση της συγκέντρωσης της ACAT2 αυτής καθαυτής, καθώς τα δείγματα περιείχαν και GST-Rabs.

Παρόμοια πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ACAT2 και Rab5. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία, μετά την ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE), ακολούθησε μεταφορά των

πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, έγινε πλύση των μεμβρανών με διάλυμα PBS-Tween20 0.1%, και στην συνέχεια έγινε χρώση των μεμβρανών με διάλυμα μελάνης (Ink Staining) το οποίο περιείχε μελάνι (Indian Ink) με σύσταση 0,1%(v/v) σε διάλυμα PBS-Tween20.

2.4.10 Δοκιμασία της *in vitro* στρατολόγησης της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα

Για την δοκιμασία της *in vitro* στρατολόγησης της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα χρησιμοποιήθηκε κυτταρόπλασμα, πρώιμα ενδοσώματα και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ACAT2 φυσικού τύπου. Η απομόνωση του κυτταροπλάσματος και των ενδοσωμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στις *in vitro* δοκιμασίες σύντηξης, ενώ η ανασυνδυασμένη ACAT2 παρασκευάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 2.4.5. Πρώιμα ενδοσώματα (σε τελική συγκέντρωση 0,15 μg/μl) επώαστηκαν με κυτταρόπλασμα (σε τελική συγκέντρωση 5,6 μg/μl), ή χωρίς αυτό, παρουσία της ανασυνδυασμένης ACAT2 (σε τελική συγκέντρωση 180 μM) και ενέργειας (creatine phosphate, creatine kinase & ATP, με αναλογία 1:1:1), για 30 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm). Στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκε κυτταρόπλασμα, προστέθηκε διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (BSA) ίδιας πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με το κυτταρόπλασμα. Όλα τα δείγματα είχαν τελικό όγκο 80 μl και η προετοιμασία τους έγινε στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (100.000g) στους 4°C σε σωλήνες, στον πυθμένα των οποίων είχαν τοποθετηθεί 100 μl διαλύματος σουκρόζης 20%. Ακολούθησε πλύση των σωλήνων με διάλυμα PBS, επαναφυγοκέντρωση (100.000g) και επώαση με διάλυμα SDS-PAGE για 30 λεπτά στους 37°C ώστε να επαναδιαλυθεί το ίζημα που περιείχε τα ενδοσώματα, και ακολούθησε βρασμός στους 100°C. Η ανάλυση όλων των δειγμάτων έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενώ χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών EEA1 (1:3000), Rab5 (1:1000) & ACAT2 (1:1000). Η επώαση με τα αντισώματα EEA1 και ACAT2 διήρκησε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για την Rab5 η επώαση έγινε για 12 ώρες (O/N) στους 4°C.

2.5 Μορφολογικές μέθοδοι

2.5.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες, που είχαν προ-επωαστεί με κολλαγόνο τύπου 1, ενώ κύτταρα HepG2 και HeLa σε καλυπτρίδες χωρίς υπόστρωμα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επεξεργάστηκαν στις διάφορες συνθήκες, ανάλογα με τον εκάστοτε πειραματικό στόχο. Με το πέρας της επεξεργασίας, έγινε πλύση των κυττάρων 3 φορές με PBS και 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 1 ώρα 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 Μελέτη της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2 με *in vivo* δοκιμασία.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της Rab5 με την ACAT2 σε συνθήκες *in vivo* (σε *ανέπαφα κύτταρα*), έγινε χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser σε μονιμοποιημένα κύτταρα HepG2 και HUVEC. Αρχικά, οι πρωτεΐνες FLAG-Rab5ΔC4 (φυσικού τύπου, S34N και Q79L), στις οποίες προστέθηκε το πρόσδεμα ActA, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή τους στα μιτοχόνδρια, υπερεκφράστηκαν σε HepG2 και HUVE κύτταρα ¹²⁵. Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα επώαστηκαν για 40 λεπτά με την χρωστική Mitotracker Deep Red FM ώστε να γίνει σήμανση των μιτοχονδρίων και ανίχνευση των μιτοχονδριακών δομών στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, έγινε

μονιμοποίηση κυττάρων και ακολούθησε ανοσοφθορισμός όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.5.1. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών FLAG-Rab5 Δ C4 -ActA, FLAG-Rab5S34N/ Δ C4 -ActA και FLAG-Rab5Q79L/ Δ C4 -ActA χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι του flag προσδέματος αραιωμένο (1:3000) σε διάλυμα PBS με ορό, ενώ για την ανίχνευση της ενδογενούς ACAT2 χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα αραιωμένο (1:50) σε διάλυμα PBS με ορό. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα δευτερογενή αντισώματα Alexa 488 και Alexa 594, αντίστοιχα.

2.5.3 Συνεστιακή μικροσκοπία

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών μελετήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 II (IMBB/ITE, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας, Ιωάννινα) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite. Για την παρακολούθηση χρησιμοποιήθηκε ο φακός Leica 63x 1.4 NA oil UV. Η συχνότητα σάρωσης πραγματοποιήθηκε στα 400 Hz, με διάφραγμα δέσμης (pinhole) 1 AU (Airy) και ανάλυση εικόνας 512x512 pixels.

2.5.4 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση

Η ποσοτικοποίηση των ανασοαποτυπώσεων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ (NIH). Στα πειράματα ανοσοφθορισμού, οι μετρήσεις των ενδοσωματικών παραμέτρων (αριθμός ενδοσωμάτων, ένταση φθορισμού, μέγεθος ενδοσωμάτων) υπολογίστηκε μέσω του λογισμικού ImageJ, μετά από ανάλυση των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας. Τα γραφήματα απεικονίζουν τις μέσες τιμές \pm τη μέση τυπική απόκλιση (S.E.M.) ή την τυπική απόκλιση (S.D.) των τιμών και υπολογίστηκαν μετά από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις των ανά συνθήκη πειραματικών διατάξεων. Οι στατιστικές διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω στατιστικής ανάλυσης student t-test (για την ανάλυση δύο ομάδων) ή μέσω ανάλυσης ANOVA (για την ανάλυση τριών ή περισσότερων ομάδων) ακολουθούμενη από ανάλυση Bonferroni (posttests).

2.6 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry, ITC)

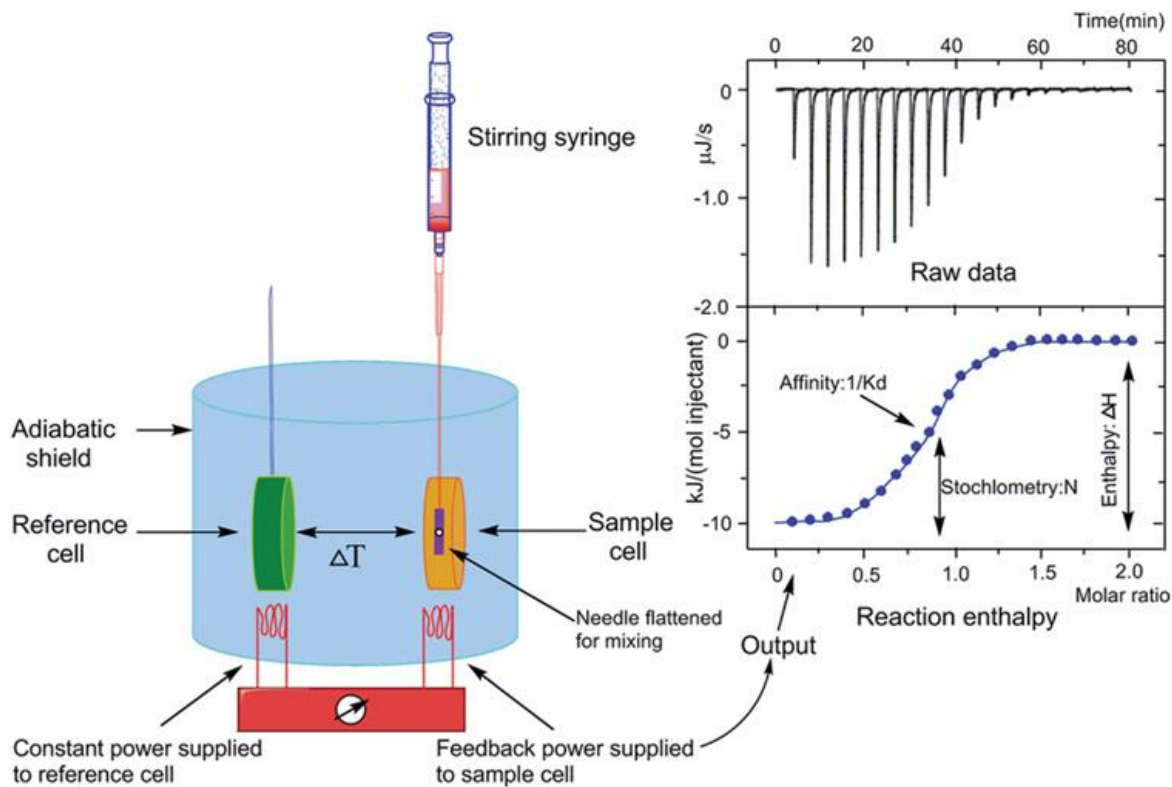
Η Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης ή ITC είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων των αλληλεπιδράσεων σε ένα διάλυμα. Συχνά χρησιμοποιείται για να μελετήσει τη δέσμευση μικρών μορίων (όπως φαρμακευτικών ενώσεων) σε μεγαλύτερα μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA κλπ.). Αποτελείται από δύο κυψέλες που περικλείονται σε ένα αδιαβατικά τοιχώματα. Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) είναι μια τεχνική η οποία μπορεί να υπολογίσει διάφορες θερμοδυναμικές παραμέτρους - ενθαλπία (ΔH), εντροπία (ΔS), ελεύθερη ενέργεια (ΔG) που σχετίζεται επίσης με σταθερά δέσμευσης ισορροπίας (K_a) και στοιχειομετρία – σε ένα πείραμα. Η ενθαλπία της σύνδεσης παρέχει μια εικόνα για το πώς οι ευνοϊκές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι δεσμοί H και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεσολαβούν στην σύνδεση ενώ η εντροπία της σύνδεσης προκύπτει λόγω αλλαγών στον περιορισμό / ελευθερία των ατόμων του κύριου σκελετού μιας πρωτεΐνης και των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και της αναδιάταξης ή απελευθέρωσης μορίων νερού και ιόντων στον διαλύτη. Ο υπολογισμός των παραπάνω παραμέτρων είναι σημαντικός για την κατανόηση της σχέσης μεταξύ δομής, της κινητικής, θερμοδυναμικής και λειτουργίας των ορίων, που σε διαφορετική περίπτωση δεν μπορούν αναλυθούν από την εξέταση μόνο των δομών και της μελέτης των αμινοξικών μεταλλαγών.

Η ITC τεχνική χρησιμοποιείται συνήθως για τη μελέτη της δέσμευσης μιας πρωτεΐνης σε άλλες πρωτεΐνες, πεπτίδια και DNA. Μετρά απευθείας την ισορροπία σύνδεσης προσδιορίζοντας την θερμότητα που παράγεται από την δέσμευση ενός μορίου στον συνδέτη του. Η θερμοδυναμική της σύνδεσης δύο μορίων χαρακτηρίζεται από τη στοιχειομετρία της αλληλεπίδρασης (n), τη σταθερά σύνδεσης (K_a), την ελεύθερη ενέργεια (ΔG_b), την ενθαλπία (ΔH_b), την εντροπία (ΔS_b) και τη θερμοδυναμική ικανότητα σύνδεσης (ΔC_p). Σε ένα μόνο πείραμα, προσδιορίζονται οι τιμές της σταθεράς σύνδεσης (K_a), της στοιχειομετρίας (n) και της ενθαλπίας της δέσμευσης (ΔH_b). Η εξάρτηση της παραμέτρου ΔH_b από την θερμοκρασία, που διεξάγεται με δοκιμές της τιτλοδότησης σε διάφορες θερμοκρασίες, περιγράφει τον όρο ΔC_p . Η ελεύθερη ενέργεια (G) και η εντροπία της δέσμευσης προσδιορίζονται από τη σταθερά σύνδεσης. Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τις δομικές πληροφορίες, μπορούν να προσφέρουν μια πλήρη

εικόνα της αλληλεπίδρασης και να βοηθήσουν στην αναγνώριση των σημαντικότερων περιοχών της διασύνδεσης.

Η διάταξη του μηχανήματος που χρησιμοποιείται για την τεχνική ITC περιγράφεται στην εικόνα 2.8. Συνοπτικά, στο εσωτερικό του μηχανήματος υπάρχουν δύο διακριτοί θάλαμοι, οι οποίοι περιβάλλονται από αδιαβατικά τοιχώματα, για αποφυγή επικοινωνία του εσωτερικού του θαλάμου με το εξωτερικό περιβάλλον. Ο θάλαμος αναφοράς (reference cell), περιέχει μόνο τον διαλύτη των πρωτεϊνών ως σημείο αναφοράς (κυρίως dH₂O), και ο θάλαμος των δειγμάτων (sample cell), στον οποίο διεξάγεται το κύριο πείραμα της θερμιδομετρίας, περιέχει την μία από τις δύο αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες. Για τις θερμιδομετρικές μετρήσεις πρέπει να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία, για τον λόγο αυτό παρέχεται τόση ενέργεια στον θάλαμο των δειγμάτων όση απαιτείται, για να έχουν οι δύο θάλαμοι ακριβώς ίδια θερμοκρασία μεταξύ τους. Το μηχάνημα διαθέτει μία σύριγγα στην οποία προστίθεται η άλλη πρωτεΐνη. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που βρίσκεται στην σύριγγα είναι 10 φορές τουλάχιστον πυκνότερη από εκείνη που τοποθετείται στον θάλαμο των δειγμάτων, για να επέλθει τελικά κορεσμός στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση και να υπολογιστούν οι θερμοδυναμικές παράμετροι. Η σύριγγα τοποθετεί την δεύτερη πρωτεΐνη στο εσωτερικό του θαλάμου των δειγμάτων και πραγματοποιεί τιτλοδότηση. Το διάλυμα εντός του θαλάμου βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση για ομοιόμορφη κατανομή των πρωτεϊνών στο διάλυμα.

Όταν μια πρωτεϊνική αλληλεπίδραση είναι εξώθερμη, απελευθερώνεται θερμότητα στον θάλαμο των δειγμάτων αυξάνοντας την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, οι διαφορές της θερμοκρασίας γίνονται αισθητές στον θάλαμο δειγμάτων και η ισχύς που του παρέχεται μειώνεται, έτσι ώστε να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία μεταξύ των δύο θαλάμων. Η μείωση της ισχύος στον θάλαμο των δειγμάτων στην πάροδο του χρόνου θεωρείται είναι το μετρήσιμο μέγεθος κατά την διεξαγωγή της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (μcal/sec ή μJ/sec). Το αντίθετο συμβαίνει όταν μια πρωτεϊνική αλληλεπίδραση είναι ενδόθερμη. Μετά το πέρας της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών στον θάλαμο (λίγα δευτερόλεπτα μετά την τιτλοδότηση), το σύστημα επανέρχεται σε κατάσταση ισορροπίας μέχρι την επόμενη τιτλοδότηση ¹²⁶.



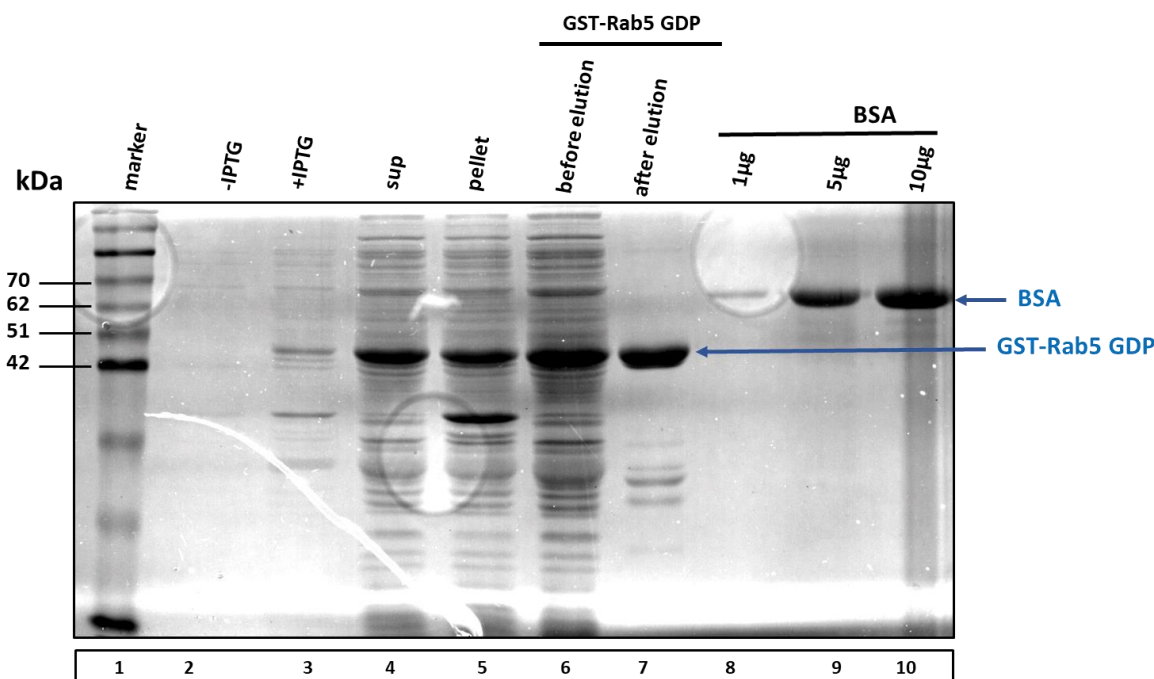
Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ενός μηχανήματος θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης που μετρά αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών. Η αντίδραση της αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών είναι εξώθερμη, πράγμα που σημαίνει ότι ο θάλαμος του δείγματος θερμαίνεται περισσότερο από τον θάλαμο αναφοράς και προκαλεί μια καθοδική κορυφή στο σήμα. Καθώς η θερμοκρασία των δύο θαλάμων επανέρχεται στο ίδιο επίπεδο, το σήμα επιστρέφει στην αρχική του θέση. Ένα δεύτερο μικρό δείγμα της πρωτεΐνης που βρίσκεται στην σύριγγα, εγχέεται εντός του θαλάμου του δείγματος και για ακόμα μια φορά ο μικροθερμιδομετρητής αντισταθμίζει την μικρή μεταβληθείσα θερμότητα που ανιχνεύεται από το σύστημα. Η γραμμομοριακή αναλογία μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, αυξάνεται σταδιακά μέσω συνεχούς προσθήκης της πρωτεΐνης που βρίσκεται στη σύριγγα. Η πρωτεΐνη που βρίσκεται στο θάλαμο του δείγματος σταδιακά φτάνει σε κορεσμό, η πρόσδεση της δεύτερης πρωτεΐνης μειώνεται και η αλλαγή θερμότητας αρχίζει να μειώνεται έως ότου τελικά ο θάλαμος του δείγματος να περιέχει περίσσεια της πρωτεΐνης που βρισκόταν στη σύριγγα, έναντι της πρωτεΐνης του θαλάμου, με αποτέλεσμα να επέρχεται ο κορεσμός στην αντίδραση της αλληλεπίδρασης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημιουργία μοριακών εργαλείων για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2.

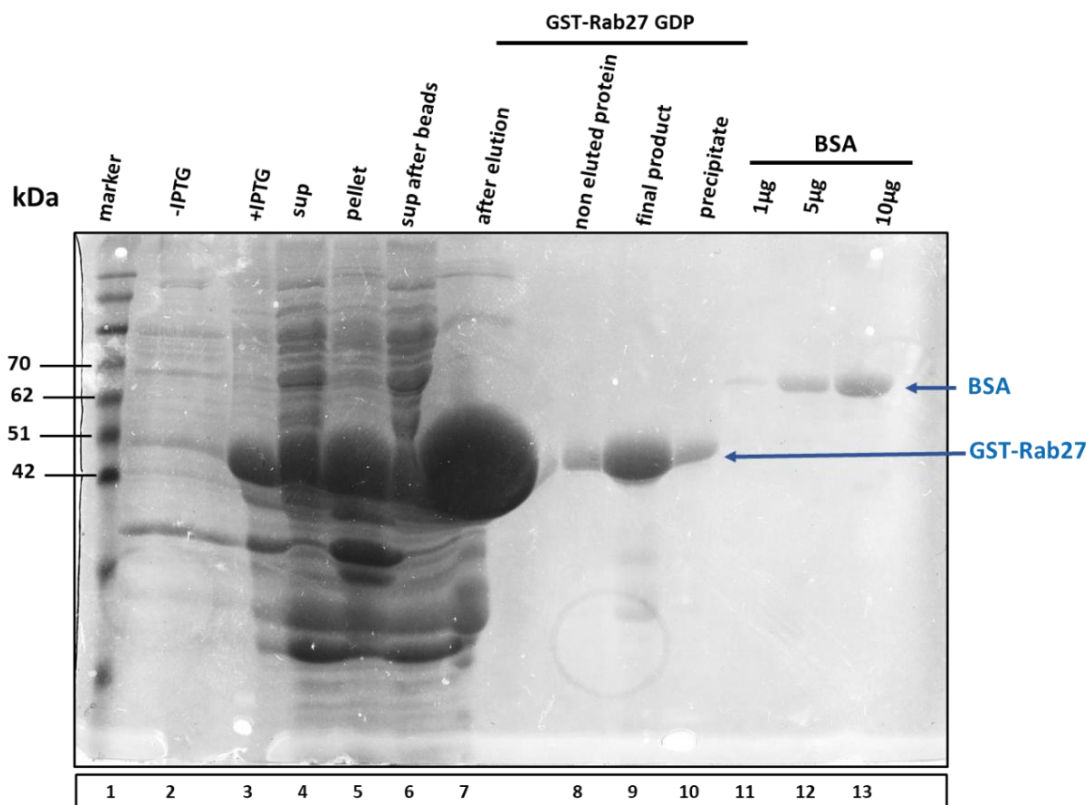
Η ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης της Rab5-GDP με την ACAT2 (Εισαγωγή παράγραφος 1.5), αποτέλεσε την βάση για την παρούσα μελέτη. Προκειμένου να μελετήσουμε την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης της Rab5-GDP με την ACAT2, *in vitro*, παρασκευάστηκαν πλασμίδια για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη. Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε *in vitro* βιοχημικές δοκιμασίες (πειράματα προσδιορισμού της αγχιστείας σύνδεσης, δοκιμασίες σύντηξης ενδοσωμάτων, προσδιορισμό ενζυμικής κινητικής κ.α.). Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι παραπάνω *in vitro* δοκιμασίες παρασκευάστηκαν οι πρωτεΐνες Rab5-GDP, Rab27-GDP, ACAT2, ACAT2 C92A και Rab-GDI μέσω έκφρασης σε βακτήρια *E.coli*, συζευγμένες με το πρόσδεμα GST ή 6-His. Ακολούθησε καθαρισμός τους με τη χρήση σφαιριδίων που στοχεύουν στον επίτοπο GST ή His, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bio-Rad, ενώ το πρωτεϊνικό προφίλ όλων των σταδίων του πρωτοκόλλου καθαρισμού εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250 (Εικόνες 3.1-3.5).

Rab5-GDP



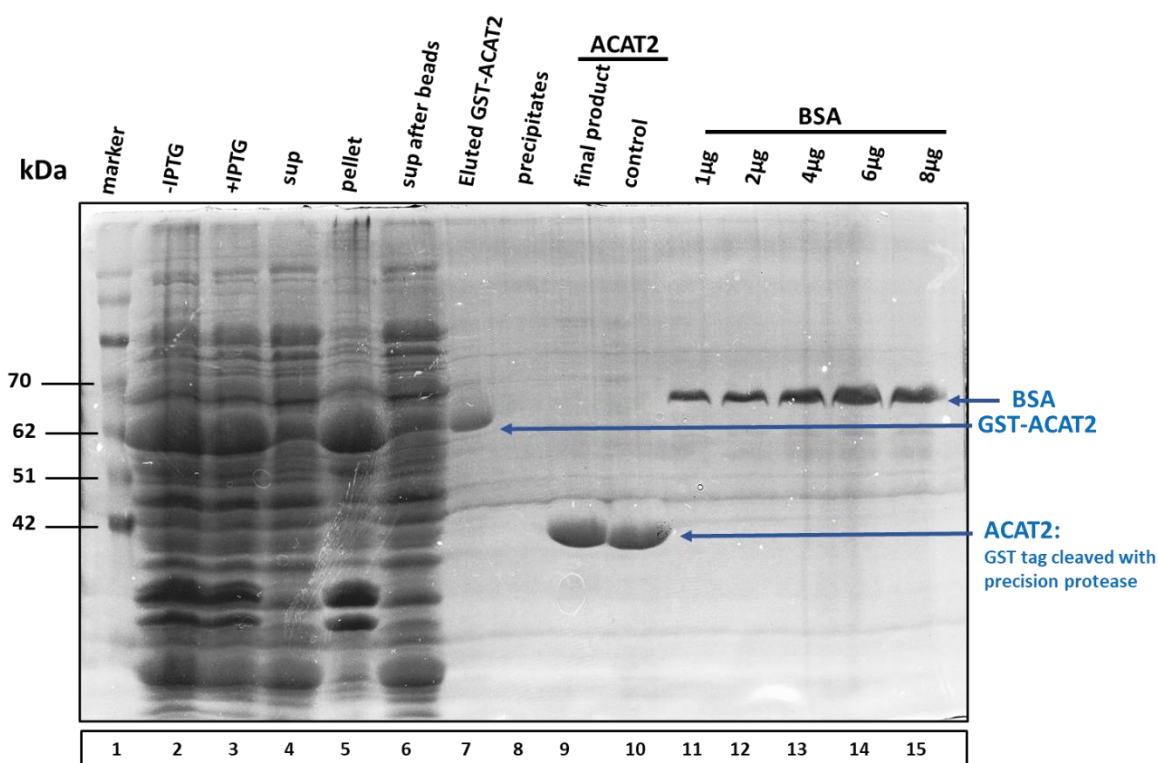
Εικόνα 3.1: Στάδια καθαρισμού της *GST-Rab5*. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της *GST-Rab5*. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη 100 μ M IPTG. Ο καθαρισμός της *GST-Rab5* διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή *GST-Rab5* υπέστη διαπίδωση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα εκάστοτε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (**marker**): μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών (*protein marker*), (**-IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα πριν την επαγωγή με IPTG, (**+IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα μετά την επαγωγή με IPTG, (**sup**): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο *French pressure* και υπερφυγοκέντρηση, (**pellet**): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο *French pressure* και υπερφυγοκέντρηση, (**before elution**): *GST-Rab5* η οποία προσδέθηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης και πριν γίνει έκλυση με ανηγμένη γλουταθειόνη, (**after elution**): *GST-Rab5* μετά από έκλυση των σφαιριδίων γλουταθειόνης, (**BSA**): 1, 5 & 10 μ g BSA (για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καθαρισμένης πρωτεΐνης).

Rab27-GDP



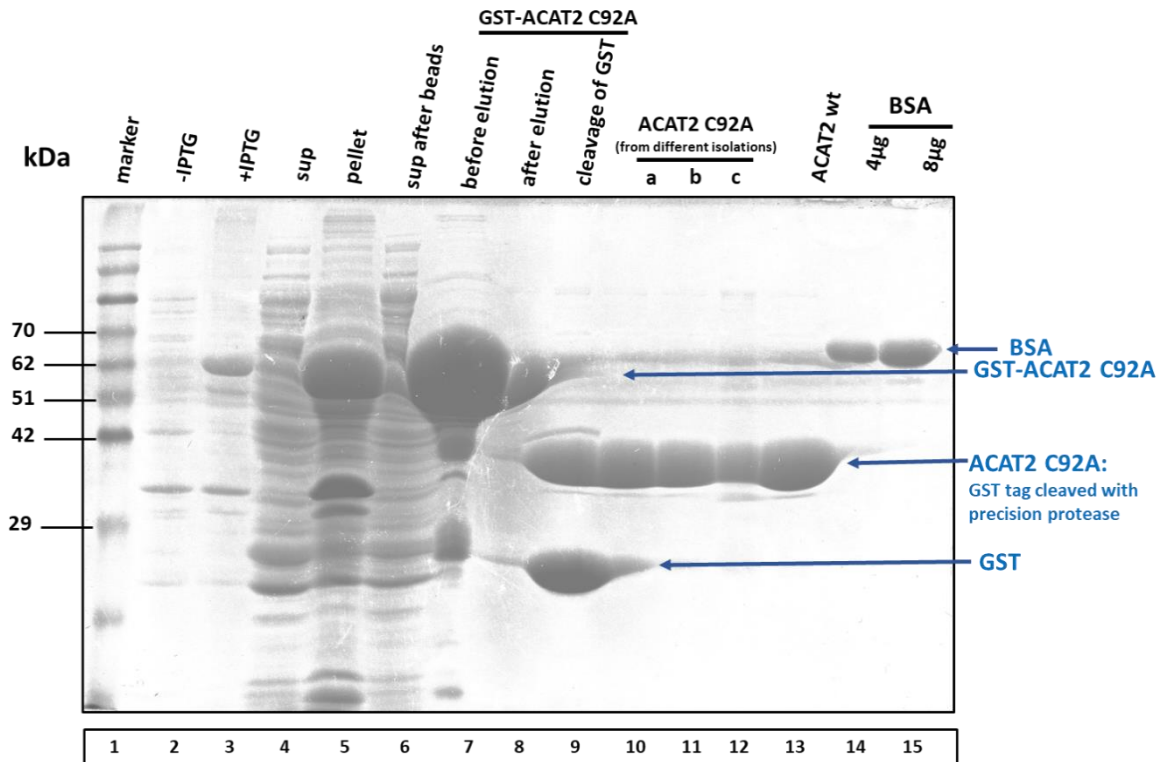
Εικόνα 3.2: Στάδια καθαρισμού της GST-Rab27. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της GST-Rab27. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη 100 µM IPTG. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επάχθηκε με την προσθήκη 100 µM IPTG. Ο καθαρισμός της GST-Rab27 διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή GST-Rab27 υπέστη διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα εκάστοτε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (**marker**): Μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών (*protein marker*), (**-IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα πριν την επαγωγή με IPTG, (**+IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα μετά την επαγωγή με IPTG, (**sup**): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο *French pressure* και υπερφυγοκέντρηση, (**pellet**): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο *French pressure* και υπερφυγοκέντρηση, (**sup after beads**): Υπερκείμενο βακτηριακού εκχυλίσματος μετά από επώαση με σφαιρίδια γλουταθειόνης, (**after elution**): GST-Rab27 μετά από έκλουση των σφαιριδίων γλουταθειόνης. (**non eluted protein**): Rab27 που δεν εκλούστηκε από τα σφαιρίδια, (**final product**): Rab27 τελικό προϊόν, (**precipitate**): Δείγμα μετά από φυγοκέντρηση του τελικού προϊόντος (Rab27) για απομάκρυνση ιζήματος, (**BSA**): 1,5 & 10 µg BSA (για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καθαρισμένης πρωτεΐνης).

ACAT2



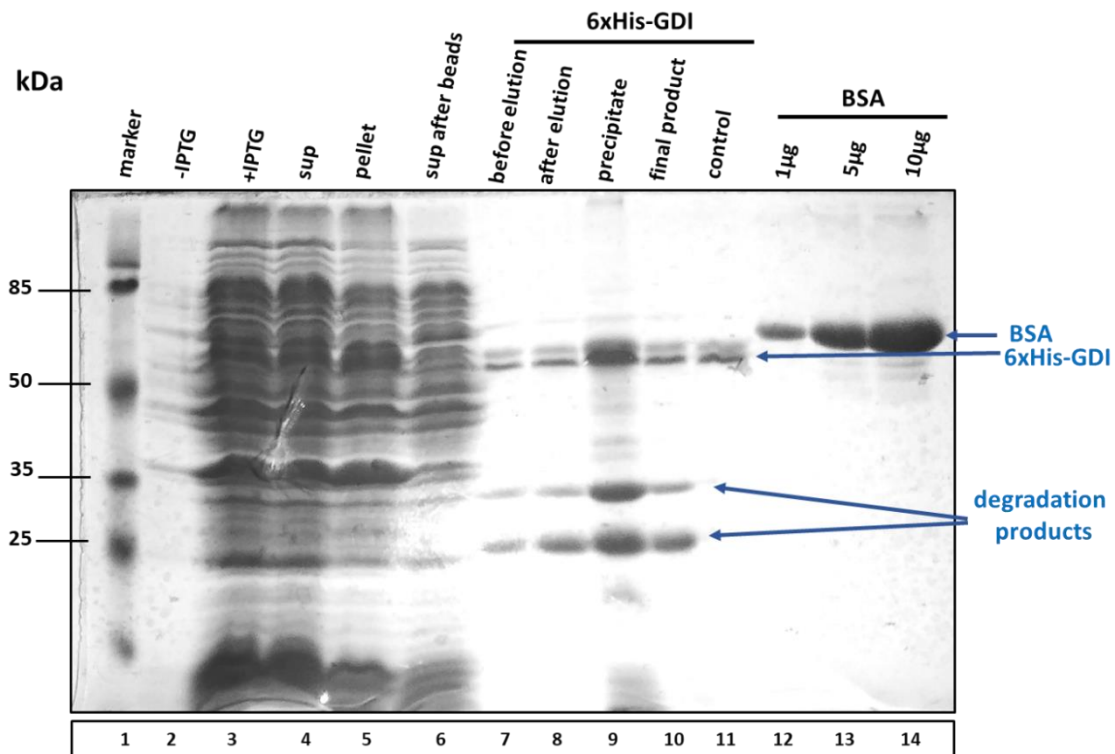
Εικόνα 3.3: Στάδια καθαρισμού της GST-ACAT2. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της GST-ACAT2. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη 100 μ M IPTG. Ο καθαρισμός της GST-ACAT2 διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή GST-ACAT2 υπέστη διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα εκάστοτε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (**marker**): Μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών (protein marker), (**-IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα πριν την επαγωγή με IPTG, (**+IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα μετά την επαγωγή με IPTG, (**sup**): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρηση, (**pellet**): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρηση (**sup after beads**): Υπερκείμενο βακτηριακού εκχυλίσματος μετά από επώαση με σφαιρίδια γλουταθειόνης, (**eluted GST-ACAT2**): GST-ACAT2 μετά από έκλυση των σφαιριδίων γλουταθειόνης. (**precipitate**): Δείγμα μετά από φυγοκέντρηση του τελικού προϊόντος (ACAT2) για απομάκρυνση ιζήματος, (**final product**): τελικό προϊόν (**control**): ACAT2 πρωτεΐνη ως μάρτυρας ελέγχου της παραγωγής της πρωτεΐνης, (**BSA**): 1, 2, 4, 6 & 10 μ g BSA (για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καθαρισμένης πρωτεΐνης).

ACAT2 C92A



Εικόνα 3.4: Στάδια καθαρισμού της GST-ACAT2 C92A Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της GST-ACAT2 C92A. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη 100 μM IPTG. Ο καθαρισμός της GST-ACAT2 C92A διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή GST-ACAT2 C92A υπέστη διαπίδωση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα εκάστοτε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (**marker**): Μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών (*protein marker*), (**-IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα πριν την επαγωγή με IPTG, (**+IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα μετά την επαγωγή με IPTG, (**sup**): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρηση, (**pellet**): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερφυγοκέντρηση (**sup after beads**): Υπερκείμενο βακτηριακού εκχυλίσματος μετά από επώαση με σφαιρίδια γλουταθειόνης, (**before elution**): GST-ACAT2 C92A πριν από έκλουση των σφαιριδίων γλουταθειόνης. (**after elution**): GST-ACAT2 C92A μετά από έκλουση των σφαιριδίων γλουταθειόνης, (**cleavage of GST**): ACAT2 C92A μετά από αποκοπή του GST προσδέματος, (**ACAT, different isolations**): ACAT2 C92A, τελικά προϊόντα από διαφορετικούς καθαρισμούς, (**control**): ACAT2 πρωτεΐνη ως μάρτυρας ελέγχου της παραγωγής της πρωτεΐνης, (**BSA**): 4 & 8 μg BSA (για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καθαρισμένης πρωτεΐνης).

His-GDI



Εικόνα 3.5: Στάδια καθαρισμού της His-GDI. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21DE3 μετασηματίστηκαν με πλασμίδιο έκφρασης της 6xHis-GDI. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη 100 µM IPTG. Ο καθαρισμός της 6xHis-GDI διεξήχθη σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο. Η καθαρή His-GDI υπέστη διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος ανάλογα με τα εκάστοτε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE 12% και αναλύθηκαν ως εξής: (**marker**): Μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών (protein marker), (**-IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα πριν την επαγωγή με IPTG, (**+IPTG**): Συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα μετά την επαγωγή με IPTG, (**sup**): Υπερκείμενο των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από μηχανική λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερψυγοκέντρωση, (**pellet**): Πρωτεϊνικό ίζημα των ομογενοποιημένων βακτηρίων μετά από βακτηριακή λύση με τη μέθοδο French pressure και υπερψυγοκέντρωση (**sup after beads**): Υπερκείμενο βακτηριακού εκχυλίσματος μετά από επώαση με σφαιρίδια νικελίου, (**before elution**): His-GDI πριν από έκλυση των σφαιριδίων νικελίου. (**after elution**): His-GDI μετά από έκλυση των σφαιριδίων νικελίου, (**precipitate**): Δείγμα μετά από φυγοκέντρωση του τελικού προϊόντος (His-GDI) για απομάκρυνση ιζήματος, (**final product**) His-GDI, τελικό προϊόν, (**control**) His-GDI πρωτεΐνη ως μάρτυρας ελέγχου της παραγωγής της πρωτεΐνης, (**BSA**): 1, 5 & 10 µg BSA (για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καθαρισμένης πρωτεΐνης).

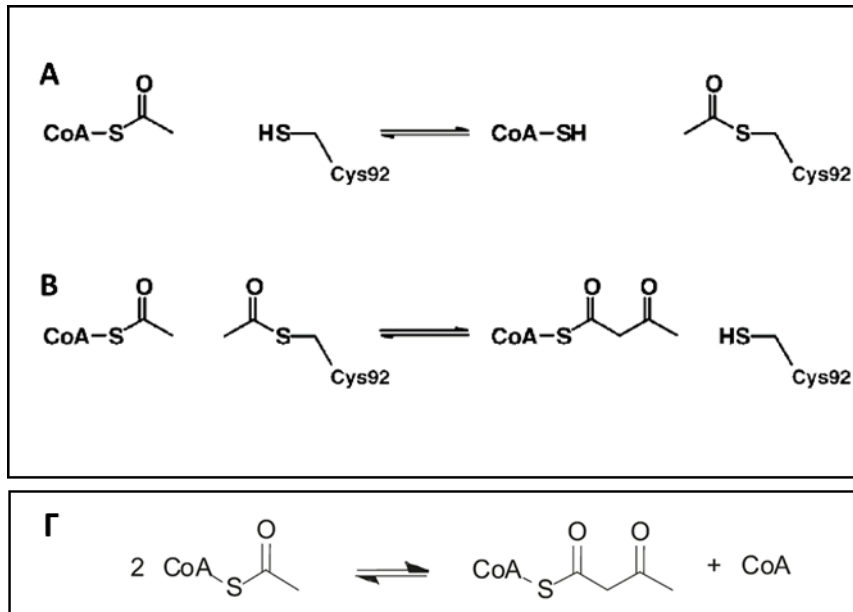
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η παραγωγή και ο καθαρισμός των παραπάνω πρωτεϊνών ήταν επιτυχής. Οι πρωτεΐνες παρήχθησαν σε ικανοποιητικές ποσότητες και έχουν το αναμενόμενο μοριακό βάρος.

3.2 Έλεγχος λειτουργικότητας των μοριακών εργλείων

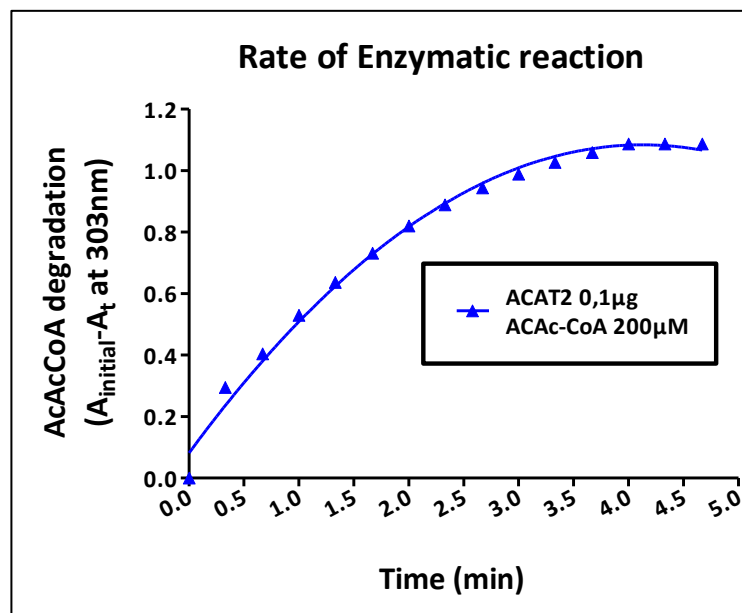
3.2.1 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της θειολάσης της ACAT2 και του ανενεργού μεταλλάγματός της, ACAT2 C92A

Η ACAT2 είναι μια κυτταροπλασματική θειολάση η οποία καταλύει τη συμπύκνωση δύο μορίων ακετυλ-CoA (Ac-CoA) σε ακετοακετυλ-CoA (AcAc-CoA) και CoA και αντιστρόφως (Εικόνα 3.6)^{108,117,127}. Θερμοδυναμικά ευνοείται περισσότερο η αποικοδομητική κατεύθυνση, δηλαδή ο σχηματισμός του ακετυλ-CoA^{106,107}. Μετά την παρασκευή της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ACAT2 και του μεταλλάγματος ACAT2 C92A, προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των παρασκευασμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενεργότητας των παραπάνω ενζύμων, μετρώντας την διάσπαση του ακετοακέτυλο-CoA (AcAc-CoA) σε ακετυλο-CoA (Ac-CoA).

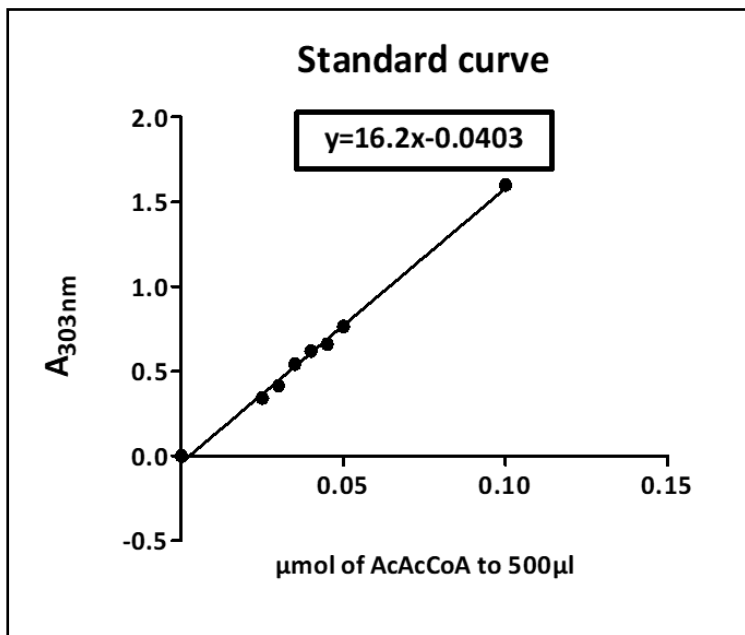
Αρχικά, μελετήθηκε η ταχύτητα της ενζυμικής ενεργότητας σε μια συγκέντρωση της ACAT2, για διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος AcAc-CoA. Συγκεκριμένα, προστέθηκε 0,1μg του ενζύμου σε 500μl διαλύματος αντίδρασης, που περιείχε γνωστή συγκέντρωση AcAc-CoA και μετρήθηκε η αποικοδόμηση του προς Ac-CoA στους 25°C, παρακολουθώντας την μείωση της απορρόφησης του AcAc-CoA στα 303nm σε σχέση με τον χρόνο (Εικόνα 3.7). Παράλληλα προσδιορίστηκε η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης του AcAc-CoA για διάφορες γνωστές συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.8. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ταχύτητα της ενζυμικής ενεργότητας της ACAT2, προς την κατεύθυνση της διάσπασης του AcAc-Co, είναι 14,8moles AcAc-CoA ανά λεπτό παρουσία 1mole ACAT2, και είναι συγκρίσιμη με την ταχύτητα της ενζυμικής ενεργότητας της ACAT2 που έχει προσδιοριστεί από παλαιότερες μελέτες^{121,128}.



Εικόνα 3.6: Η αντίδραση που καταλύει η θειολάση. (Α) Ένα ακετύλιο μεταφέρεται από το Ac-CoA στο κατάλοιπο κυστεΐνης 92 (Cys92). (Β) Η συμπύκνωση Claisen συμβαίνει μεταξύ του Ac-CoA και του ακετυλιωμένου ενζύμου αποδίδοντας ένα AcAc-CoA. (Γ) Άθροισμα αντιδράσεων της συμπύκνωσης δύο Ac-CoA για την παραγωγή ενός AcAc-CoA¹⁰⁷.

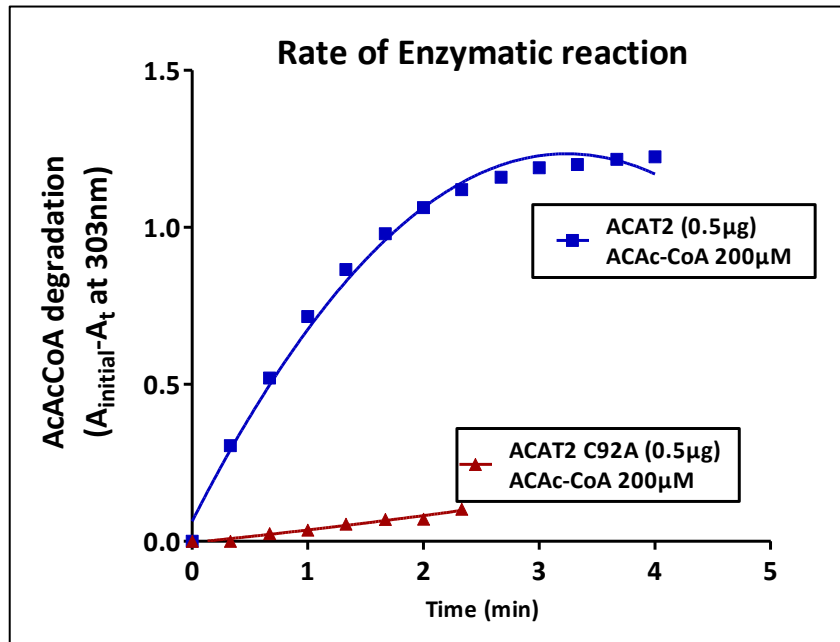


Εικόνα 3.7: Έλεγχος του ρυθμού μετατροπής του AcAc-CoA σε Ac-CoA. Το διάγραμμα παρουσιάζει τον ρυθμό μετατροπής του AcAc-CoA, με αρχική συγκέντρωση 200 μM, σε Ac-CoA (αποικοδόμηση του AcAc-CoA), από 0,1μg ενζύμου. Ο κάθετος άξονας παρουσιάζει την ποσότητα του υποστρώματος που έχει αποικοδομηθεί στην κάθε χρονική στιγμή (αρχική τιμή της απορρόφησης του υποστρώματος μείον την τιμή της απορρόφησης του υποστρώματος κάθε χρονικής στιγμής, $A_{\text{initial}} - A_t$), ενώ ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τον χρόνο της αντίδρασης σε λεπτά (min).



Εικόνα 3.8: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης του AcAc-CoA. Με βάση τις απορροφήσεις των διαφορετικών συγκεντρώσεων του AcAc-CoA στα 303nm, προσδιορίστηκε η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης και υπολογίστηκε η εξίσωση που συσχετίζει την απορρόφηση με την συγκέντρωση του AcAc-CoA.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ταχύτητας της αντίδρασης της μεταλλαγμένης μορφής της ACAT2 (ACAT2 C92A) σε σχέση με αυτή του φυσικού τύπου, για να επιβεβαιωθεί ότι η μεταλλαγή C92A καθιστά το ένζυμο ανενεργό. Είναι γνωστό ότι στην ανθρώπινη ACAT2 το κατάλοιπο κυστεΐνης στην θέση 92 (Cys92) βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου του ενζύμου και ότι κατά την αντίδραση συμπύκνωσης δύο μορίων Ac-CoA, η ομάδα του ακετυλίου μεταφέρεται στην Cys92¹⁰⁷. Η Cys92 είναι ένα συντηρημένο κατάλοιπο για τις θειολάσες σε διάφορους οργανισμούς, και συγκεκριμένα στην *Z. ramigera* η αντίστοιχη κυστεΐνη του ενεργού κέντρου βρίσκεται στην θέση 89 (Εικόνα 3.10). Η αντικατάσταση της Cys92 με αλανίνη στον άνθρωπο ή της Cys89 με σερίνη στην *Z. ramigera*, καθιστά το ένζυμο ανενεργό^{106,107}. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, σύγκριση της ενεργότητας του μεταλλαγμένου ενζύμου με αυτή του φυσικού τύπου χρησιμοποιώντας ίδια συγκέντρωση για τα δύο ένζυμα (0,5μg στα 500μl διαλύματος) και μετρήθηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης γνωστής ποσότητας του υποστρώματος AcAc-CoA (200μM). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.9, η μεταλλαγμένη μορφή της ACAT2 είναι κατά κύριο λόγο ανενεργή. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η είναι ανασυνδυασμένη φυσική ACAT2 είναι ενζυματικά λειτουργική ενώ η μεταλλαγμένη έχει απωλέσει την ενζυματική της δραστηριότητα, όπως αναμένονταν με βάση την προηγούμενη βιβλιογραφία^{104,105}.



Εικόνα 3.9: Ρυθμός ενζυμικής ενεργότητας της ACAT2 και του μεταλλάγματός της. Το διάγραμμα παρουσιάζει τον ρυθμό της ενζυμικής ενεργότητας γνωστής συγκέντρωσης της ACAT2 φυσικού τύπου και της ανενεργής ACAT2 C92A παρουσία 200µM του υποστρώματος AcAc-CoA. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η καμπύλη ενζυμικής ενεργότητας για την ACAT2 φυσικού τύπου, ενώ με κόκκινο χρώμα για την ανενεργή ACAT2 C92A.

Table 1. The important catalytic residues in human CT, *Z. ramigera* thiolase, and *E. coli* KAS I

Human CT	<i>Z. ramigera</i> thiolase	<i>E. coli</i> KAS I	Loop region
<i>Catalytic residues</i>			
Cys92	Cys89	Cys163	Nβ3-Nα3
His353	His348	His333	Cβ3-Cα3
Cys383	Cys378	-	Cβ4-Cβ5
<i>Oxyanion hole-1</i> (stabilisation of the thioester oxyanion of acetylated CoA)			
Wat38-Asn321	Wat82-Asn316	NE2(His298)	Cβ2-Cα2 ^a
NE2(His353)	NE2(His348)	NE2(His333)	Cβ3-Cα3
<i>Oxyanion hole-2</i> (stabilisation of the thioester oxyanion of acetylated Cys92)			
N(Cys92)	N(Cys89)	N(Cys163)	Nβ3-Nα3
N(Gly385)	N(Gly380)	N(Phe392)	Cβ4-Cβ5

^a In thiolases, this loop has the highly conserved NEAF sequence motif.

Εικόνα 3.10: Πίνακας με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της ανθρώπινης θειολάσης και τα αντίστοιχα σε άλλους οργανισμούς. Στην ανθρώπινη κυτταροπλασματική θειολάση οι κυστεΐνες στις θέσεις 92 και 383, καθώς και η ιστιδίνη στην θέση 353, αντιστοιχούν σε δύο κυστεΐνες και μία ιστιδίνη στο ενεργό κέντρο της βακτηριακής θειολάσης της *Z. ramigera*. Αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα, στο ενεργό του κέντρο, έχει και η θειολάση (KAS I) του βακτηρίου *E. coli*¹⁰⁷.

3.2.2 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Rab5 και ACAT2

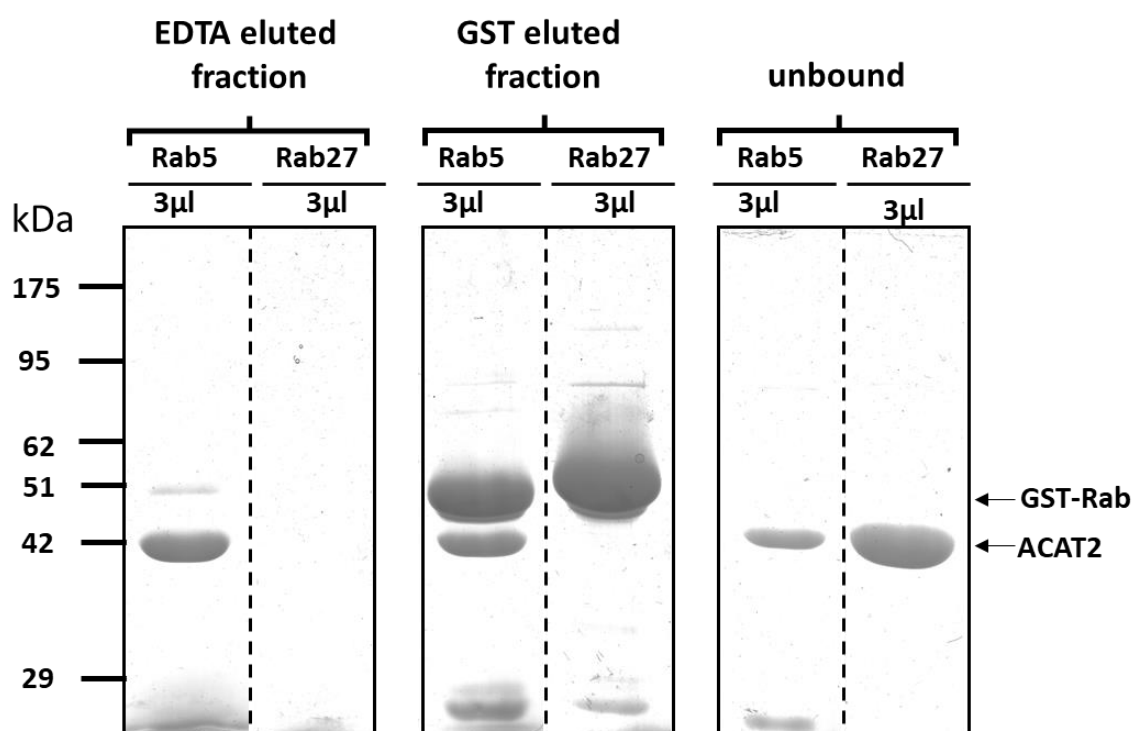
Προκειμένου να ελέγξουμε αν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Rab5 και ACAT2 που παρασκευάσαμε διατηρούν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν, πραγματοποιήσαμε πειράματα συγκατακρίμνησης (pull down). Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-Rab5GDP, ενώ από την ανασυνδυασμένη GST-ACAT2 αφαιρέθηκε το πρόσδεμα GST. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-Rab27GDP ως αρνητικός μάρτυρας για την Rab5.

Αρχικά, 2 mg GST-Rab5GDP ή GST-Rab27GDP προσδέθηκαν σε 100 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης (Sepharose 4B glutathione beads). Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 1,2 mg της ανασυνδυασμένης ACAT2, δίνοντας μοριακή αναλογία περίπου 1:1, και τα δείγματα επωάστηκαν για δύο ώρες στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα που αφαιρέθηκε από τα δείγματα περιείχε όση ποσότητα πρωτεΐνης ACAT2 δεν συνδέθηκε στις ανασυνδυασμένες GST-Rab5GDP και GST-Rab27GDP, αντίστοιχα. Τα 100 μl σφαιριδίων, που περιείχαν την GST-Rab5GDP ή την GST-Rab27GDP, διαχωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη και τοποθετήθηκαν σε νέους πλαστικούς σωλήνες ώστε να γίνει έκλυση της συνδεδεμένης ACAT2 με δύο διαφορετικούς τρόπους, σύμφωνα με πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν^{88,124}. Στην πρώτη περίπτωση, τα σφαιρίδια επωάστηκαν με 100 μl διαλύματος έκλυσης που περιέχει EDTA. Το EDTA χρησιμοποιήθηκε για την αφαίρεση του Mg²⁺-GDP από τις GST-Rabs και κατά συνέπεια την αλλαγή της διαμόρφωσής τους, μειώνοντας την συνάφεια σύνδεσής τους με άλλες πρωτεΐνες. Με το παραπάνω τρόπο, η ACAT2 που ήταν συνδεδεμένη στην GST-Rab5 απελευθερώθηκε στο διάλυμα έκλυσης. Στην δεύτερη περίπτωση, τα σφαιρίδια επωάστηκαν με 100 μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης, ώστε να απελευθερωθούν από τα σφαιρίδια οι GST-Rabs. Στο δείγμα που περιείχε την GST-Rab5, η ACAT2 εκλούστηκε ως σύμπλοκο με την GST-Rab5. Στη συνέχεια, γνωστές ποσότητες των παραπάνω δειγμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

Από τα παραπάνω, διαπιστώθηκε ότι ένα μέρος της ACAT2 συνδέθηκε στην Rab5-GDP (εικόνα 3.11, EDTA eluted & GST eluted fractions για την Rab5). Όση ACAT2 δεν συνδέθηκε με την Rab5 παρατηρήθηκε στο υπερκείμενο διάλυμα που απομονώθηκε από το δείγμα των σφαιριδίων της GST-Rab5 GDP, (εικόνα 3.11, unbound για την Rab5).

Αντιθέτως, η ACAT2 δεν συνδέεται στην Rab27 GDP, αφού από τα δείγματα που εκλούστηκαν από τις GST-Rab27 GDP στήλες η ACAT2 απουσίαζε πλήρως (εικόνα 3.11, EDTA eluted & GST eluted fractions για την Rab27). Όλη η ποσότητα της ACAT2 βρισκόταν στο υπερκείμενο διάλυμα που απομονώθηκε από τα σφαιρίδια της GST-Rab27 GDP (εικόνα 3.11, unbound για την Rab27).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η σύνδεση της ACAT2 με την Rab5 μπορεί να πραγματοποιηθεί σε *in vitro* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οι οποίες εκφράστηκαν και απομονώθηκαν σε ένα ετερόλογο σύστημα (βακτήρια). Επιπλέον, η επιτυχής σύνδεσή τους είναι ενδεικτική για την λειτουργικότητα και την σωστή στερεοδιαμόρφωσή τους. Να σημειωθεί ότι έλεγχος για την ποιότητα της ανασυνδυασμένης ACAT2 έγινε και μέσω των πειραμάτων μέτρησης της ενζυμικής της ενεργότητας που περιγράφονται στην ενότητα 3.2.1. Τέλος, τα παραπάνω ευρήματα συμπίπτουν με προηγούμενα αποτελέσματα ελέγχου της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ ACAT2 και Rab5 τα οποία περιγράφονται στην ενότητα 1.5.



Εικόνα 3.11: Η ACAT2 συνδέεται ειδικά με την Rab5-GDP. Δύο mg της GST-Rab5 GDP (A) ή της GST-Rab27 GDP (B) προσδέθηκαν σε 100 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης (Sepharose 4B glutathione beads) και επωάστηκαν με 1,2 mg της ανασυνδυασμένης ACAT2, για δύο ώρες στους 4°C υπό

ανάδευση. Η έκλυση της ACAT2 από τα 50 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης, πραγματοποιήθηκε με 100μl διαλύματος EDTA (EDTA eluted fraction), το οποίο αφαιρεί το Mg^{2+} -GDP από τις GST-Rabs, απελευθερώνοντας έτσι τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στις GST-Rabs. Η έκλυση της ACAT2 μαζί με την GST-Rab από τα υπόλοιπα 50μl σφαιριδίων πραγματοποιήθηκε με 100μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (GST eluted fraction). Η ACAT2 που συλλέχθηκε από το υπερκείμενο διάλυμα αμέσως μετά την επώασή της με τα σφαιρίδια, αντιπροσωπεύει την ACAT2 η οποία δεν συνδέθηκε με την GST-Rab (unbound). Από κάθε δείγμα ελήφθησαν 3 μl τα οποία αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

3.3 Μελέτη της της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2, *in vitro* και *in vivo*

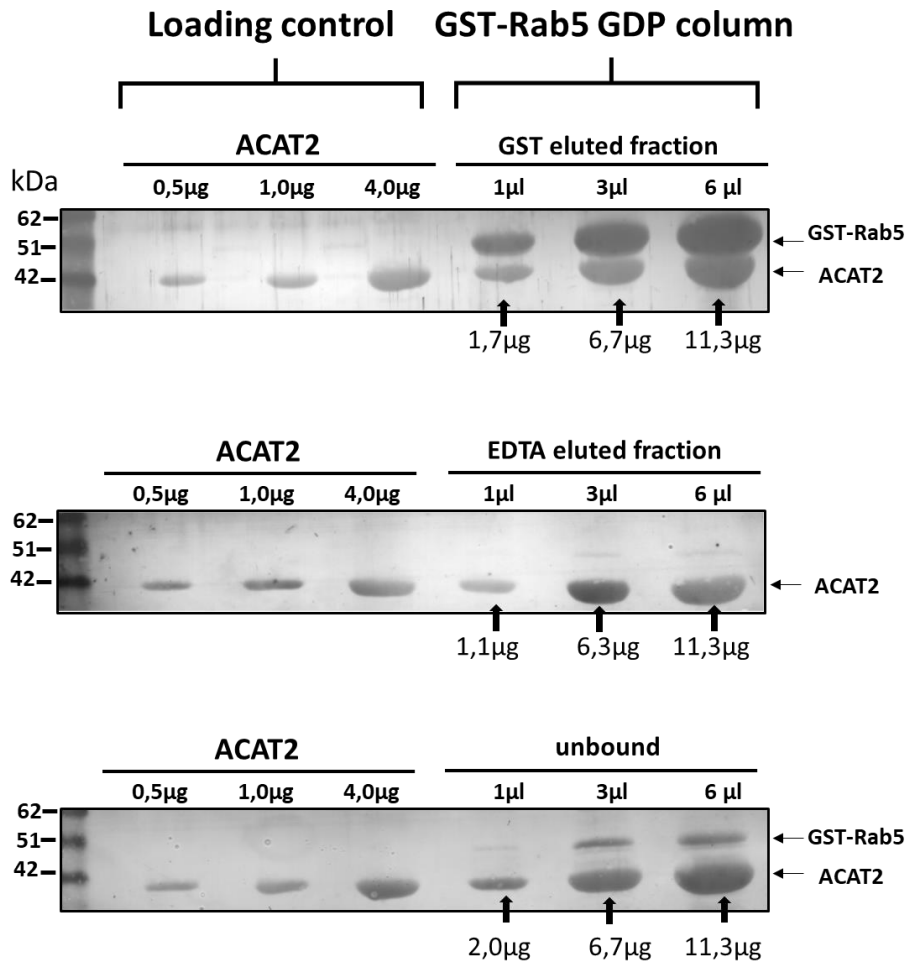
Δεδομένου ότι οι ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες που παρασκευάστηκαν είναι λειτουργικές, προχωρήσαμε περαιτέρω στην μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2, τόσο με μεθοδολογίες *in vitro*, όσο και *in vivo*.

3.3.1 Ημιποσοτικός προσδιορισμός της *in vitro* αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανασυνδυσασμένων Rab5 και ACAT2

Προκειμένου να προσδιορίσουμε την απόδοση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Rab5-GDP και της ACAT2 *in vitro*, επώασαμε τις δύο πρωτεΐνες σε μοριακή αναλογία 1:1 και προσδιορίσαμε το ποσοστό που σχηματίζει σύμπλοκο. Αρχικά, 1,450 mg GST-Rab5 GDP προσδέθηκαν σε 100 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης (Sepharose 4B glutathione beads). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1,2 mg ανασυνδυσασμένης ACAT2 και το δείγμα επώαστηκε για δύο ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών.

Τα 100 μl σφαιριδίων που περιείχαν την GST-Rab5 GDP, διαχωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη και τοποθετήθηκαν σε νέους πλαστικούς σωλήνες ώστε να γίνει έκλυση της συνδεδεμένης ACAT2 με δύο διαφορετικούς τρόπους, όπως περιγράφεται και παραπάνω (έκλυση με ανηγμένη γλουταθειόνη ή/και EDTA). Από την πειραματική διαδικασία ελήφθησαν 3 δείγματα, το έκλουσμα που ανακτήθηκε με χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης και περιείχε την ACAT2 που συνδέθηκε στην Rab5, το αντίστοιχο έκλουσμα που ανακτήθηκε με χρήση διαλύματος EDTA, και το υπερκείμενο διάλυμα που συλλέχθηκε πριν τα στάδια έκλυσης και περιείχε την ποσότητα της

ACAT2 που δεν συνδέθηκε με την GST-Rab5 GDP. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, έγινε χρώση των μεμβρανών με διάλυμα μελάνης 0.1% (Ink Staining), όπως φαίνεται στην εικόνα 3.12. Επιπλέον, για τα δείγματα που περιείχαν είτε την ACAT2 η οποία δεν δεσμεύτηκε στην Rab5, είτε την ACAT2 η οποία απομονώθηκε μετά από έκλυση με EDTA, έγινε έλεγχος της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με Bradford. Στο δείγμα της ACAT2 που προήλθε από έκλυση με ανηγμένη γλουταθειόνη δεν ήταν δυνατή η μέτρηση της συγκέντρωσης της ACAT2 αυτής καθαυτής, καθώς αυτό το δείγμα περιείχε και GST-Rab5. Με βάση την ποσότητα της ACAT2 που προσδιορίστηκε από τις ζώνες της ηλεκτροφόρησης, τον όγκο του δείγματος που φορτώθηκε στην πηκτή (SDS-PAGE) και τον συνολικό όγκο που εκλούστηκε από την στήλη (100 μ l), προσδιορίστηκε η ποσότητα της ACAT2 που προσδέθηκε στην Rab5. Η ποσότητα αυτή στο μέσο όρο του συνόλου των πειραμάτων, και σε συνδυασμό με τα πειράματα όπου μετρήθηκε η εκλουσμένη πρωτεΐνη με την μέθοδο Bradford, προσδιορίστηκε ότι αντιστοιχεί στο 40-50% της συνολικής πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.12: Η ACAT2 συνδέεται με την Rab5:GDP. GST-Rab5 GDP (1,45mg) προσδέθηκαν σε 100 µl σφαιριδίων γλουταθειόνης (Sephacrose 4B glutathione beads) και επωάστηκαν με 1,2 mg της ανασυνδυασμένης ACAT2, για δύο ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των πρωτεϊνών. (Α) Η έκλουση της ACAT2 μαζί με την GST-Rab5 GDP από τα 50 µl σφαιριδίων γλουταθειόνης, πραγματοποιήθηκε με 100µl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (GST eluted fraction). (Β) Η έκλουση της ACAT2 από τα υπόλοιπα 50µl σφαιριδίων γλουταθειόνης, πραγματοποιήθηκε με 100µl διαλύματος EDTA, το οποίο αφαιρεί το Mg^{2+} -GDP από τις GST-Rabs, απελευθερώνοντας τις πρωτεΐνες που συνδέθηκαν με τις GST-Rabs (EDTA eluted fraction). (Γ) Η ACAT2, η οποία δεν συνδέθηκε με την Rab5 (unbound). Γνωστές ποσότητες των δειγμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Έπειτα, έγινε χρώση των μεμβρανών με διάλυμα μελάνης (0,1%v/v India Ink σε διάλυμα PBS-Tween 0.1%) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

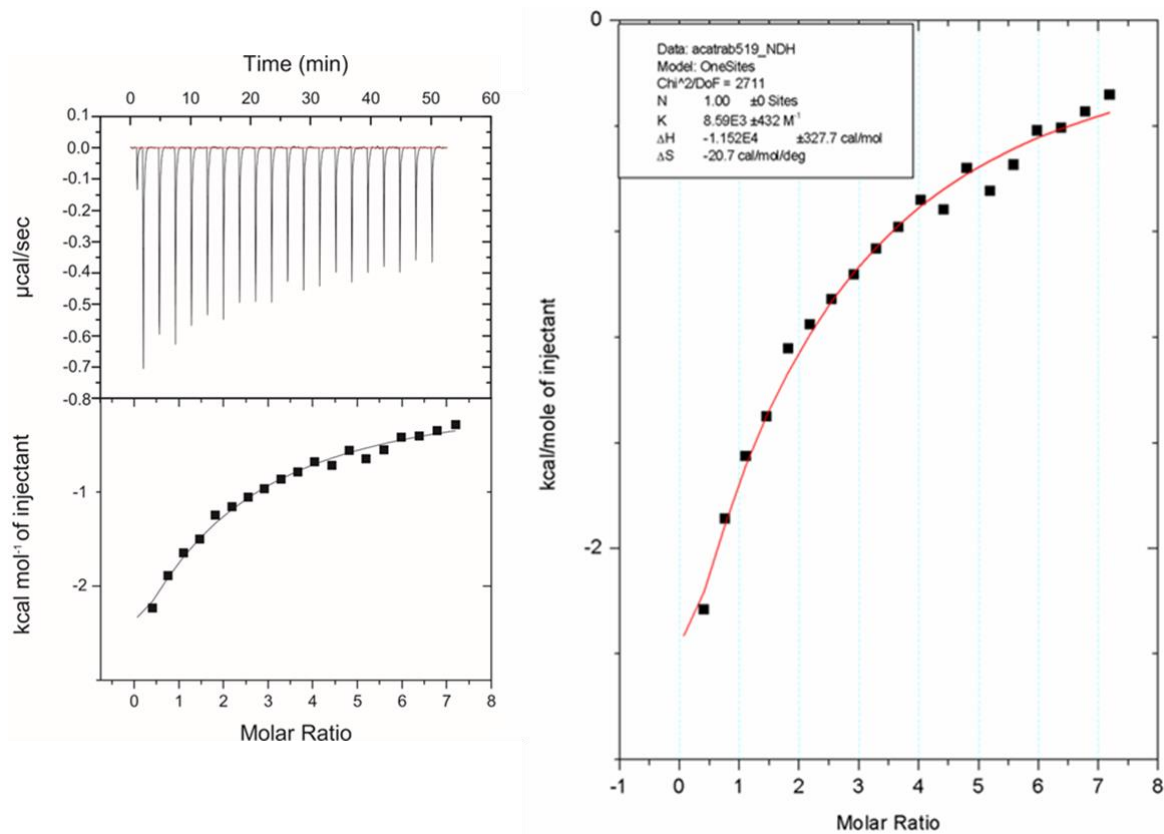
3.3.2 Ποσοτικοποίηση της ισχύος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Rab5-GDP και ACAT2 με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (isothermal titration calorimetry, ITC)

Πολλές κυτταρικές διεργασίες επάγονται από την αλληλεπίδραση δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών. Επομένως, η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο (πχ καθορισμός της φύσης των δυνάμεων που σταθεροποιούν μια αλληλεπίδραση), μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση της λειτουργικής σημασίας των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για το κύτταρο. Η τεχνολογία της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (isothermal titration calorimetry, ITC) είναι από τις πιο αξιόπιστες μεθοδολογίες για τη μέτρηση των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών¹²⁹. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την ITC, ώστε να μετρήσουμε τη ισχύ και την κινητική της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Rab5 και της ACAT2. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του κ.Τζάκου, στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η τεχνική υποστήριξη καθώς και η καθοδήγηση για τον σχεδιασμό και την διεξαγωγή των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου, Μαρία Χατζηαθανασιάδου.

Για τα πειράματα θερμιδομετρίας δημιουργήσαμε επαρκείς ποσότητες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ACAT2 και Rab5-GDP, οι οποίες παρήχθησαν σε βακτήρια. Τα πρωτόκολλα καθαρισμού και η ανάλυση SDS-PAGE των σταδίων καθαρισμού αυτών των πρωτεϊνών παρουσιάζονται στην ενότητα 2.4.5, ενώ χρησιμοποιήσαμε γνωστές πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις. Οι ACAT2 και Rab5-GDP προστέθηκαν στον θάλαμο των δειγμάτων και στη σύριγγα τιτλοδότησης, αντίστοιχα. Αρχικά, προστέθηκε μια μικρή ποσότητα Rab5-GDP στον θάλαμο που περιείχε την ACAT2, ενώ ακολούθησε σταδιακή προσθήκη της για κάθε 2 λεπτά (60 μM Rab5-GDP), μέχρι το τέλος του πειράματος. Στην εικόνα 3.13 παρουσιάζεται η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης για τις εξής συγκεντρώσεις: ACAT2 30 μM και Rab5 1000 μM . Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρήκαμε ότι η σύνδεσή τους είναι μία εξώθερμη αντίδραση ($\Delta H = -11520 \pm 327 \text{ cal/mol}$) με σταθερά διάστασης (K_d) 116 μM και μοριακή αναλογία σύνδεσης 1:1. Σε επόμενες δοκιμές όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.14, διατηρήσαμε ίδιες τις αρχικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και τα χρονικά διαστήματα προσθήκης Rab5 στον θάλαμο των δειγμάτων. Στην περίπτωση αυτή ελαττώσαμε την συγκέντρωση του προστιθέμενου δείγματος της Rab5, από 60 μM σε 30 μM . Από την

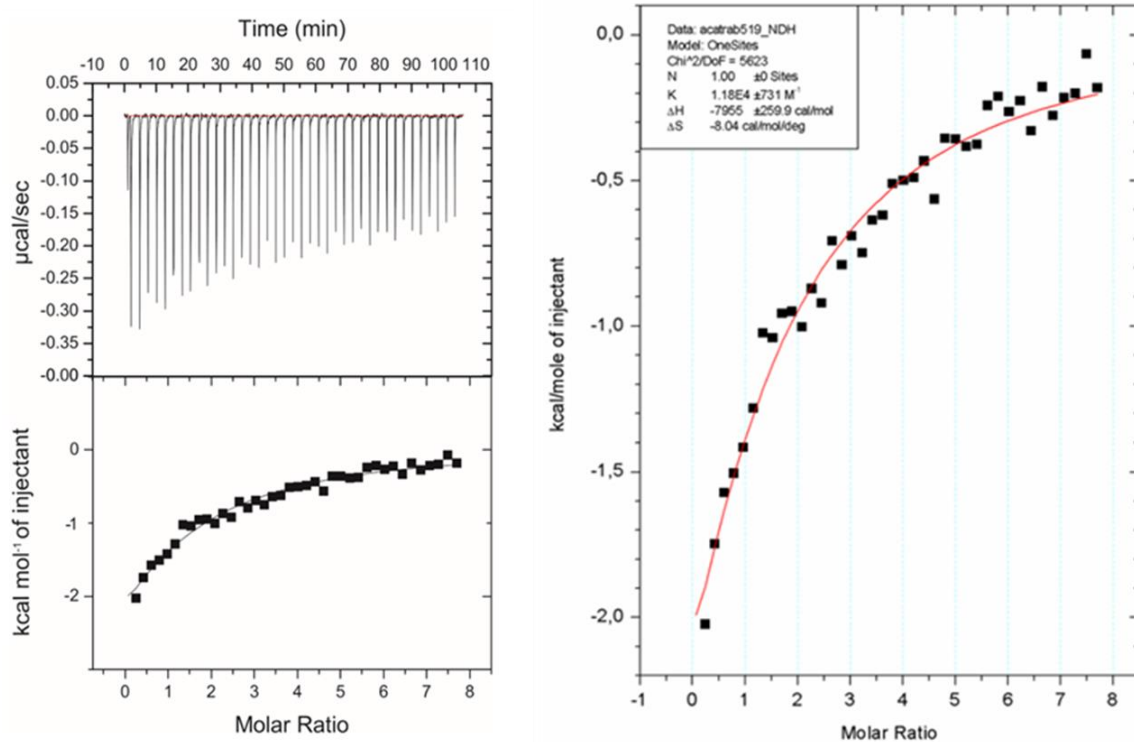
ανάλυση του πειράματος, υπολογίσαμε ότι η σταθερά διάστασης K_d είχε τιμή 84 μM , ενώ η ΔH είχε τιμή -7955 ± 259.9 . Επιπλέον, προκειμένου να ελεγχθεί η εξειδίκευση του σήματος που παρατηρήθηκε στις παραπάνω δοκιμές, πραγματοποιήθηκε θερμιδομετρική ανάλυση της προσθήκης Rab5-GDP σε διάλυμα που δεν περιέχει ACAT2 (διάλυμα αναφοράς). Όταν η Rab5 GDP προστέθηκε στο διάλυμα αναφοράς προκλήθηκε ένα ενδόθερμο φαινόμενο διάχυσης, με την σταδιακή μείωση του μετρήσιμου σήματος (Εικόνα 3.15), γεγονός που οφείλεται στην εξισορρόπηση της σύστασης των δύο διαλυμάτων, δηλαδή του διαλύματος αναφοράς και αυτού που περιέχει την Rab5.

Παρόλο που οι παραπάνω δοκιμασίες δίνουν διαφορετικές θερμοδυναμικές παραμέτρους για την αλληλεπίδραση των ACAT2 και Rab5-GDP και δεν μας επιτρέπουν τον ακριβή υπολογισμό τους, διαπιστώνουμε τα εξής, πρώτον ότι η σύνδεσή τους είναι μία εξώθερμη αντίδραση λόγω αρνητικών ΔH τιμών, και δεύτερον ότι η σταθερά διάστασης K_d της ACAT2-Rab5 αλληλεπίδρασης βρίσκεται ανάμεσα στα όρια που χαρακτηρίζει όλες τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ($10^{-4} < K_d < 10^{-8}$). Επιπλέον, η τιμή της σταθερά διάστασης K_d , για την ACAT2 είναι της τάξης των μM , γεγονός που υποδηλώνει μια μέτρια συγγένεια πρόσδεσης, η οποία όμως είναι δεκαπλάσια των K_d άλλων γνωστών πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την Rab5, όπως η Rabartin-5 και η EEA1^{130,131}. Όσον αφορά την EEA1, τα πειραματικά δεδομένα από τις δοκιμασίες σύντηξης των ενδοσωμάτων μας επιβεβαιώνουν ότι η σύνδεσή της με την Rab5 είναι πολύ πιο ισχυρή συγκριτικά με την ACAT2. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν δεν επιτεύχθηκε κορεσμός σχηματισμού του συμπλόκου και απαιτείται βελτιστοποίηση των συνθηκών του πειράματος - πιθανότατα με τροποποιήσεις στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών, στην μεταξύ τους αναλογία και στα χρονικά διαστήματα προσθήκης της Rab5 στον θάλαμο του δείγματος – ώστε να υπολογιστεί με περισσότερη ακρίβεια η σταθερά σύνδεσης των δύο πρωτεϊνών.



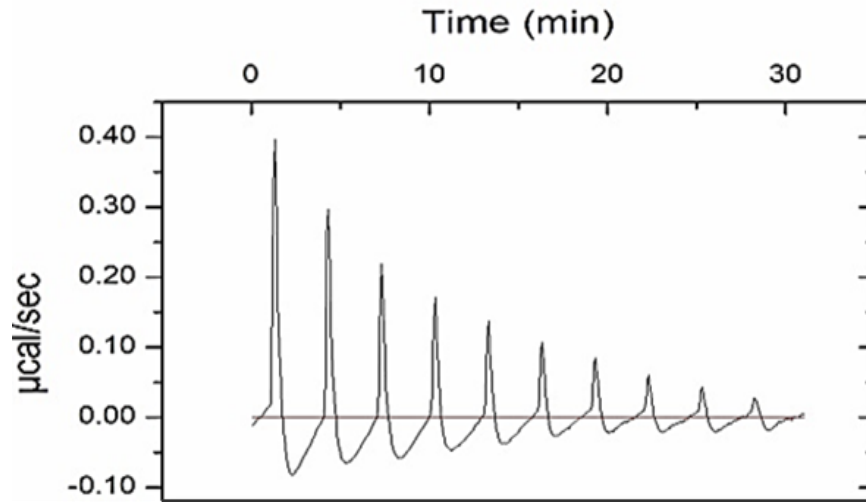
K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	ΔG (cal/mol)
8590 ± 432	116 ± 6	-11520 ± 327.7	-20.7	-5351

Εικόνα 3.13: Πρώτη δοκιμασία για την μελέτη της κινητικής της αλληλεπίδραση της **Rab5:GDP** με την **ACAT2**. Στην δοκιμασία της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης τοποθετήθηκε στη σύριγγα Rab5-GDP με συγκέντρωση 1000 μM και πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές τιτλοδοτήσεις (60 μM /τιτλοδότηση) στον θάλαμο των δειγμάτων, που περιείχε την ACAT2 με συγκέντρωση 30 μM σε θερμοκρασία 25°C, υπό συνεχή ανάδευση (1000 rpm). Ακολούθησε μετατροπή του μετρήσιμου σήματος σε kcal/mol τιτλοδότη με σκοπό τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της αλληλεπίδρασης¹⁷.



K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	ΔG (cal/mol)
11800±731	84±6	-7955±259.9	-8.04	-5559

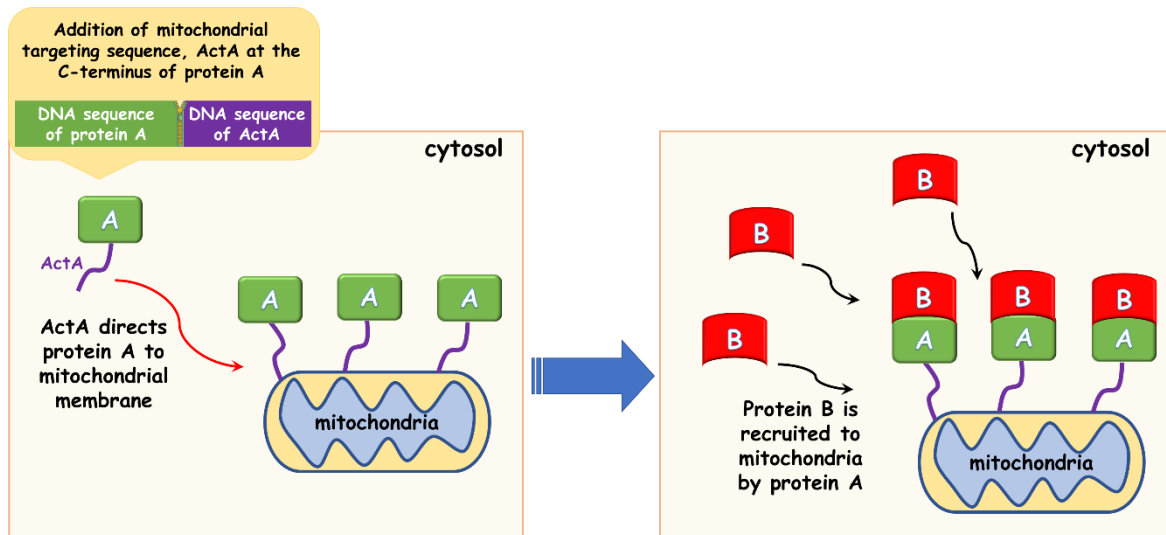
Εικόνα 3.14: Δεύτερη δοκιμασία για την μελέτη της κινητικής της αλληλεπίδραση της **Rab5-GDP** με την **ACAT2**. Στην δοκιμασία της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης τοποθετήθηκε στη σύριγγα **Rab5-GDP** με συγκέντρωση 1000μM και πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές τιτλοδοτήσεις (30μM/τιτλοδότηση) στον θάλαμο των δειγμάτων, που περιείχε την **ACAT2** με συγκέντρωση 30μM σε θερμοκρασία 25°C, υπό συνεχή ανάδευση (1000 rpm). Ακολούθησε μετατροπή του μετρήσιμου σήματος σε kcal/mol τιτλοδότη με σκοπό τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της αλληλεπίδρασης.



Εικόνα 3.15: Η διάλυση της *Rab5* στον διαλύτη είναι ενδόθερμη αντίδραση. Ο κοινός διαλύτης των δύο πρωτεϊνών τοποθετήθηκε στον θάλαμο των δειγμάτων και τιτλοδοτήθηκε με 960 μM *Rab5-GDP*. Η διαδικασία διεξήχθη στους 25°C, υπό συνεχή ανάδευση (1000 rpm).

3.3.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των *Rab5* και *ACAT2* *in vivo*

Προκειμένου να μελετήσουμε αν η αλληλεπίδραση των *Rab5* και *ACAT2* συμβαίνει και εντός του φυσικού περιβάλλοντος σε ανέπαφα κύτταρα (*in vivo*), χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της τεχνητής μετατόπισης μιας πρωτεΐνης στη μιτοχονδριακή μεμβράνη με τη βοήθεια του προσδέματος ActA, το οποίο είναι γνωστό ότι συνδέεται με την εξωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων^{95,125,132-134}. Στην τεχνική αυτή όταν η πρωτεΐνη A (**protein A**) συζευχθεί με το πρόσδεμα ActA, τότε μετατοπίζεται στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων των κυττάρων, και ακολούθως αν η πρωτεΐνη B (**protein B**) αλληλεπιδρά/συνδέεται με την πρωτεΐνη A (**protein A**), τότε επάγεται η μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια (εικόνα 3.16). Συνεπώς, επειδή πρόκειται για μετατόπιση των πρωτεϊνών από την φυσική τους θέση στο μιτοχόνδριο, αρχικά ελέγξαμε την τοπολογία των υπό μελέτη πρωτεϊνών, χωρίς την προσθήκη του ActA (βλέπε πιο κάτω παραγράφους Α έως Γ), αλλά και μετά την προσθήκη του προσδέματος αυτού (βλέπε παράγραφο Δ).



Εικόνα 3.16: Σχεδιάγραμμα της μεθόδου τεχνητής μετατόπισης μιας πρωτεΐνης στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το σχήμα περιγράφει την μετακίνηση της πρωτεΐνης A (Protein A) λόγω της σύνδεσής της με το πρόσδεμα ActA, το οποίο είναι αλληλουχία στόχευσης στις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Αν η πρωτεΐνη B (Protein B) συνδέεται με την A, μετατοπίζεται ακολούθως στα μιτοχόνδρια¹²⁵.

A. Έλεγχος του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της Rab5 και των μεταλλαγμάτων της σε κύτταρα HUVE και HepG2 χωρίς το πρόσδεμα ActA

Προκειμένου να μελετηθεί η σχετική ενδοκυτταρική θέση της Rab5 και της ACAT2, διερευνήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό των δύο αυτών πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά παρασκευάστηκαν πλασμίδια έκφρασης της Rab5 (φυσικού τύπου, Rab5Q79L και Rab5S34N) και της ACAT2 (φυσικού τύπου και ACAT2 C92A), με προσδέματα GFP, mCherry, ActA. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του συνεντοπισμού μεταξύ Rab5 και ACAT2, με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM.).

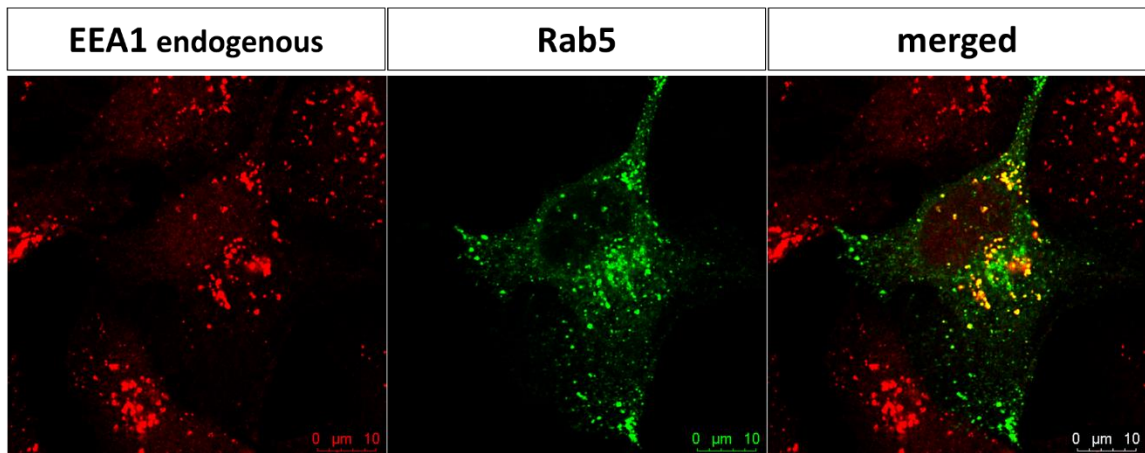
Όπως είναι γνωστό, η Rab5 εντοπίζεται κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα, ενώ βρίσκεται επίσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και σε άλλα ενδοκυτταρικά κυστίδια (όπως κυστίδια με κάλυμμα κλαθρίνης, CCV)⁸⁰. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η Rab5 παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων¹³⁵. Στην παρούσα εργασία, για τον έλεγχο του υποκυτταρικού εντοπισμού της Rab5, παρασκευάστηκαν πλασμίδια έκφρασης για την φυσικού τύπου μορφή της Rab5, για την μεταλλαγμένη Rab5Q79L, η οποία είναι συνεχώς ενεργή (GTP μορφή), και

για την μεταλλαγμένη Rab5S34N, η οποία είναι συνεχώς ανενεργή (GDP μορφή). Οι παραπάνω πρωτεΐνες είναι συζευγμένες με προσδέματα GFP και Flag (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.2 και στον Πίνακα 2.1). Αρχικά, οι πρωτεΐνες GFP-Rab5, Flag-Rab5 S34N και Flag-Rab5 Q79L υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HUVE ή/και HepG2, και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

Η GFP-Rab5 βρίσκεται είτε στην ενεργή Rab5 GTP είτε στην ανενεργή Rab5 GDP μορφή της εντός του κυττάρου. Όταν είναι ενεργή, εντοπίζεται στις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων, και συνεντοπίζεται με την EEA1 (εικόνες 3.17A για κύτταρα HUVE και 3.18A για κύτταρα HepG2), η οποία αποτελεί πρωτεΐνη μάρτυρα των πρώιμων ενδοσωμάτων. Η GFP-Rab5 παρουσιάζει επίσης διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό, ο οποίος αντιστοιχεί στην ανενεργή της μορφή. Η Rab5 Q79L είναι μονίμως ενεργή (Rab5 GTP), διότι η αντικατάσταση της γλουταμίνης με λευκίνη στο κατάλοιπο 79 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της υδρόλυσης του GTP, και κατά συνέπεια η Rab5 παραμένει κλειδωμένη στην GTP μορφή⁷⁹. Η υπερέκφραση της Flag-Rab5 Q79L επάγει την ομοτυπική σύντηξη των ενδοσωμάτων, οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό μεγεθυμένων πρώιμων ενδοσωμάτων όπως φαίνεται και από τον συνεντοπισμό της με την πρωτεΐνη EEA1 (εικόνα 3.17B για κύτταρα HUVE και 3.18B για κύτταρα HepG2). Η Rab5 S34N είναι μονίμως ανενεργή (Rab5 GDP), διότι η αντικατάσταση της σερίνης με ασπαραγίνη στο κατάλοιπο 34, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγγένειας πρόσδεσης του GTP με την Rab5, η οποία παραμένει στην GDP-συνδεδεμένη μορφή⁷⁹. Συγκεκριμένα, Rab5S34N εμφανίζει συγγένεια για το GDP 100 φορές περισσότερη απ' ό τι για το GTP¹³⁶. Επομένως, η Flag-Rab5 S34N βρίσκεται στην GDP διαμόρφωση και εντοπίζεται σχεδόν όλη στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, η υπερέκφραση της Flag-Rab5 S34N παρεμποδίζει την ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων⁷⁹, ενώ παράλληλα η EEA1 παρουσιάζει διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό (εικόνα 3.17Γ για κύτταρα HUVE και 3.18Γ για κύτταρα HepG2). Είναι γνωστό ότι, όταν η ενδοσωματική σύντηξη διαταράσσεται, η EEA1 δεν ενσωματώνεται στις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων και ανακατανέμεται σε μη ενδοσωματικά διαμερίσματα, όπως το κυτταρόπλασμα⁵⁴.

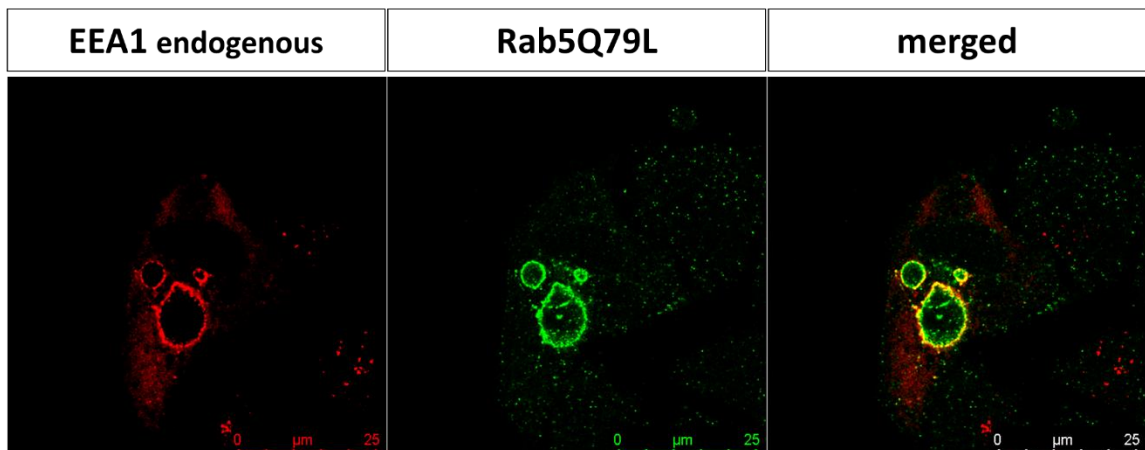
A.

Overexpression of gfp-Rab5 wt



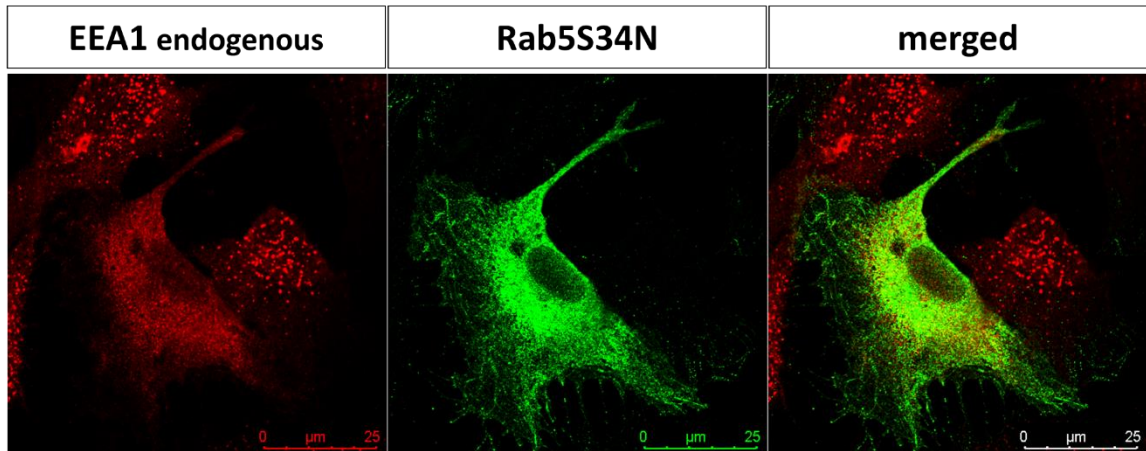
B.

Overexpression of flag-Rab5Q79L (GTP)



Γ.

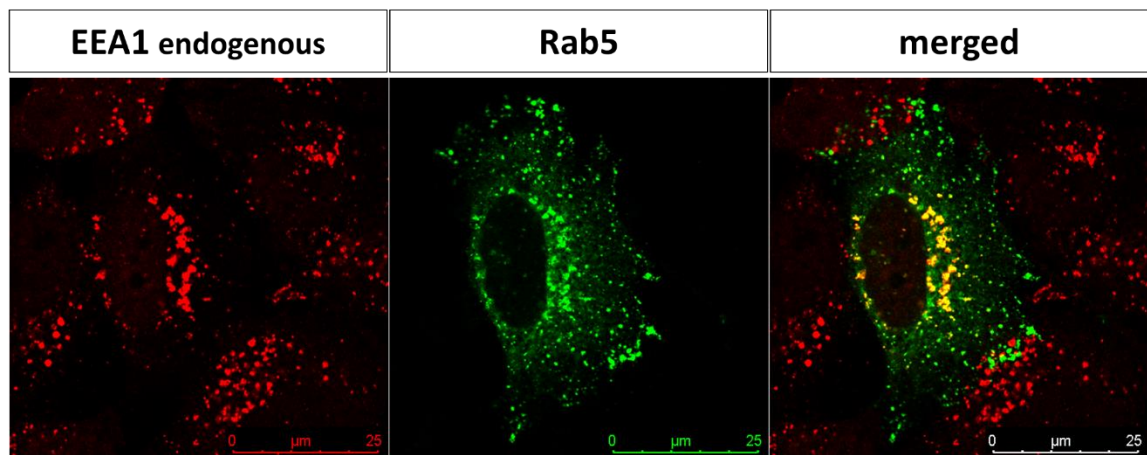
Overexpression of flag-Rab5S34N (GDP)



Εικόνα 3.17: Έλεγχος του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της Rab5 και των μεταλλαγμάτων της σε κύτταρα HUVE. Οι πρωτεΐνες GFP-Rab5, Flag-Rab5 Q79L και Flag-Rab5 S34N υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HUVE, και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Για τον έλεγχο των Flag-Rab5 Q79L και Flag-Rab5 S34N χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προσδέματος Flag, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-488 (πράσινο). Για τον έλεγχο των πρώιμων ενδοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδογενούς EEA1, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-594 (κόκκινο). (Α) Η GFP-Rab5 (πράσινο χρώμα) βρίσκεται κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα, στα οποία βρίσκεται η EEA1 (κόκκινο χρώμα), και μερικώς στο κυτταρόπλασμα. Ο συνεντοπισμός της GFP-Rab5 με την ενδογενή EEA1 των πρώιμων ενδοσωμάτων φαίνεται με κίτρινο χρώμα. (Β) Η Flag-Rab5 Q79L (πράσινο χρώμα) βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία λόγω υπερέκφρασης του συνεχώς ενεργού μεταλλάγματος μεταλλάγματος, σχηματίζουν μεγεθυμένα κυστίδια (EEA1, κόκκινο χρώμα). Ο συνεντοπισμός της Flag-Rab5 Q79L με την ενδογενή EEA1 των πρώιμων ενδοσωμάτων φαίνεται με κίτρινο χρώμα. (Γ) Flag-Rab5 S34N (πράσινο χρώμα) είναι σχεδόν όλη στο κυτταρόπλασμα, ενώ και η ενδογενής EEA1 χάνει την ενδοσωματική της στόχευση λόγω υπερέκφρασης της Flag-Rab5 S34N και αποκτά διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό (κόκκινο χρώμα).

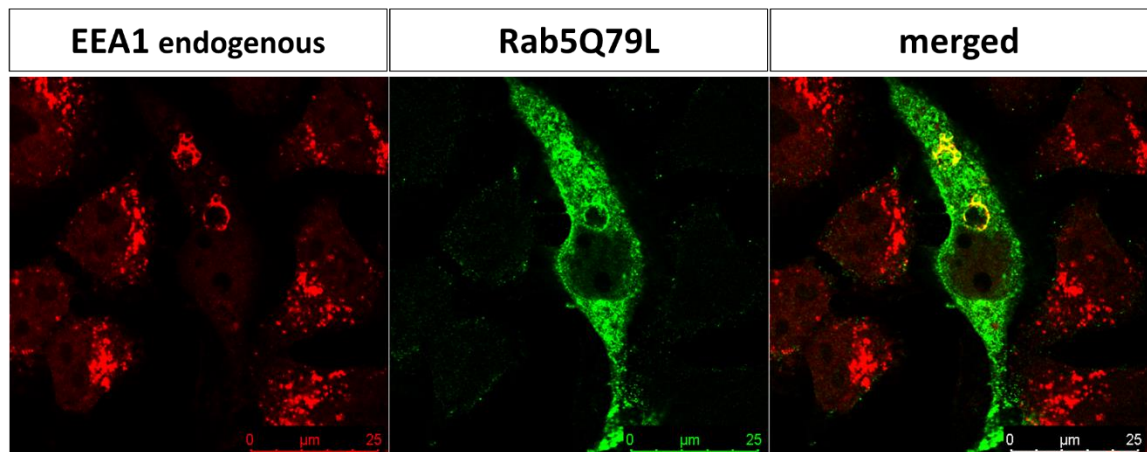
A.

Overexpression of gfp-Rab5 wt



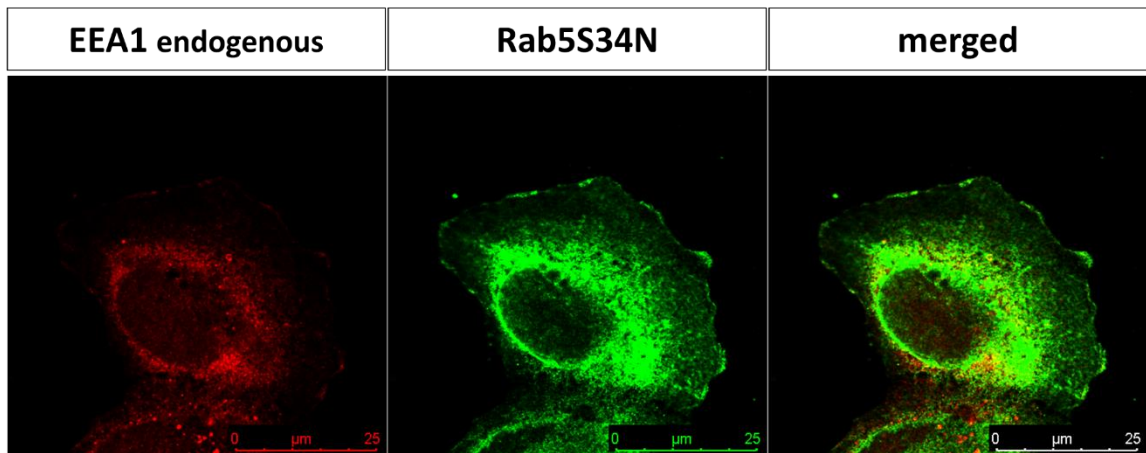
B.

Overexpression of flag-Rab5Q79L (GTP)



Γ.

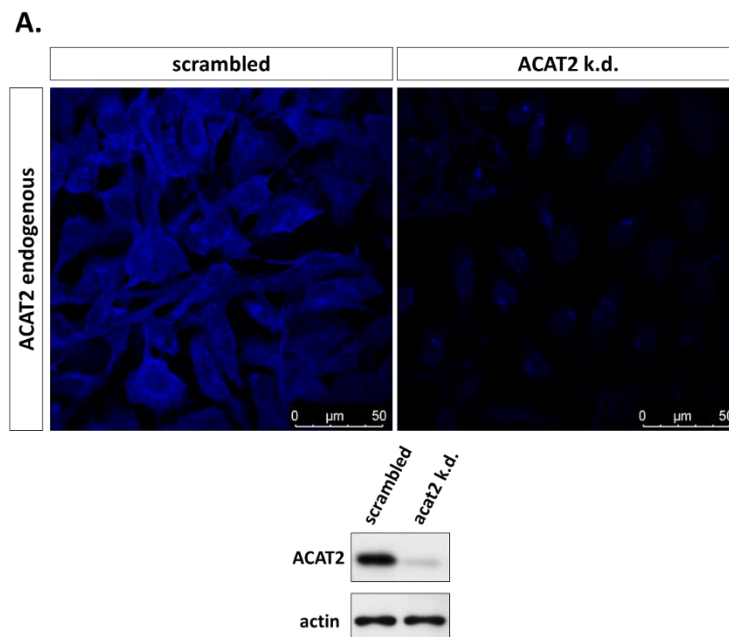
Overexpression of flag-Rab5S34N (GDP)

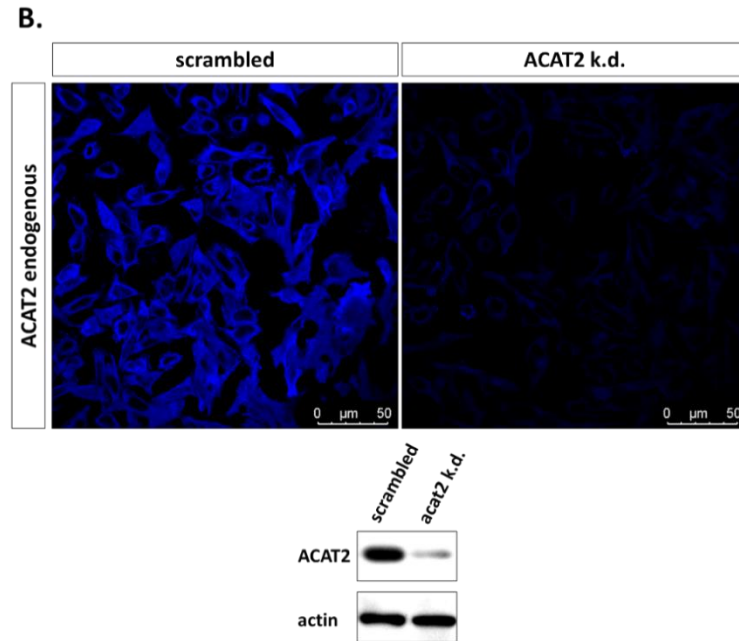


Εικόνα 3.18: Έλεγχος του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της Rab5 και των μεταλλαγμάτων της σε κύτταρα HepG2. Οι πρωτεΐνες GFP-Rab5, Flag-Rab5 Q79L και Flag-Rab5 S34N υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HepG2, και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Για τον έλεγχο των Flag-Rab5 Q79L και Flag-Rab5 S34N χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προσδέματος Flag, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-488 (πράσινο). Για τον έλεγχο των πρώιμων ενδοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδογενούς EEA1, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-594 (κόκκινο). (Α) Η GFP-Rab5 (πράσινο χρώμα) βρίσκεται κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα, στα οποία βρίσκεται η EEA1 (κόκκινο χρώμα), και μερικώς στο κυτταρόπλασμα. Ο συνεντοπισμός της GFP-Rab5 με την ενδογενή EEA1 των πρώιμων ενδοσωμάτων φαίνεται με κίτρινο χρώμα. (Β) Η Flag-Rab5 Q79L (πράσινο χρώμα) βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία λόγω υπερέκφρασης του συνεχώς ενεργού μεταλλάγματος μεταλλάγματος, σχηματίζουν μεγεθυμένα κυστίδια (EEA1, κόκκινο χρώμα). Ο συνεντοπισμός της Flag-Rab5 Q79L με την ενδογενή EEA1 των πρώιμων ενδοσωμάτων φαίνεται με κίτρινο χρώμα. (Γ) Flag-Rab5 S34N (πράσινο χρώμα) είναι σχεδόν όλη στο κυτταρόπλασμα, ενώ και η ενδογενής EEA1 χάνει την ενδοσωματική της στόχευση λόγω υπερέκφρασης της Flag-Rab5 S34N και αποκτά διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό (κόκκινο χρώμα).

B. Έλεγχος του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ενδογενούς ACAT2 σε κύτταρα HUVE και HepG2

Για την μελέτη της τοπολογίας της ACAT2 σε κύτταρα HUVE και HepG2 χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης. Αρχικά, έγινε διαμόλυνση κυττάρων HUVE και HepG2 με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της ACAT2. Έπειτα από 72 ώρες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM). Η ACAT2 είναι μία κυτταροπλασματική θειολάση και παρουσιάζει διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.19 Α και Β), ενώ πιθανά εντοπίζεται και στον πυρήνα. Επιπλέον, η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA έναντι της ACAT2, μειώνει δραστικά το σήμα της, επιβεβαιώνοντας έτσι την ειδικότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήσαμε.



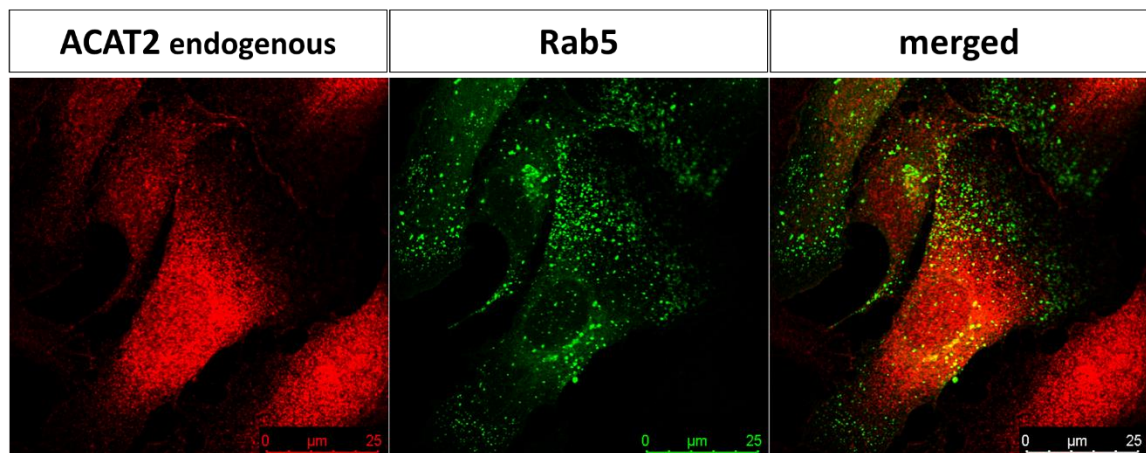
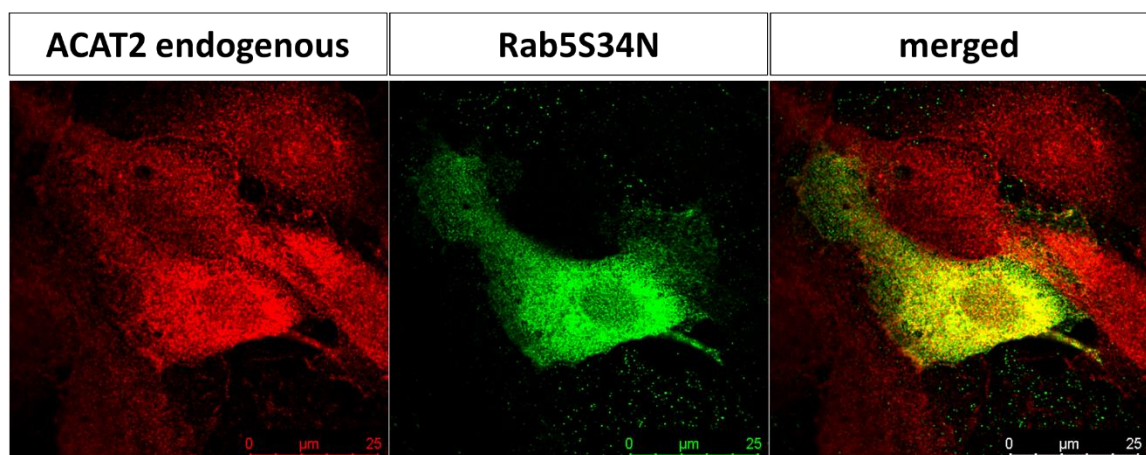


Εικόνα 3.19: Έλεγχος του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ενδογενούς ACAT2 σε κύτταρα HUVE και HepG2. Κύτταρα HUVE και HepG2 κύτταρα διαμολύνθηκαν με siRNA-μάρτυρα (εικόνες A&B αριστερά) ή με siRNA έναντι της ACAT2 (εικόνες A&B δεξιά), και έπειτα από 72 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Για τον έλεγχο της ACAT2 σε κύτταρα (A) HUVE και (B) HepG2 χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα 630 (μπλε). Κάτω από τις εικόνες μικροσκοπίας παρουσιάζεται ο έλεγχος της αποσιώπησης της ACAT2 με ανοσοαποτύπωση κατά western., χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της ACAT2 και της Actin (ως μάρτυρας ισοφόρτωσης).

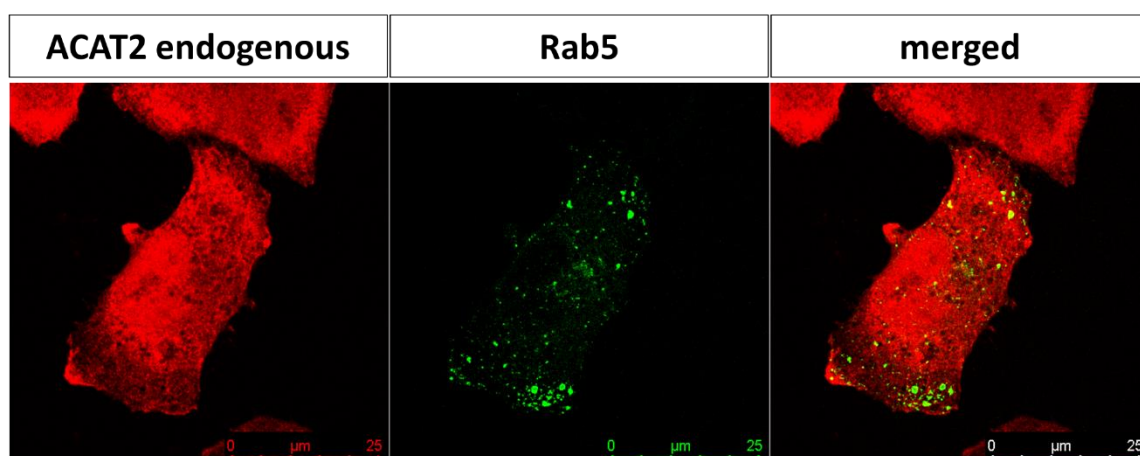
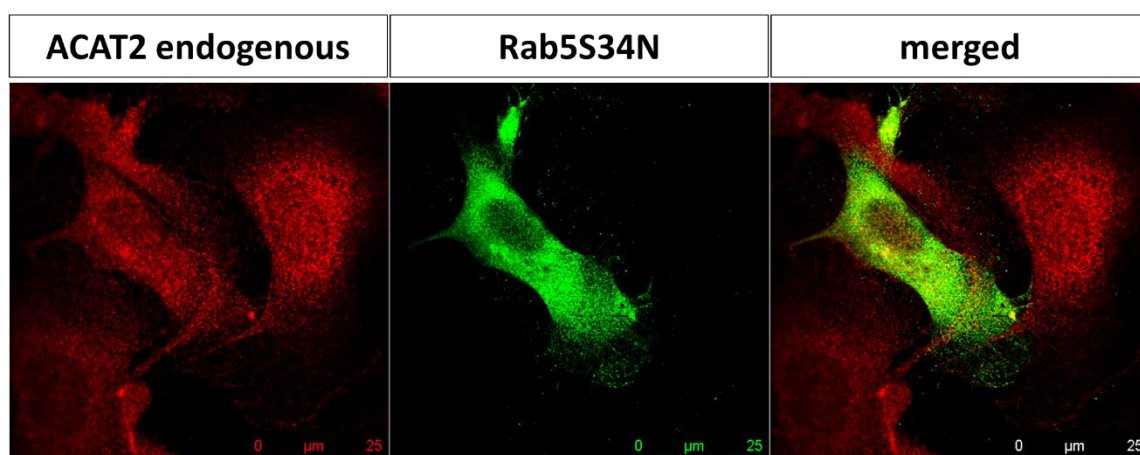
Γ. Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των Rab5 και ACAT2 χωρίς το πρόσδεμα ActA

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ACAT2 είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο, ενώ η Rab5 στην ενεργή της μορφή βρίσκεται στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων και στην ανενεργή της μορφή βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όπως φαίνεται και από την υπερέκφραση του ανενεργού μεταλλάγματος της Rab5 (Rab5S34N) στα κύτταρα, το οποίο έχει διάχυτο κυτταρόπλασμα εντοπισμό. Για να ελέγξουμε την σχετική τους ενδοκυτταρική τοποθεσία σε ανέπαφα κύτταρα, αρχικά, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με πλασμίδια υπερέκφρασης της φυσικού τύπου Rab5 και της Rab5S34N (320A & B αντίστοιχα), και στη συνέχεια έγινε έλεγχος του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ACAT2 με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης. Η αντίστοιχη διαδικασία εφαρμόστηκε και για κύτταρα HepG2 (εικόνες 3.21A & B αντίστοιχα).

Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.20B και 3.21B, τόσο η ανενεργή μορφή της Rab5 (πράσινο χρώμα), όσο και η ACAT2 (κόκκινο χρώμα) παρουσιάζουν ένα διάχυτο πρότυπο κατανομής. Με άλλα λόγια, δεν εντοπίζονται σε κάποιο μεμβρανικό κυτταρικό διαμέρισμα ή οργανίδιο.

A.**Overexpression of gfp-Rab5 wt****B.****Overexpression of flag-Rab5S34N (GDP)**

Εικόνα 3.20: Έλεγχος του σχετικού ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ACAT2 με την Rab5-GDP σε κύτταρα HUVE. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης της GFP-Rab5 (A) και Flag-Rab5 S34N(B), και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Για τον έλεγχο της Flag-Rab5 S34N χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προσδέματος Flag, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-488 (πράσινο), ενώ για τον έλεγχο της ACAT2 χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-594 (κόκκινο).

A.**Overexpression of gfp-Rab5 wt****B.****Overexpression of flag-Rab5S34N (GDP)**

Εικόνα 3.21: Έλεγχος του σχετικού ενδοκυτταρικού εντοπισμού της ACAT2 με την Rab5-GDP σε κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης της GFP-Rab5 (A) και Flag-Rab5 S34N(B), και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός. Για τον έλεγχο της Flag-Rab5 S34N χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προσδέματος Flag, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-488 (πράσινο), ενώ για τον έλεγχο της ACAT2 HepG2 χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa-594 (κόκκινο).

Δ. Η στόχευση της Rab5 στις μιτοχονδριακές μεμβράνες επάγει την στρατολόγηση της ACAT2

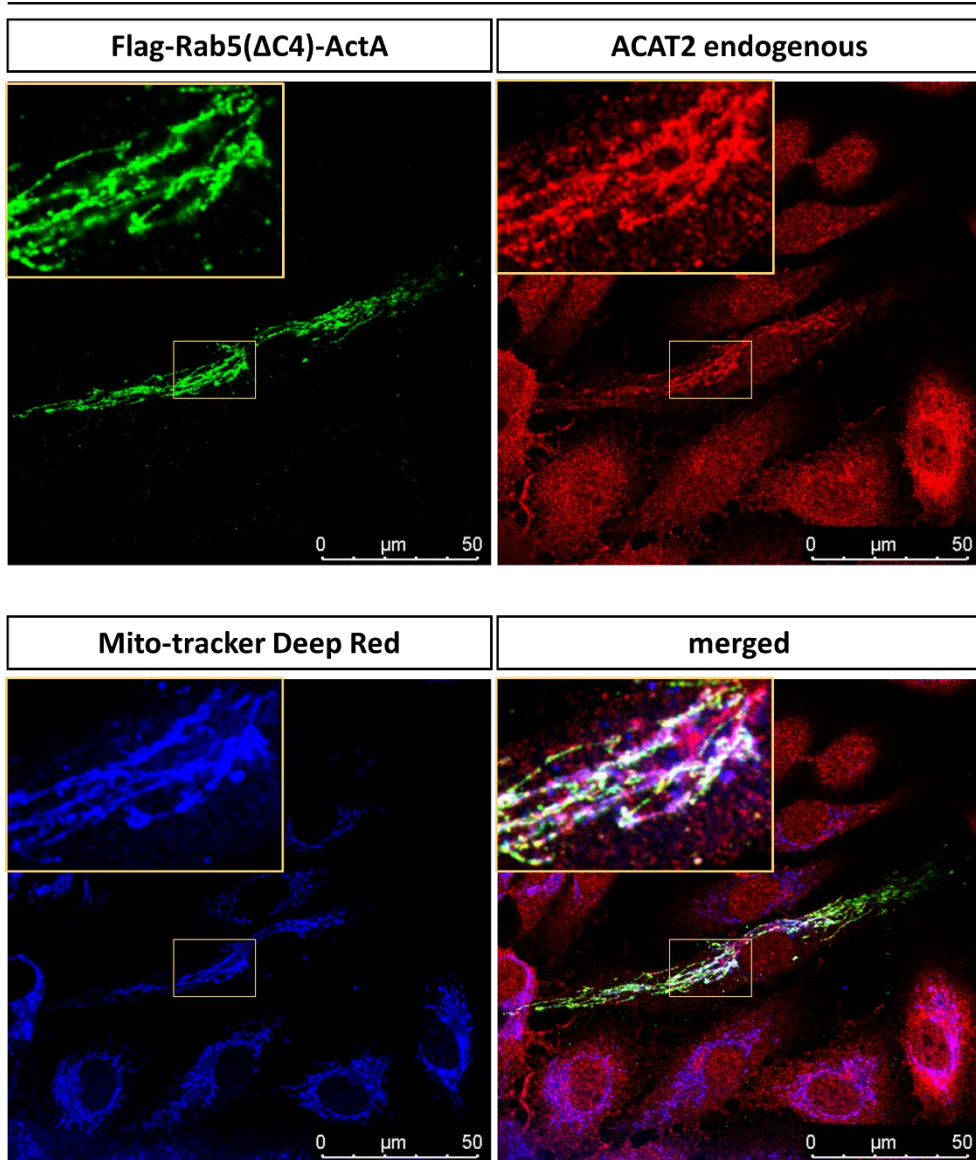
Προκειμένου λοιπόν να διερευνήσουμε αν η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών είναι εφικτή σε ανέπαφα κύτταρα (*in vivo*), ελέγξαμε αν η μιτοχονδριακά αγκυροβολημένη Rab5 μετατοπίζει την κυτταροπλασματική ACAT2 στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Έτσι, παρασκευάστηκαν πλασμίδια έκφρασης των τριών ισομορφών της Rab5 (WT, Q79L και S34N) στις οποίες προστέθηκε μετά το καρβοξυτελικό τους άκρο το πρόσδεμα ActA, το οποίο οδηγεί στην αγκυροβόλησή τους στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, ενώ πριν από το αμινοτελικό τους άκρο προστέθηκε το πρόσδεμα Flag. Επιπλέον από τις παραπάνω πρωτεΐνες έχει αφαιρεθεί το μοτίβο πρενυλίωσης CAAX που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο των μορίων (Rab5 ΔC4). Η αφαίρεση αυτού του μοτίβου είναι σημαντική για δύο λόγους, αφενός μεν αποτρέπει την σύνδεση της Rab5 στις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων - αφού η προσθήκη του ισοπρενοειδούς επιτρέπει την σύνδεση και σταθεροποίηση της Rab5 στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων^{81,82} - αφετέρου δε παρεμποδίζει τη δημιουργία συμπλόκου της Rab5 με την Rab-GDI - καθώς η πρενυλιωμένη Rab5 βρίσκεται σε σύμπλοκο με την Rab-GDI όταν είναι στην ανενεργή της μορφή στο κυτταρόπλασμα^{82,137}.

Αρχικά, η μιτοχονδριακά αγκυροβολημένη Rab5 φυσικού τύπου (flag-Rab5 ΔC4-ActA) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα HUVE. Μετά από 48 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προσδέματος flag και το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς ACAT2. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Alexa 488 και το Alexa 594, αντίστοιχα, τα οποία έχουν πολύ καλά διαχωρισμένα φάσματα διέγερσης και εκπομπής μεταξύ τους. Πριν την μονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τον μιτοχονδριακό δείκτη MitroTracker Deep Red FM που ενεργοποιείται σε μήκος κύματος 644nm. Παρατηρήθηκε ότι η ένα ποσοστό της ενδογενούς ACAT2 στρατολογείται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες μέσω της Rab5 (Εικόνα 3.22). Ωστόσο, στην περίπτωση του ανενεργού μεταλλάγματος της Rab5 (Rab5S34N), το οποίο βρίσκεται μόνιμα συνδεδεμένο με το GDP νουκλεοτίδιο, η ACAT2 παραμένει κυτταροπλασματική και δεν μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 3.23). Το παραπάνω πιθανά οφείλεται στην αδυναμία σύνδεσης της ACAT2 στην Rab5S34N, καθώς είναι πιθανό το μετάλλαγμα αυτό να μην διατηρεί την φυσιολογική διαμόρφωση που έχει η πρωτεΐνη στην GDP μορφή. Ως αρνητικός μάρτυρας, για την Rab5 φυσικού τύπου, χρησιμοποιήθηκε η συνεχώς ενεργή μορφή της Rab5 (Rab5 Q79L), η

οποία είναι συνδεδεμένη με το GTP νουκλεοτίδιο. Η μιτοχονδριακά αγκυροβολημένη Rab5 Q79L (flag-Rab5 Q79L ΔC4-ActA) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα HUVE, και ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία. Παρατηρήθηκε ότι η Rab5 Q79L, η οποία βρίσκεται στη GTP διαμόρφωση, δεν μπορεί να στρατολογήσει την ACAT2 στα μιτοχόνδρια (εικόνα 3.24), με την δεύτερη να παραμένει κυτταροπλασματική.

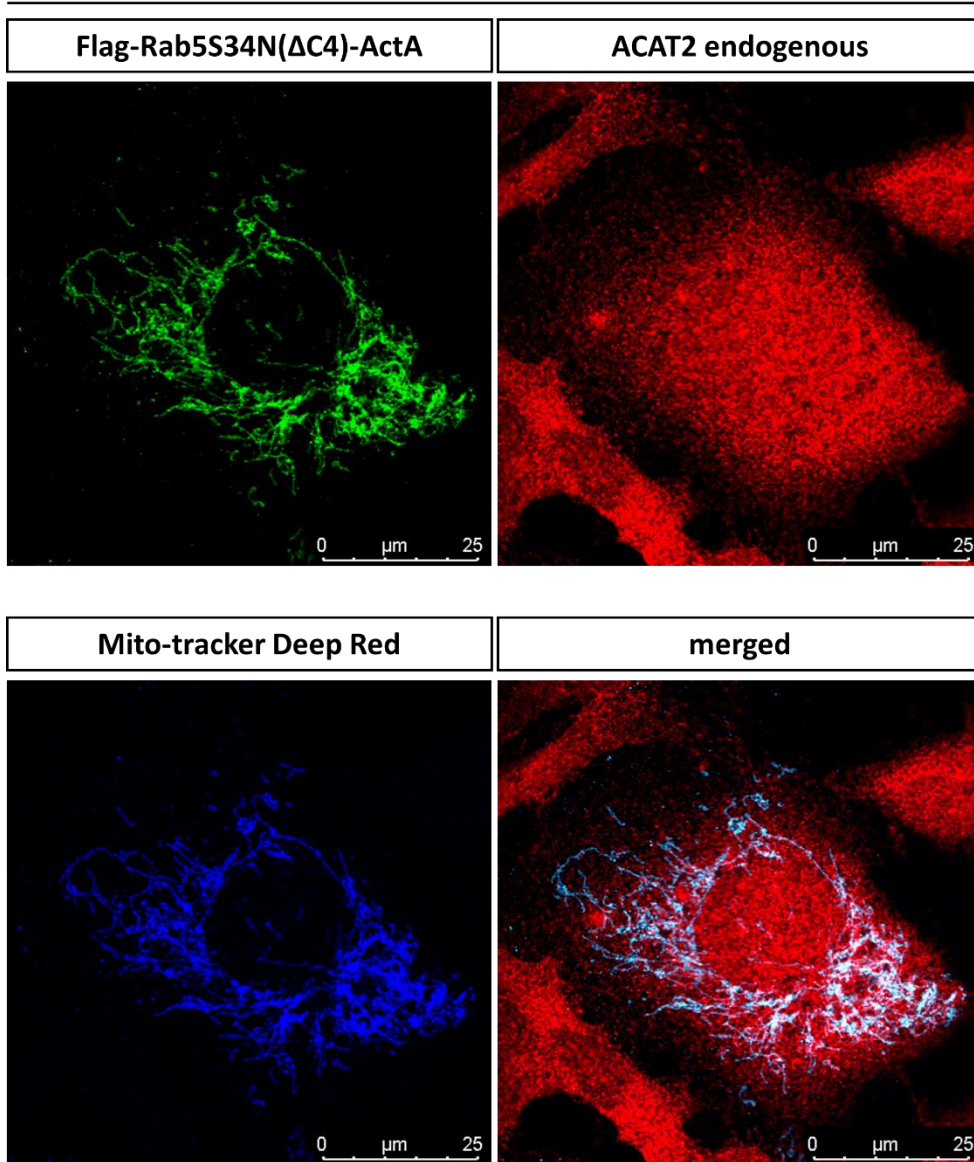
Με τα παραπάνω επιβεβαιώνουμε ότι η στρατολόγηση της ACAT2 στις μιτοχονδριακές μεμβράνες δεν είναι τυχαίο γεγονός, αλλά οφείλεται στην σύνδεσή της με την Rab5. Επιπλέον, η σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών εξαρτάται από την διαμόρφωση της Rab5, καθώς η Rab5Q79L δεν συνδέεται με την ACAT2. Επιπλέον, η φυσικού τύπου Rab5 στα μιτοχόνδρια, βρίσκεται μόνο στην ανενεργή μορφή της, καθώς δεν αλληλεπιδρά με παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίου και άλλες πρωτεΐνες που προάγουν την ανακύκλιση της Rab5 στην ενδοσωματική μεμβράνη. Εφόσον η Rab5S34N, βρίσκεται στην GDP μορφή, θα περίμενε κανείς να αλληλεπιδρά με την ACAT2. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε ως τώρα, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με το αν υπάρχει διαφορά στην στερεοδιαμόρφωση της Rab5 S34N σε σχέση με την φυσικού τύπου Rab5 στην GDP μορφή, κάτι που θα εξηγούσε την αδυναμία της μεταξύ τους σύνδεσης στο κύτταρο. Γνωρίζουμε μόνο ότι έχουν διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για το GTP με την Rab5 S34N να εμφανίζει αισθητά μικρότερη, τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* συνθήκες⁷⁹. Παρόλυτα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αδυναμία μετατόπισης της ACAT2 στα μιτοχόνδρια από την flag-Rab5S34N/ΔC4-ActA πιθανά να οφείλεται στη μη φυσιολογική διαμόρφωση που έχει η Rab5S34N στην GDP μορφή. Για την μερική και όχι την καθολική στρατολόγηση της ενδογενούς ACAT2, πρέπει να λάβουμε υπόψιν τα εξής, πρώτον ένα ποσοστό της ενδογενούς ACAT2 πιθανά συνδέεται με την ενδογενή Rab5, και δεύτερον η σύνδεση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών μπορεί να είναι παροδική. Τέλος, οι ίδιες πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν και σε κύτταρα HepG2, και παρατηρήσαμε ότι συμφωνούν με τις δοκιμές για τα HUVE κύτταρα, δηλαδή μόνο η υπερέκφραση της φυσικού τύπου μιτοχονδριακά αγκυροβολημένης Rab5 επάγει τη μετατόπιση της ACAT2 στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (Εικόνες 3.25, 3.26 και 3.27). Σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η σύνδεση μεταξύ των Rab5 και ACAT2 πραγματοποιείται σε κυτταρικό περιβάλλον (*in vivo*) ενώ η αλληλεπίδραση ισχύει για διαφορετικούς τύπους κυττάρων (HUVEC και HepG2). Οι παρατηρήσεις μας επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα *in vitro* πειράματα, που περιεγράφηκαν σε προηγούμενες ενότητες, δηλαδή ότι ACAT2 συνδέεται με την Rab5 στην GDP της μορφή και όχι στην GTP της μορφή.

Overexpression of Rab5-ActA (wt)



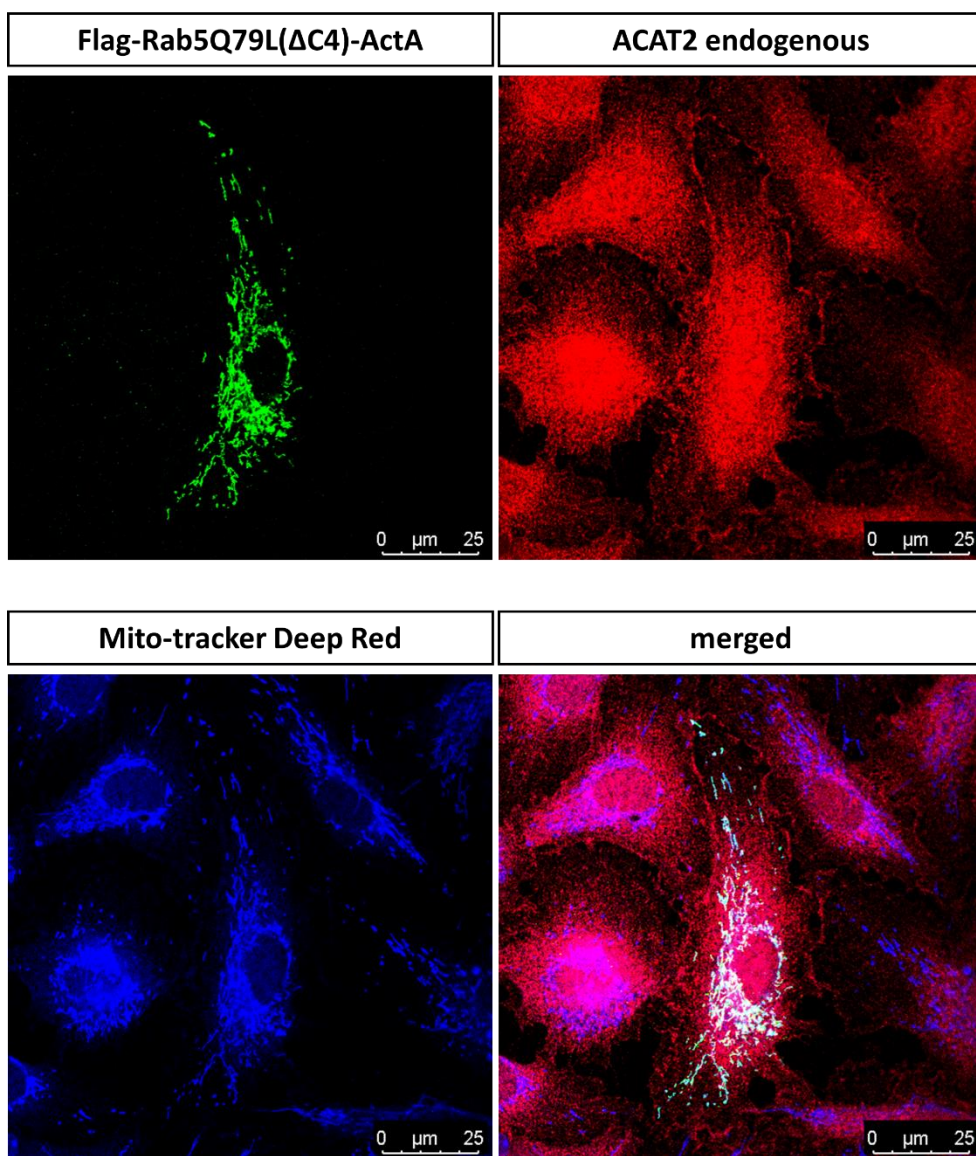
Εικόνα 3.22: Η στόχευση της *Rab5* στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων κυττάρων *HUVE*, μέσω του προσδέματος *ActA*, επάγει την μετατόπιση της ενδογενούς *ACAT2* στις *Rab5*-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Η πρωτεΐνη *FLAG-Rab5* (στην οποία προστέθηκε το πρόσδεμα *ActA*, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *HUVE* και ανιχνεύθηκε με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Με κόκκινη χρώση παρουσιάζεται η ενδογενής *ACAT2*, η οποία στρατολογείται μερικώς από την *Rab5* στα μιτοχόνδρια. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο μιτοχονδριακός δείκτης *Mito Tracker Deep Red FM*. Με άσπρο χρώμα (συνδυασμός πράσινου-κόκκινου-μπλε) παρουσιάζεται ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών και του μιτοχονδριακού δείκτη. Παρουσιάζονται σε μεγέθυνση μιτοχονδριακές δομές στις οποίες συνεντοπίζονται οι *Rab5* και *ACAT2*.

Overexpression of Rab5S34N-ActA (GDP form)



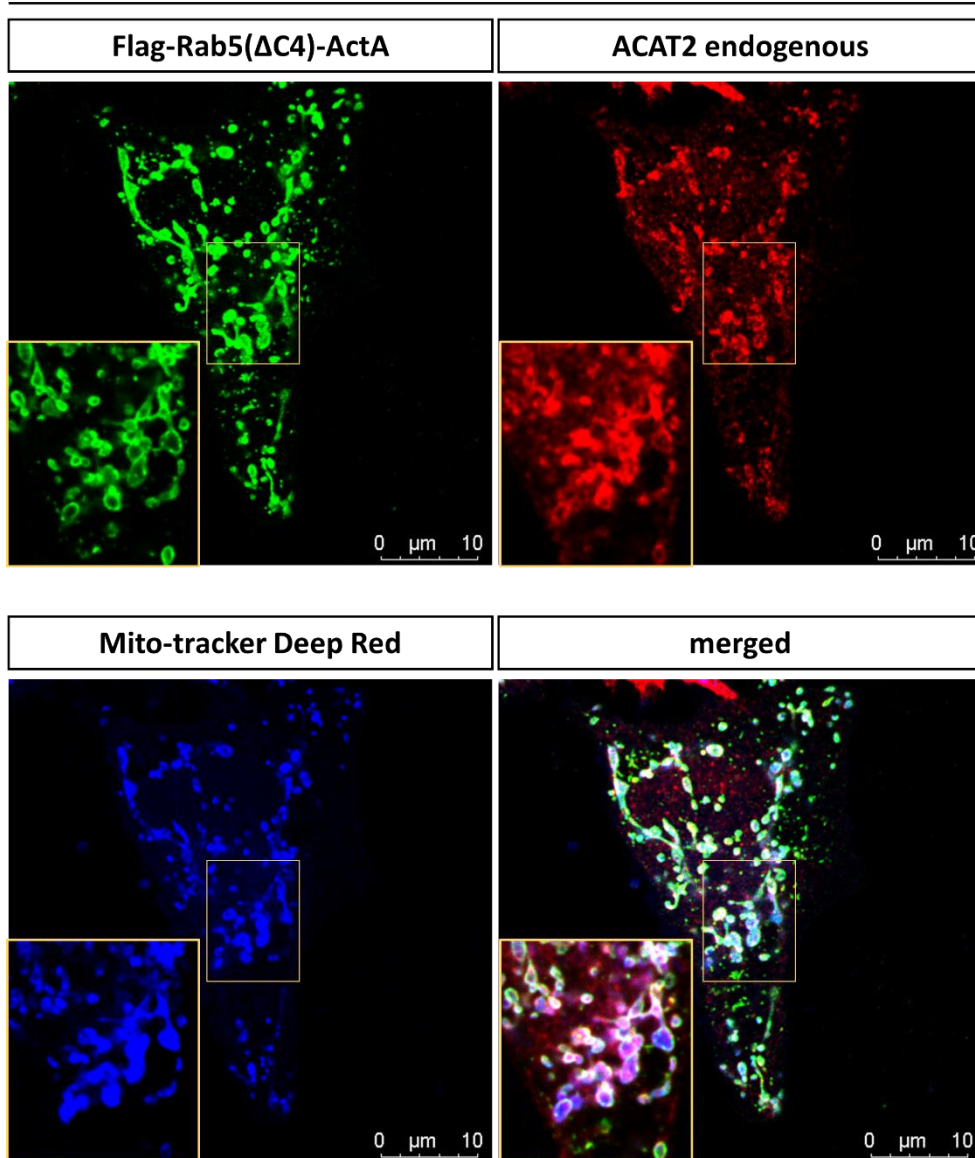
Εικόνα 3.23: Η στόχευση του μεταλλάγματος *Rab5S34N*, δηλαδή της GDP μορφής της *Rab5*, στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων κυττάρων *HUVE*, μέσω του προσδέματος *ActA*, δεν επάγει την μετατόπιση της ενδογενούς *ACAT2* στις *Rab5*-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Η πρωτεΐνη *FLAG-Rab5S34N* (στην οποία προστέθηκε το πρόσδεμα *ActA*, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *HUVE* και ανιχνεύθηκε με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Με κόκκινη χρώση παρουσιάζεται η ενδογενής *ACAT2*, η οποία παραμένει κυτταροπλασματική. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο μιτοχονδριακός δείκτης *Mito Tracker Deep Red FM*. Η απουσία δομών άσπρου χρώματος (συνδυασμός πράσινου-κόκκινου-μπλε) υποδεικνύει την απουσία συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών. Εντοπίζονται μόνο δομές κυανού χρώματος (συνδυασμός πράσινου-μπλε) λόγω συνεντοπισμού της *FLAG-Rab5S34N* και του μιτοχονδριακού δείκτη.

Overexpression of Rab5Q79L-ActA (GTP form)



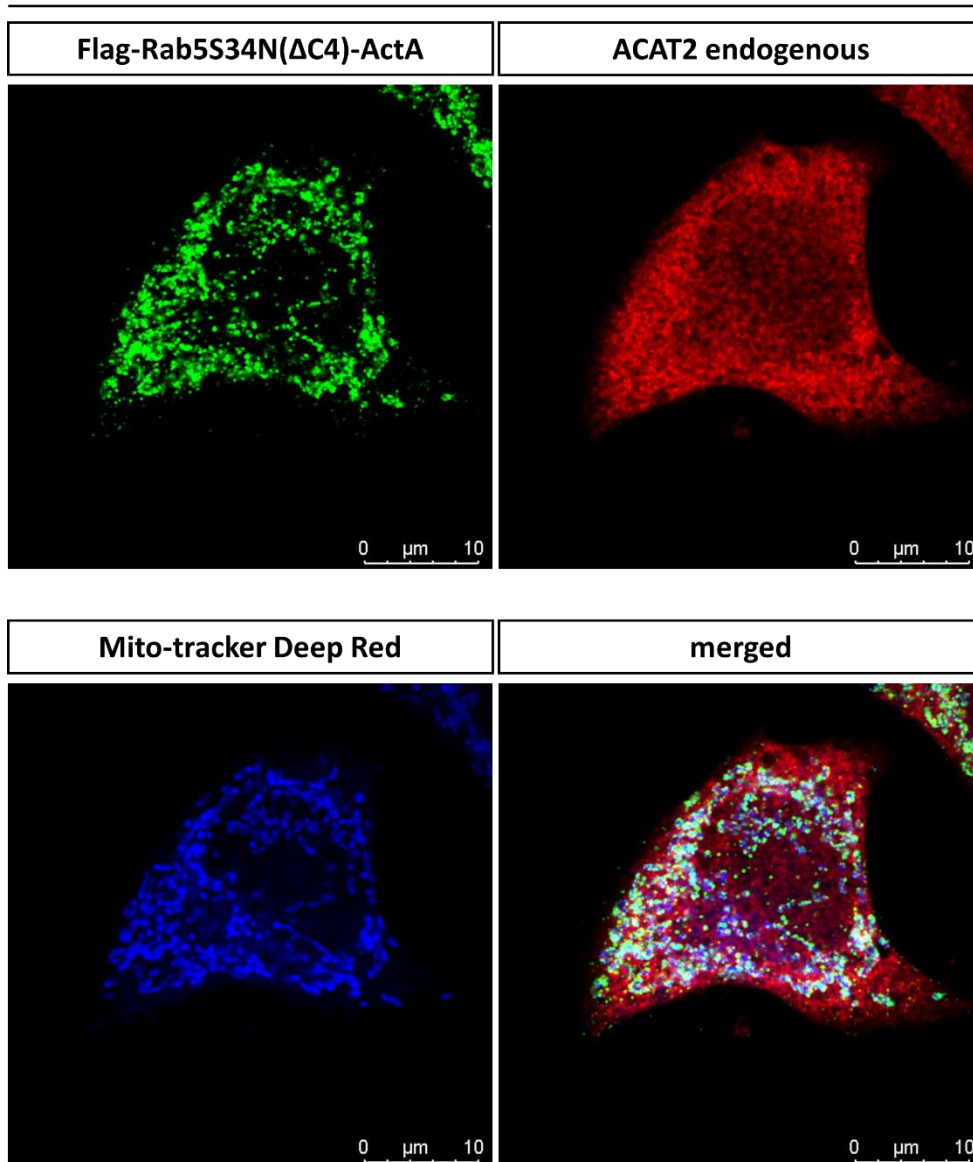
Εικόνα 3.24: Η στόχευση του μεταλλάγματος *Rab5Q79L*, δηλαδή της GTP μορφής της *Rab5*, στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων κυττάρων *HUVE*, μέσω του προσδέματος *ActA*, δεν επάγει την μετατόπιση της ενδογενούς *ACAT2* στις *Rab5*-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Η πρωτεΐνη *FLAG-Rab5Q79L* (στην οποία προστέθηκε το πρόσδεμα *ActA*, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *HUVE* και ανιχνεύθηκε με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Με κόκκινη χρώση παρουσιάζεται η ενδογενής *ACAT2*, η οποία παραμένει κυτταροπλασματική. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο μιτοχονδριακός δείκτης *Mito Tracker Deep Red FM*. Η απουσία δομών άσπρου χρώματος (συνδυασμός πράσινου-κόκκινου-μπλε) υποδεικνύει την απουσία συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών. Εντοπίζονται μόνο δομές κυανού χρώματος (συνδυασμός πράσινου-μπλε) λόγω συνεντοπισμού της *FLAG-Rab5Q79L* και του μιτοχονδριακού δείκτη.

Overexpression of Rab5-ActA (wt)



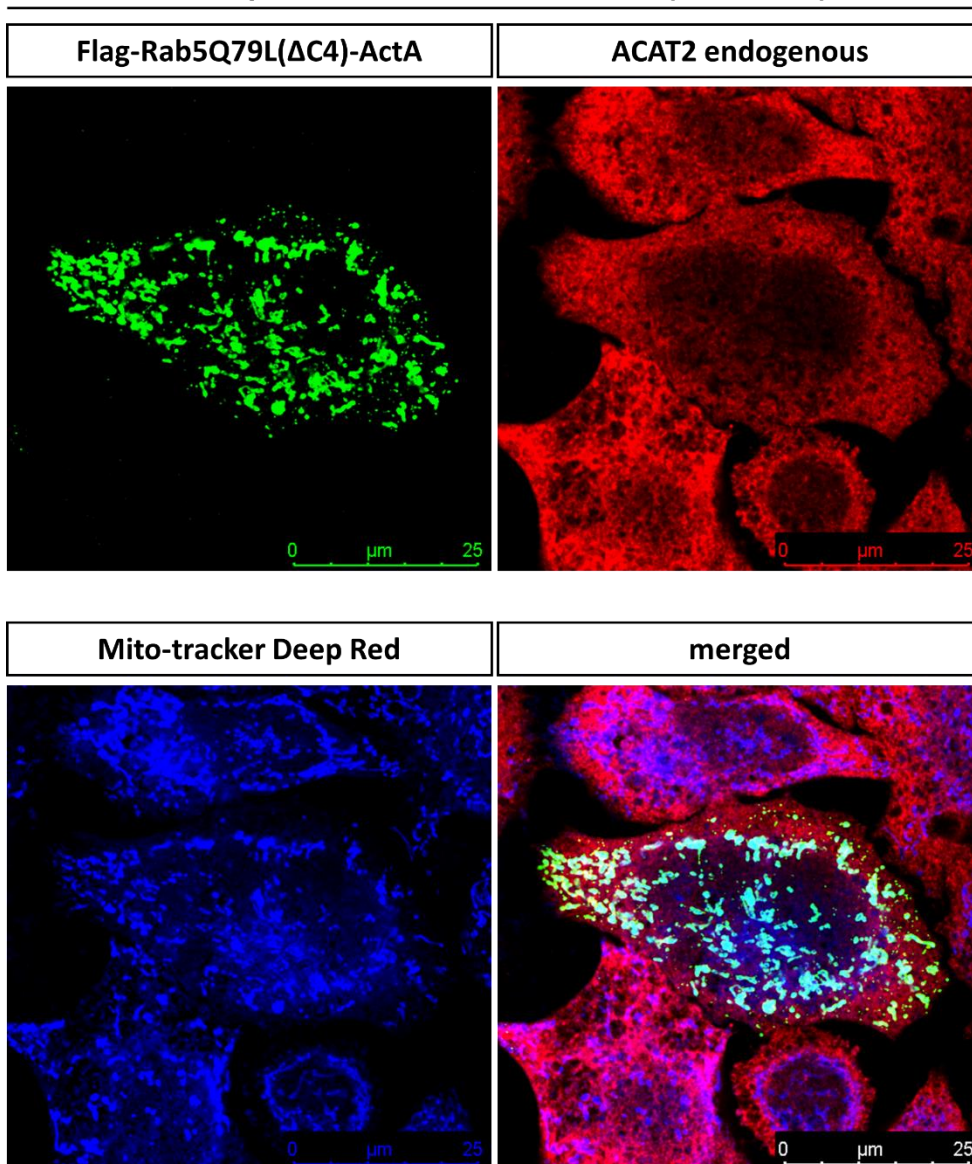
Εικόνα 3.25: Η στόχευση της *Rab5* στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων *HepG2* κυττάρων, μέσω του προσδέματος *ActA*, επάγει την μετατόπιση της ενδογενούς *ACAT2* στις *Rab5*-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Η πρωτεΐνη *FLAG-Rab5* (στην οποία προστέθηκε το πρόσδεμα *ActA*, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια) υπερεκφράστηκε σε *HepG2* κύτταρα και ανιχνεύθηκε με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Με κόκκινη χρώση παρουσιάζεται η ενδογενής *ACAT2*, η οποία στρατολογείται μερικώς από την *Rab5* στα μιτοχόνδρια. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο μιτοχονδριακός δείκτης *Mito Tracker Deep Red FM*. Με άσπρο χρώμα (συνδυασμός πράσινου-κόκκινου-μπλε) παρουσιάζεται ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών και του μιτοχονδριακού δείκτη. Παρουσιάζονται σε μεγέθυνση μιτοχονδριακές δομές στις οποίες συνεντοπίζονται οι *Rab5* και *ACAT2*.

Overexpression of Rab5S34N-ActA (GDP form)



Εικόνα 3.26: Η στόχευση του μεταλλάγματος Rab5S34N, δηλαδή της GDP μορφής της Rab5, στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων HepG2 κυττάρων, μέσω του προσδέματος ActA, δεν επάγει την μετατόπιση της ενδογενούς ACAT2 στις Rab5-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Η πρωτεΐνη FLAG-Rab5S34N (στην οποία προστέθηκε το πρόσδεμα ActA, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια) υπερεκφράστηκε σε HepG2 κύτταρα και ανιχνεύθηκε με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Με κόκκινη χρώση παρουσιάζεται η ενδογενής ACAT2, η οποία παραμένει κυτταροπλασματική. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο μιτοχονδριακός δείκτης Mito Tracker Deep Red FM. Η απουσία δομών άσπρου χρώματος (συνδυασμός πράσινου-κόκκινου-μπλε) υποδεικνύει την απουσία συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών. Εντοπίζονται μόνο δομές κυανού χρώματος (συνδυασμός πράσινου-μπλε) λόγω συνεντοπισμού της FLAG-Rab5S34N και του μιτοχονδριακού δείκτη.

Overexpression of Rab5Q79L-ActA (GTP form)



Εικόνα 3.27: Η στόχευση του μεταλλάγματος Rab5Q79L, δηλαδή της GTP μορφής της Rab5, στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων HepG2 κυττάρων, μέσω του προσδέματος ActA, δεν επάγει την μετατόπιση της ενδογενούς ACAT2 στις Rab5-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Η πρωτεΐνη FLAG-Rab5Q79L (στην οποία προστέθηκε το πρόσδεμα ActA, που επιτρέπει την τεχνητή μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια) υπερεκφράστηκε σε HepG2 κύτταρα και ανιχνεύθηκε με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Με κόκκινη χρώση παρουσιάζεται η ενδογενής ACAT2, η οποία παραμένει κυτταροπλασματική. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο μιτοχονδριακός δείκτης Mito Tracker Deep Red FM. Η απουσία δομών άσπρου χρώματος (συνδυασμός πράσινου-κόκκινου-μπλε) υποδεικνύει την απουσία συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών. Εντοπίζονται μόνο δομές κυανού χρώματος (συνδυασμός πράσινου-μπλε) λόγω συνεντοπισμού της FLAG-Rab5Q79L και του μιτοχονδριακού δείκτη.

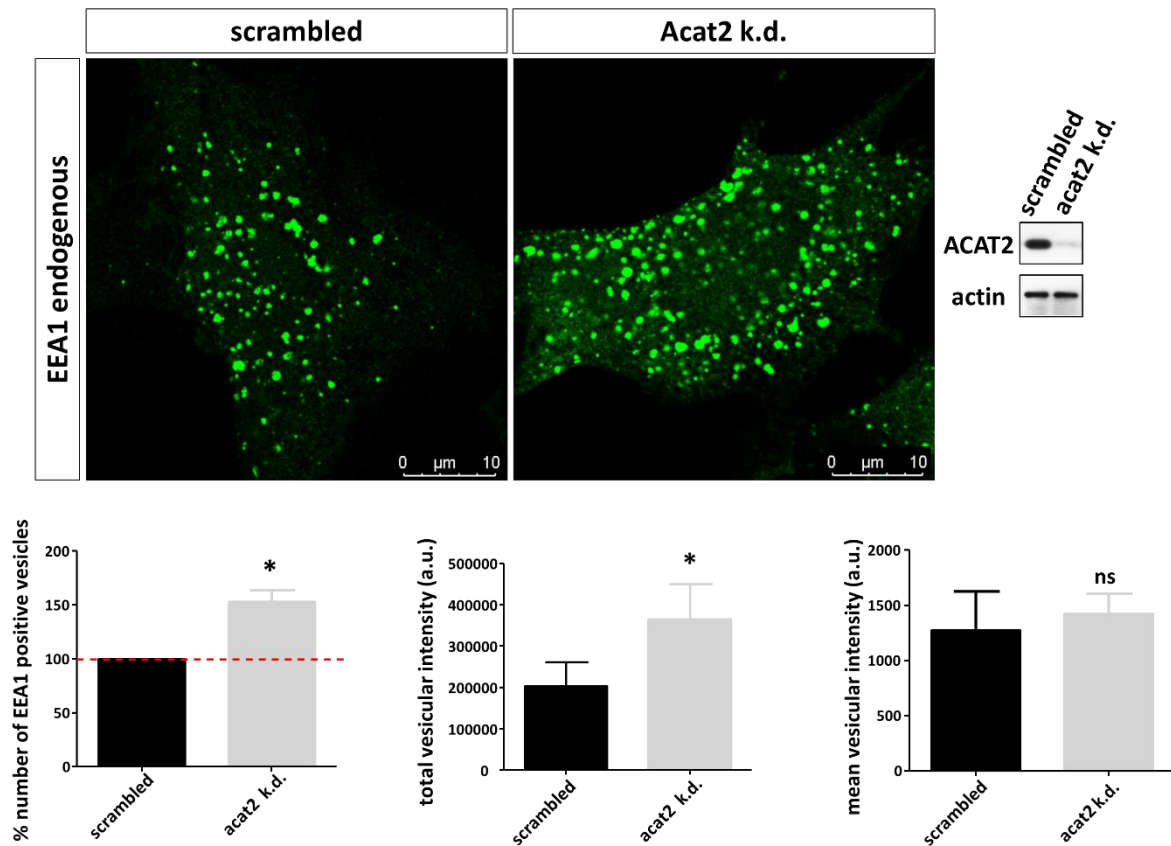
3.4 Μελέτη της λειτουργικής σημασίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2

3.4.1 Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στο ενδοσωματικό σύστημα *in vivo*

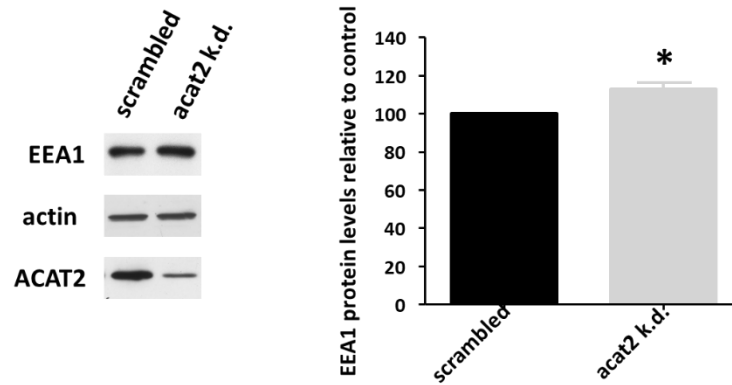
Είναι γνωστό ότι, σημαντική μείωση των επιπέδων της Rab5 στο κύτταρο προκαλεί 70% μείωση του αριθμού των ενδοσωμάτων, χωρίς όμως να επηρεάζεται το μέγεθος ή η λειτουργικότητα των εναπομεινάντων ενδοσωμάτων⁴³. Συγκεκριμένα, καθώς τα επίπεδα της Rab5 μειώνονται σταδιακά, το ενδοσωματικό δίκτυο προσαρμόζεται αναλόγως ώστε να διατηρήσει τα φυσιολογικά επίπεδα της Rab5 στα εναπομείναντα ενδοσώματα. Ως εκ τούτου, η βιογένεση των πρώιμων ενδοσωμάτων καταστέλλεται, προκαλώντας την σταδιακή μείωση του αριθμού των ενδοσωμάτων⁴³. Η Rab5, ως το κεντρικό μόριο ενός πολύπλοκου δικτύου πρωτεϊνών που ρυθμίζει την πρόσδεση, την σύντηξη και την διακίνηση των μεμβρανών στόχων, θεωρείται **ο κύριος ρυθμιστής της βιογένεσης των πρώιμων ενδοσωμάτων**⁷⁰.

Καθώς γνωρίζουμε ότι η ACAT2 αλληλεπιδρά τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* με την ανενεργή μορφή της Rab5, ελέγξαμε το ρόλο της στο ενδοσωματικό σύστημα. Συγκεκριμένα μελετήσαμε την επίδραση της μείωσης των επιπέδων της ACAT2 στο ενδοσωματικό σύστημα. Για τον σκοπό αυτό, έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE ή/και HepG2, και μετά από 72 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς EEA1, η οποία είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες των πρώιμων ενδοσωμάτων. Η ανίχνευση των πρώιμων ενδοσωμάτων έγινε με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser, ενώ οι εικόνες αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ. Τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η αποσιώπηση της ACAT2 στα κύτταρα HUVE προκαλεί 50% αύξηση του αριθμού των πρώιμων ενδοσωμάτων (κυστίδια θετικά για την EEA1) καθώς και 50% αύξηση της συνολικής έντασης του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα (Εικόνα 3.28). Αντιστοίχως, στα κύτταρα HepG2 παρατηρούμε την ίδια αύξηση ως προς τον αριθμό των ενδοσωμάτων και την ένταση του σήματος της EEA1 σε αυτά (Εικόνα 3.30). Επιπλέον, η μελέτη για την κατανομή του μεγέθους των κυστιδίων καθώς και για το μέσο μέγεθος τους δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε κύτταρα ελέγχου και κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της ACAT2, για καμία από τις 2 κυτταρικές σειρές (τα δεδομένα δεν παρατίθενται). Επομένως, μόνο ο αριθμός των κυστιδίων αυξάνεται ενώ το

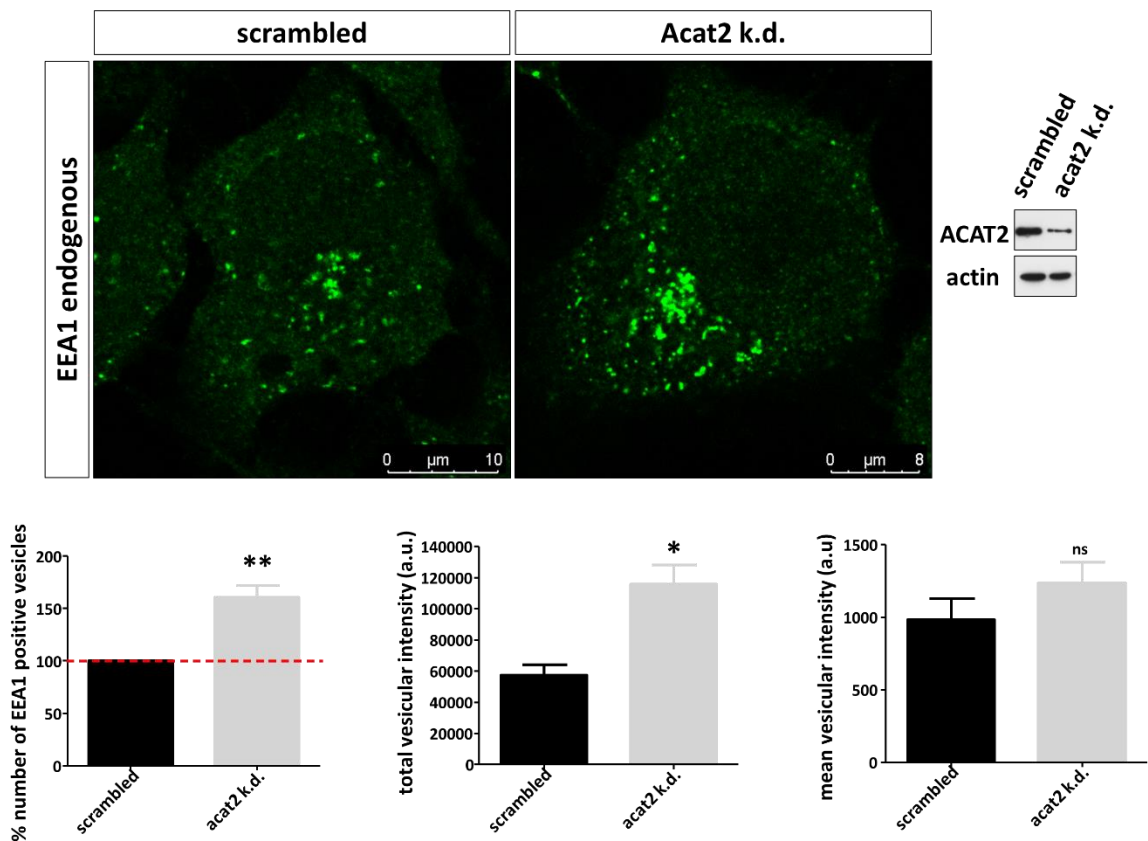
μέγεθος παραμένει ίδιο. Επιπρόσθετα, προκειμένου να ελέγξουμε αν η αύξηση των επιπέδων της EEA1 στα ενδοσώματα οφείλεται σε μια πιθανή συνολική αύξηση της έκφρασης της EEA1, ελέγξαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της EEA1 στα ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HUVΕ μετά από αποσιώπηση της ACAT2. Παρατηρήσαμε μια μικρή αύξηση της EEA1, της τάξης του 13% (Εικόνα 3.29), η οποία δεν είναι σημαντική και δεν μπορεί να εξηγήσει την μεγάλη αύξηση της έντασης της EEA1 στα ενδοσώματα. Επιπλέον, συγκρίνοντας κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της ACAT2 και κύτταρα ελέγχου, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην ένταση του σήματος της EEA1 ανά κυστίδιο (εικόνα 3.29, διάγραμμα κάτω δεξιά). Αντιστοίχως, στα κύτταρα HepG2 παρατηρούμε επίσης ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην ένταση του σήματος της EEA1 ανά κυστίδιο (εικόνα 3.31, διάγραμμα κάτω δεξιά). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι, η αύξηση της συνολικής έντασης του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα δεν οφείλεται στην αύξηση της έκφρασης της EEA1 στα κύτταρα στα οποία έγινε η αποσιώπηση της ACAT2, αλλά πιθανά στην μετακίνηση της EEA1 από το κυτταρόπλασμα σε μεγαλύτερο αριθμό ενδοσωμάτων. Συμπερασματικά, η αποσιώπηση της ACAT2 οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των ενδοσωμάτων και όχι στην αύξηση της συνολικής ποσότητας της EEA1 ανά ενδόςωμα, σε συμφωνία με το ρόλο της Rab5 στα ενδοσώματα⁴³.



Εικόνα 3.28: Μείωση των επιπέδων της ACAT2 στα κύτταρα HUVE προκαλεί αύξηση του αριθμού των πρώιμων ενδοσωμάτων (κυστίδια θετικά για την EEA1) και της συνολική έντασης του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα. Αρχικά έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE, και μετά από 72 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς EEA1. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, που ελήφθησαν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser, από κύτταρα ελέγχου και κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της ACAT2. Με πράσινο χρώμα φαίνονται τα EEA1-θετικά ενδοσώματα (πάνω αριστερά). Παρουσιάζεται επίσης ο έλεγχος της αποσιώπησης της ACAT2 με ανοσοαποτύπωση κατά western (πάνω δεξιά). Στο διάγραμμα κάτω αριστερά παρουσιάζεται ποσοστιαία αύξηση του αριθμού των ενδοσωμάτων, στο μεσαίο διάγραμμα παρουσιάζεται η συνολική ένταση του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα και στο διάγραμμα δεξιά η μέση ένταση του σήματος της EEA1 ανά κυτίδιο. Η ποσοτική ανάλυση του αριθμού των EEA1-θετικών ενδοσωμάτων και της έντασης της EEA1 πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από 20 διαφορετικά κύτταρα ανά συνθήκη, από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3$, $mean \pm SEM$, $*P<0.05$, t -test).



Εικόνα 3.29: Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της EEA1 μετά από αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE. Αριστερά παρουσιάζεται η ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την EEA1 (n=2). Δεξιά παρουσιάζεται η πυκνομετρική ανάλυση της 170 kDa πρωτεϊνικής ζώνης της EEA1. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από δύο ανεξάρτητα πειράματα (n=2 ± SEM, *P<0.05, t-test).



Εικόνα 3.30: Μείωση των επιπέδων της ACAT2 στα HepG2 κύτταρα προκαλεί αύξηση του αριθμού των πρόιμων ενδοσωμάτων (κυστίδια θετικά για την EEA1) και της συνολική έντασης του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα. Αρχικά έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε HepG2 κύτταρα, και μετά από 72 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς EEA1. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, που ελήφθησαν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser, από κύτταρα ελέγχου και κύτταρα στα οποία έγινε

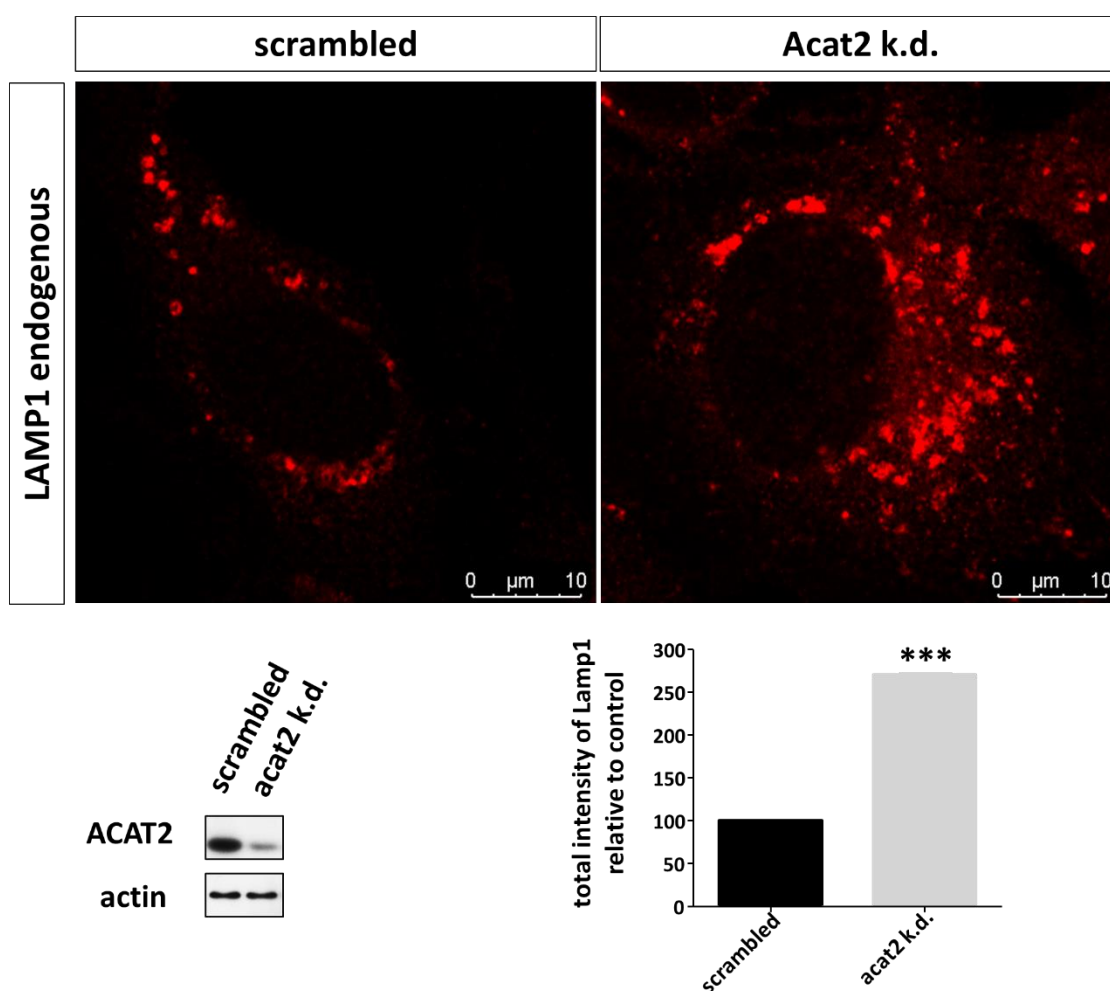
αποσιώπηση της ACAT2. Με πράσινο χρώμα φαίνονται τα EEA1-θετικά ενδοσώματα (πάνω αριστερά). Παρουσιάζεται επίσης ο έλεγχος της αποσιώπησης της ACAT2 με ανοσοαποτύπωση κατά western (πάνω δεξιά). Στο διάγραμμα κάτω αριστερά παρουσιάζεται ποσοστιαία αύξηση του αριθμού των ενδοσωμάτων, στο μεσαίο διάγραμμα παρουσιάζεται η συνολική ένταση του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα και στο διάγραμμα δεξιά η μέση ένταση του σήματος της EEA1 ανά κυστίδιο. Η ποσοτική ανάλυση του αριθμού των EEA1-θετικών ενδοσωμάτων και της έντασης της EEA1 πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από 20 διαφορετικά κύτταρα ανά συνθήκη, από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3$, $mean \pm SEM$, $**P<0.01$ για τον αριθμό των ενδοσωμάτων, $*P<0.05$ για την ένταση της EEA1, t -test).

3.4.2 Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στο λυσοσωματικό σύστημα *in vivo*

Κατά τη διάρκεια της ενδοκυττάρωσης, το φορτίο που εισέρχεται στο κύτταρο οδηγείται στα πρώιμα ενδοκυτταρικά κυστίδια, και στη συνέχεια είτε επιστρέφει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε μεταφέρεται στα Rab5-θετικά πρώιμα ενδοσώματα τα οποία μετατρέπονται σε όψιμα Rab7-θετικά ενδοσώματα, όπου τελικώς συντήκονται με τα λυσοσώματα^{3,64,138}. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η μείωση του αριθμού των πρώιμων ενδοσωμάτων, λόγω της μείωσης των επιπέδων της Rab5, έχει ως επακόλουθο την μείωση του αριθμού των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων⁴³.

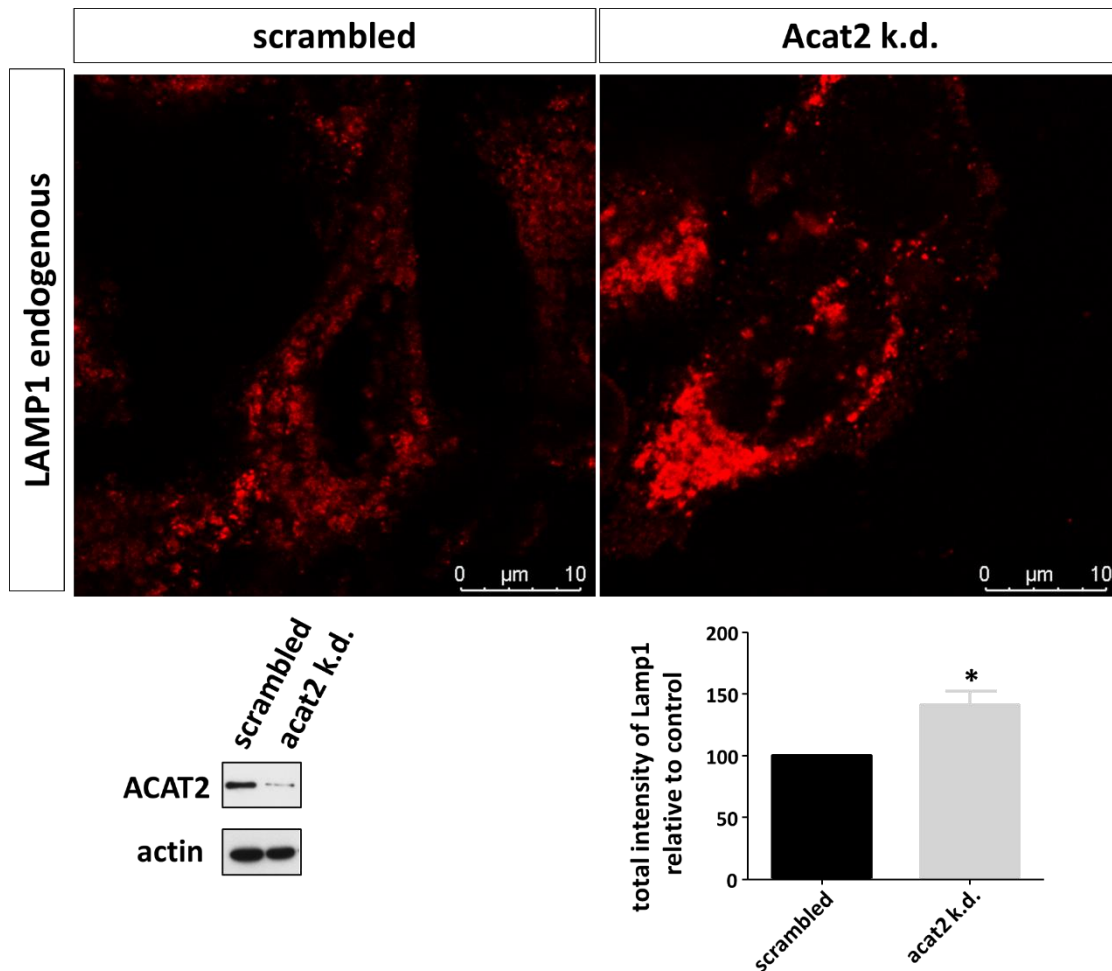
Προκειμένου να διερευνήσουμε αν οι μεταβολές του αριθμού των ενδοσωμάτων, ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης της ACAT2, επηρεάζουν την μετακίνηση από το ενδόσωμα στο λυσόσωμα, κατ' αναλογία με το ρόλο της Rab5⁴³, μελετήσαμε την κατανομή του δείκτη LAMP1, ο οποίος είναι γνωστό ότι ακολουθεί το μονοπάτι αυτό. Έτσι, εξετάσαμε αν η μείωση των επιπέδων της ACAT2 επηρεάζει το μονοπάτι από τα πρώιμα ενδοσώματα προς τα λυσοσώματα, ως αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των ενδοσωμάτων. Ως δείκτης του μονοπατιού αυτού αλλά και των όψιμων ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η LAMP1, η οποία μετακινείται δίκτυο από το trans-Golgi στα πρώιμα ενδοσώματα, πριν καταλήξει στα λυσοσώματα^{3,139}. Αρχικά, έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE ή/και HepG2, και μετά από 72 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς LAMP1. Οι εικόνες αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ, όπως και στην περίπτωση της EEA1. Παρατηρήσαμε ότι η αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE προκαλεί αύξηση της έντασης του σήματος της LAMP1 κατά 150% (εικόνα 3.31), ενώ στα HepG2 κύτταρα η ένταση αυξάνεται περίπου 50% (εικόνα 3.32). Εφόσον, τα όψιμα ενδοσώματα, και κατά συνέπεια τα λυσοσώματα, προέρχονται από τα πρώιμα ενδοσώματα³, η αύξηση της LAMP1 που παρατηρείται και στις δύο κυτταρικές σειρές κατά την αποσιώπηση της

ACAT2, είναι πιθανό επακόλουθο της αύξησης του αριθμού των ενδοσωμάτων (βλέπε ενότητα 3.4.1), και κατά συνέπεια της αύξησης της διακίνησης της LAMP1 από το ενδόσωμα προς το λυσόσωμα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει μια λειτουργική διασύνδεση μεταξύ της ACAT2 και της Rab5 σε ό,τι αφορά το ρόλο της Rab5 στον έλεγχο της βιογένεσης του ενδολυσοσωματικού συστήματος του κυττάρου. Τέλος, από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η αύξηση του αριθμού των ενδοσωμάτων (κατά την αποσιώπηση της ACAT2) δεν οφείλεται σε αναστολή του μονοπατιού διακίνησης από το ενδόσωμα προς το λυσόσωμα. Αντίθετα, η αποσιώπηση της ACAT2 πιθανά επάγει το μονοπάτι από το ενδόσωμα προς το λυσόσωμα.



Εικόνα 3.31: Μείωση των επιπέδων της ACAT2 στα κύτταρα HUVE προκαλεί αύξηση της συνολική έντασης του σήματος της LAMP1 των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων. Αρχικά έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE, και μετά από 72 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς LAMP1. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, που ελήφθησαν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης

με laser, από κύτταρα ελέγχου και κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της ACAT2. Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι LAMP1 θετικές δομές (πάνω). Παρουσιάζεται επίσης ο έλεγχος της αποσιώπησης της ACAT2 με ανοσοαποτύπωση κατά western (κάτω αριστερά). Στο διάγραμμα κάτω δεξιά παρουσιάζεται η ποσοστιαία αύξηση της συνολική έντασης του σήματος της LAMP1. Η ποσοτική ανάλυση της έντασης της LAMP1 πραγματοποιήθηκε με το ImageJ. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από 20 διαφορετικά κύτταρα ανά συνθήκη, από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3 \pm SEM$, $***P<0.001$, t -test).



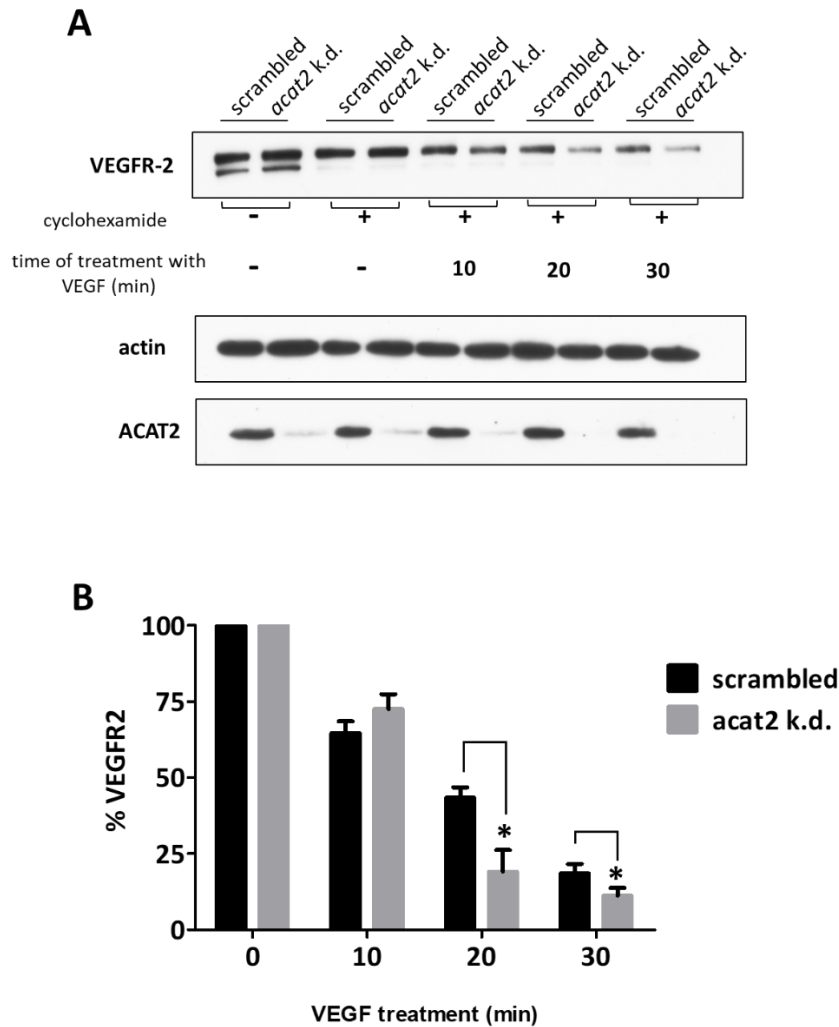
Εικόνα 3.32: Μείωση των επιπέδων της ACAT2 στα HepG2 κύτταρα προκαλεί αύξηση του της συνολική έντασης του σήματος της LAMP1 των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων. Αρχικά έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε HepG2 κύτταρα, και μετά από 72 ώρες ακολούθησε μονιμοποίηση και ανοσοφθορισμός με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς LAMP1. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, που ελήφθησαν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser, από κύτταρα ελέγχου και κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση της ACAT2. Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι LAMP1 θετικές δομές (πάνω). Παρουσιάζεται επίσης ο έλεγχος της αποσιώπησης της ACAT2 με ανοσοαποτύπωση κατά western (κάτω αριστερά). Στο διάγραμμα κάτω δεξιά παρουσιάζεται η ποσοστιαία αύξηση της συνολική έντασης του σήματος της LAMP1. Η ποσοτική ανάλυση της έντασης της LAMP1 πραγματοποιήθηκε με το ImageJ. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από 20 διαφορετικά κύτταρα ανά συνθήκη, από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3 \pm SEM$, $*P<0.05$, t -test).

3.4.3 Έλεγχος του ρόλου της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

Η Rab5 ελέγχει την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα ενδοσώματα⁷¹, αλλά και την διαλογή τους στα οργανίδια αυτά⁷⁹, ορίζοντας έτσι την τύχη των υποδοχέων, είτε προς αποικοδόμηση είτε προς ανακύκλωση. Ένας από τους υποδοχείς του οποίου η ενδοκυττάρωση ελέγχεται από την Rab5 είναι ο VEGFR2¹⁴⁰. Με βάση τα παραπάνω, θελήσαμε να ελέγξουμε το ρόλο της ACAT2 στη λειτουργία της Rab5, μελετώντας την επίδραση της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα VEGFR2 σε κύτταρα HUVE, χρησιμοποιώντας ένα εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης για τον υποδοχέα VEGFR2¹⁴⁰⁻¹⁴². Καταρχάς, ελέγξαμε αν η αποσιώπηση της ACAT2 μεταβάλλει τον ρυθμό αποικοδόμησης του VEGFR2 μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με αντινοσηματικά νουκλεοτίδια έναντι της ACAT2. Μετά το πέρας 72 ωρών, τα κύτταρα επώαστηκαν με κυκλοεξιμίδιο (αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης) για 1 ώρα ώστε να παρεμποδίσουμε την παραγωγή νέων μορίων VEGFR2. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 50 μg/ml VEGF για χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 λεπτών. Τέλος, έγινε λύση των κυττάρων και τα δείγματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών VEGFR2, ακτίνης και ACAT2. Όπως φαίνεται από την ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 3.33), παρόμοια ποσοστά αποικοδόμησης της αρχικής ποσότητας του VEGFR2 παρατηρούνται για 10 λεπτά επαγωγής με VEGF σε κύτταρα που έχει γίνει αποσιώπηση της ACAT2 και σε κύτταρα ελέγχου. Επιπλέον, σε κύτταρα που έχει γίνει αποσιώπηση της ACAT2 φαίνεται να επιταχύνεται η αποικοδόμηση του υποδοχέα για τα χρονικά σημεία των 20 και 30 λεπτών, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου (μεταπτυχιακή μελέτη, Αθανάσιος Ζιώγας), όπου διαπιστώθηκε ότι η αποσιώπηση της ACAT2 αυξάνει τον ρυθμό αποικοδόμησης του EGF υποδοχέα (EGFR), σε κύτταρα HeLa, μετά από επαγωγή με τον αυξητικό παράγοντα EGF.

Συμπερασματικά, η αποσιώπηση της έκφρασης της ACAT2 αυξάνει το ρυθμό αποικοδόμησης του υποδοχέα VEGFR2 μετά από επαγωγή με VEGF. Γνωρίζουμε ότι η Rab5 παίζει ρόλο στον ρυθμό της ενδοκυττάρωσης κατά τα πρώιμα στάδια, μέσω της συνεχούς μεταβολής της μεταξύ ενεργούς και ανενεργούς κατάστασης^{71,79,97}. Αν λοιπόν,

απουσία της ACAT2 από το κύτταρο - η οποία θα συνδεόταν με την ανενεργή μορφή της Rab5 – αυξάνεται ο ρυθμός ενεργοποίησης της Rab5 τότε κατά συνέπεια αυξάνεται και ο ρυθμός εσωτερίκευσης των υποδοχέων VEGFR2 και EGFR.



Εικόνα 3.33: Η μείωση των επιπέδων της ACAT2 προάγει την αποικοδόμηση του VEGFR2. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με αντινοσηματικά νουκλεοτίδια έναντι της ACAT2. Μετά το πέρας 72 ωρών, τα κύτταρα επωάστηκαν με κυκλοεξιμίδιο (αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης) για 1 ώρα, και στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν με 50 μg/ml VEGF για χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 λεπτών. Μετά την επαγωγή με VEGF ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (A) χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του VEGFR2, της Actin (ως μάρτυρας ισοφόρτωσης) και της ACAT2. (B) Πυκνομετρική ανάλυση της 230 kDa πρωτεϊνικής ζώνης του VEGFR2. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3 \pm SEM$, $*P<0.05$, 2way ANOVA).

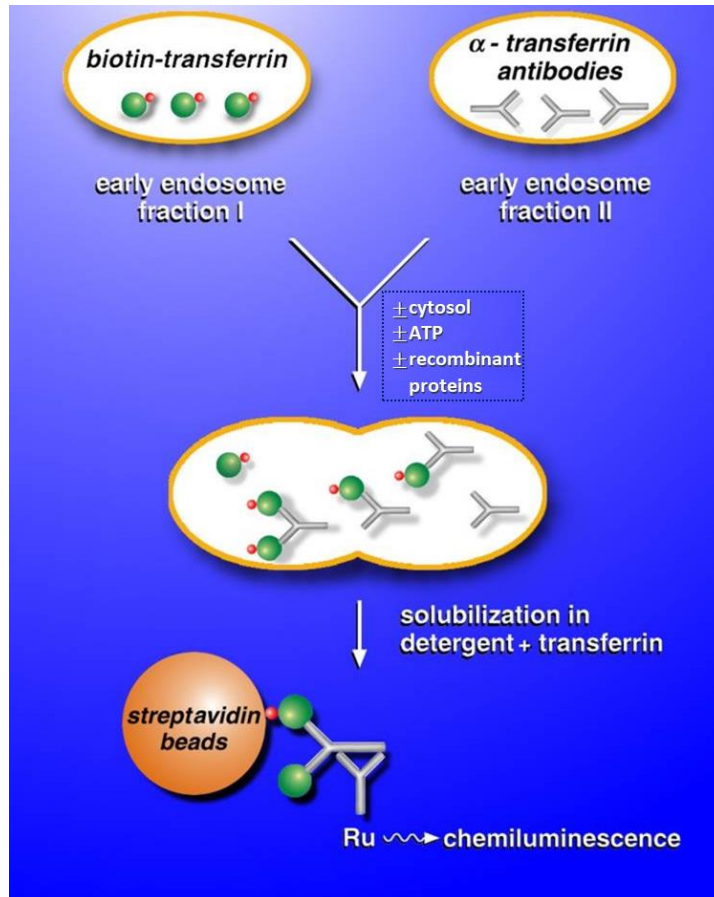
3.4.4 Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στην σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων

Από τα παραπάνω πειράματα, που αφορούν στην επίπτωση της αποσιώπησης της ACAT2 στην αποικοδόμηση των υποδοχέων VEGFR2 και EGFR και στον αριθμό των ενδοσωμάτων, διαφαίνεται ότι η ACAT2 εμπλέκεται στους μηχανισμούς της ενδοκυττάρωσης. Αυτές οι ενδοκυτταρικές οδοί ελέγχονται από την Rab5, ενώ η διακίνηση από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα συνδέεται με την ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων, μία διαδικασία η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη μικρή GTPase Rab5⁷⁹. Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω τη σημασία της ACAT2 στη λειτουργία της Rab5, εξετάσαμε τον ρόλο της στην *in vitro* ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων, μια καλά εδραιωμένη δοκιμασία που εξαρτάται από την Rab5^{52,96-98}. Για τον σκοπό αυτό, χρειαστήκαμε επαρκώς υψηλές ποσότητες καθαρισμένων ACAT2, Rab5 και GDI. Ως εκ τούτου, έγινε παραγωγή των ανωτέρω πρωτεϊνών ως ανασυνδυασμένες με το πρόσδεμα GST ή His, χρησιμοποιώντας βακτηριακό σύστημα έκφρασης και ακολούθησε ο καθαρισμός τους με χρωματογραφία συγγένειας με σφαιρίδια γλουταθειόνης ή νικελίου, αντίστοιχα. Τα πρωτόκολλα καθαρισμού και η ανάλυση SDS-PAGE των σταδίων καθαρισμού αυτών των πρωτεϊνών περιγράφονται στην ενότητα 3.1. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ομοτυπικής σύντηξης των ενδοσωμάτων περιγράφεται αναλυτικά στην εικόνα 3.34. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.35, όταν επωάζουμε “donor” και “acceptor” ενδοσώματα απουσία κυτταροπλάσματος και ATP (δηλαδή ενέργειας), δεν παρατηρούμε να συμβαίνει σημαντική σύντηξη μεταξύ ενδοσωμάτων (Εικόνα 3.35, γκρι μπάρες). Από την άλλη, η προσθήκη ATP και κυτταροπλάσματος (3 mg/ml) από κύτταρα HeLa στο μίγμα της αντίδρασης ενίσχυσε την σύντηξη όπως φαίνεται στην εικόνα 3.35 και αντιπροσωπεύει το 100% του ποσοστού της σύντηξης. Στη συνέχεια, για να ελέγξουμε την επίδραση της ACAT2 στη σύντηξη των ενδοσωμάτων, προσθέσαμε ανασυνδυασμένη ACAT2 στην αντίδραση σύντηξης. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ACAT2 ανέστειλε τη σύντηξη μεταξύ των πρώιμων ενδοσωμάτων με τρόπο δόσο-εξαρτώμενο (Εικόνα 3.35, μπλε μπάρες). Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η πιθανή επίδραση μόνο του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο περιέχεται η ACAT2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.35, ακόμη και η υψηλότερη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος δεν παρεμποδίζει τη σύντηξη.

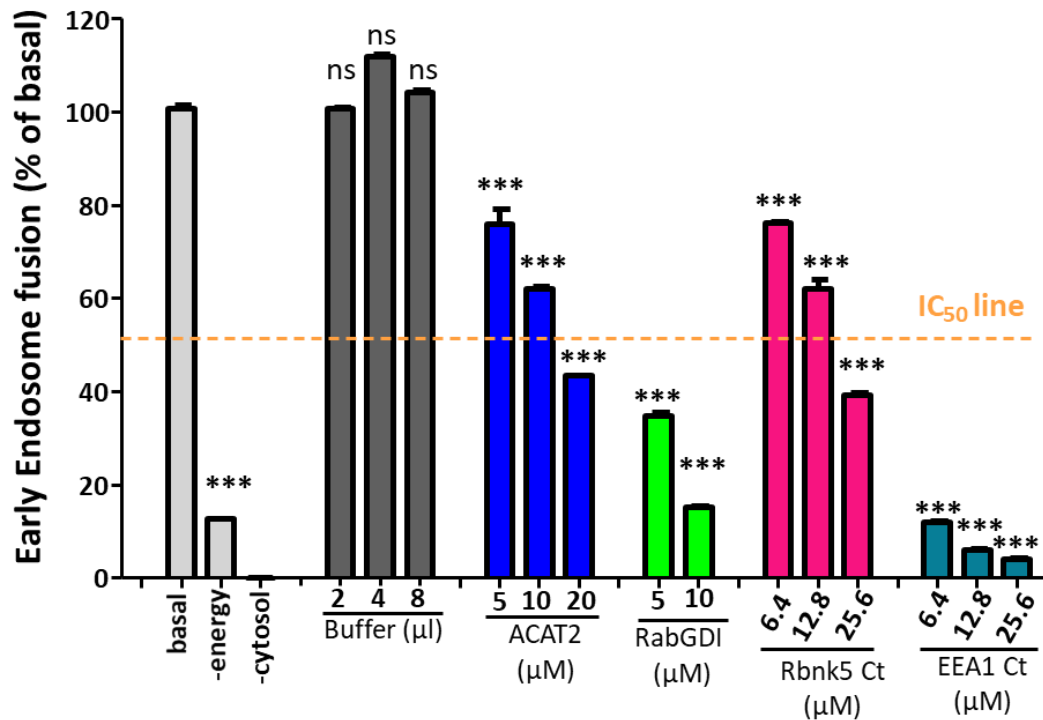
Για να εκτιμηθεί η εξειδίκευση της επίδρασης της ACAT2 στη σύντηξη ενδοσωμάτων, συγκρίναμε την ανασταλτική ισχύ της ACAT2 στη σύντηξη των ενδοσωμάτων με αυτή που προκαλείται από άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες της Rab5. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνες με καθιερωμένο ρόλο στη σύντηξη ενδοσωμάτων, οι οποίες λειτουργούν με ξεχωριστό μηχανισμό η καθεμία. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε την RabGDI (από δω και πέρα, GDI), που αναστέλλει τη σύντηξη ενδοσωμάτων αφαιρώντας την Rab5-GDP από τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, εμποδίζοντας έτσι την ανταλλαγή των νουκλεοτιδίων και την ενεργοποίηση της Rab5. Η προσθήκη της GDI ανέστειλε τη σύντηξη των ενδοσωμάτων με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο (Εικόνα 3.35, πράσινες μπάρες). Συγκριτικά με την ACAT2, η GDI φαίνεται να είναι 4 έως 5 φορές πιο ισχυρή (με βάση την κατά προσέγγιση συγκέντρωση που απαιτείται για την αναστολή της σύντηξης κατά 50%). Ο ανασταλτικός ρόλος της GDI στην *in vitro* σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι η ανασυνδυασμένη GDI δεν συνδέεται απλά με τις Rabs στην GDP μορφή, αλλά τις αφαιρεί από τις μεμβράνες των κυστιδίων¹⁴³.

Για σύγκριση με τα παραπάνω αποτελέσματα, εξετάσαμε επίσης την επίδραση διαφόρων πρωτεϊνών με περιοχές δέσμευσης του PI3P (PI3P-binding domains). Το PI3P (3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη) είναι ένα μεμβρανικό λιπίδιο το οποίο προσδένει, στην ενδοσωματική μεμβράνη, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή δέσμευσης PI3P FYVE^{98,99}. Μεταξύ των πρωτεϊνών που περιέχουν την περιοχή FYVE (FYVE domain) είναι οι EEA1, Rabankyrin-5 και Rabenosyn-5⁹⁶⁻⁹⁸. Οι περιοχές FYVE αυτών των πρωτεϊνών μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από PI3P στρατολόγηση τους στην ενδοσωματική μεμβράνη, ενώ ανεξάρτητες περιοχές διευκολύνουν αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες που οδηγούν σε σύντηξη των μεμβρανών. Επομένως, πολυπεπίδια στα οποία έχει γίνει απαλοιφή όλων των περιοχών εκτός της περιοχής FYVE (δηλαδή χωρίς τις άλλες λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης) αναμένεται να δεσμεύσουν το PI3P και να λειτουργούν ως αναστολείς της σύντηξης (επειδή δεν διαθέτουν τις λειτουργικές περιοχές που απαιτούνται για την σύντηξη μεμβράνης). Πράγματι, διαπιστώσαμε ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις των πολυπεπτιδίων της Rabankyrin-5 ή της EEA1, που περιέχουν μόνο το τμήμα FYVE (GST-Ct-Rbnk5 και GST-Ct-EEA1, αντίστοιχα), προκαλούν μία δοσο-εξαρτώμενη αναστολή στην σύντηξη των ενδοσωμάτων (Εικόνα 3.35, μωβ και τουρκουάζ μπάρες

αντίστοιχα). Είναι ενδιαφέρον ότι η εκτιμώμενη τιμή IC_{50} για GST-Ct-Rbnk5 είναι παρόμοιας κλίμακας με την IC_{50} της ACAT2, πράγμα που υποδηλώνει ότι η ποσότητα της ACAT2 που απαιτείται για αναστολή είναι συγκρίσιμη με άλλους γνωστούς ρυθμιστές της σύντηξης των ενδοσωμάτων, γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την ύπαρξη ενός ειδικού ρόλου της ACAT2 στην λειτουργία του ενδοσωματικού συστήματος. Στην περίπτωση της GST-Ct-EEA1, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη αναστολή της σύντηξης καθώς εκτός από τμήμα FYVE, περιέχει και την περιοχή δέσμευσης στην Rab5-GTP (Rab5 binding domain, RBD).



Εικόνα 3.34: Σχηματική αναπαράσταση της *in vitro* ομοτυπικής σύντηξης των πρώιμων ενδοσωμάτων. Δύο ξεχωριστοί πληθυσμοί HeLa κυττάρων επώαστηκαν με biotin-transferrin (**bTf**) ή sheep anti-transferrin αντισώματα (**a-Tf Ab**), τα οποία -μέσω ενδοκυττάρωσης- εισήχθησαν σε ενδοσώματα “δότες” (“donor” endosomes) ή “δέκτες” (“acceptor” endosomes), αντίστοιχα. Στην συνέχεια, αφού οι δύο ομάδες ενδοσωμάτων απομονώθηκαν από τα κύτταρα, αναμείχθηκαν και έγινε προσθήκη **κυτταροπλάσματος** και **ATP**, ενώ ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στους 37°C. Οι παραπάνω συνθήκες επιτρέπουν σύντηξη την μεταξύ ενδοσωμάτων, άρα και την ανάμειξη του περιεχομένου τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ της **bTf** και των **a-Tf Abs**. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερης **Tf** (μη σημασμένης με biotin) στο μίγμα της αντίδρασης, εξασφάλισε την δέσμευση αντισώματος, το οποίο μπορεί να εξέλθει από τα ενδοσώματα, αποφεύγοντας έτσι την μέτρηση συμπλόκων τα οποία σχηματίστηκαν ανεξάρτητα της σύντηξης των ενδοσωμάτων. Επομένως, μετρήθηκαν μόνο όσα σύμπλοκα **bTf** και **a-Tf Abs** δημιουργήθηκαν λόγω σύντηξης των ενδοσωμάτων. Να σημειωθεί ότι όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της σύντηξης των ενδοσωμάτων, τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό του συμπλόκου που σχηματίζεται. Έπειτα, οι ενδοσωματικές μεμβράνες λύθηκαν παρουσία διαλύματος Triton X-100 και τα σύμπλοκα δεσμεύτηκαν σε με επιφάνειες τρυβλίων 96-φρεατίων με επικάλυψη στρεπταβιδίνης (streptavidin). Η ποσότητα του συμπλόκου που σχηματίστηκε (η οποία είναι ευθέως ανάλογη του ποσοστού της σύντηξης των ενδοσωμάτων), εκτιμήθηκε μετά από επώαση των επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη τρυβλίων με δευτερογενή αντισώματα έναντι προβάτου, τα οποία είναι συνδεδεμένα με Ρουδένιο (rabbit anti-sheep secondary antibodies coupled to MSD sulfo-TAG). Τέλος, μετά από τρεις πλύσεις, η ηλεκτροχημειοφωτάγεια μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Sector Imager 6,000 (MSD)⁴⁶.

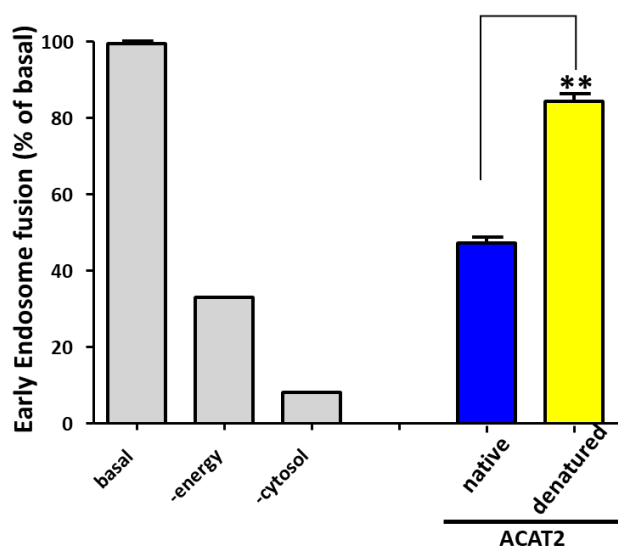


Εικόνα 3.35: Η ACAT2 αναστέλλει την σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων *in vitro*. Τα ενδοσώματα σημάνθηκαν και απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.34 και στην Ενότητα 2.4.6. Οι αντιδράσεις σύντηξης πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ανάμιξη σεσημασμένων ενδοσωμάτων με κυτταρόπλασμα και με αυξανόμενες ποσότητες των υποδεικνυόμενων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Rab5. Εφόσον ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι αρκετά ευαίσθητος, και ακόμη και το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να παρεμβαίνει στην σύντηξη των ενδοσωμάτων, εξετάσαμε επίσης την επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η ACAT2 (ονομάζεται "buffer"). Στο τέλος της επώασης, τα ενδοσώματα λύθηκαν και η ποσοτικοποίηση της σύντηξη έγινε με βάση τη μέτρηση της χημειοφωταύγειας (βλέπε περιγραφή στην εικόνα 3.35). Η πρώτη μπάρα (basal) υποδεικνύει την αντίδραση σύντηξης που λαμβάνει χώρα σε δείγματα ελέγχου που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ενδοσώματα, κυτταρόπλασμα και ATP), ενώ η δεύτερη μπάρα (-energy) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη ενέργειας (ATP) και η τρίτη (-cytosol) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη κυτταροπλάσματος. Όλες οι άλλες μπάρες αντιπροσωπεύουν δείγματα που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (όπως στο basal) μαζί με τις υποδεικνυόμενες πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2 \pm SEM$, $***P<0.0001$, ANOVA). (αδημοσίευτα αποτελέσματα, Σ. Χριστοφορίδης, EMBL/Heidelberg)

Ωστόσο, θέλαμε να επιβεβαιώσουμε ότι η επίδραση της ανασυνδυασμένης ACAT2 εξαρτάται από τη διαμόρφωσή της και δεν οφείλεται σε μια μη εξειδικευμένη επίδραση των συστατικών του διαλύματος (π.χ. επίδραση αλάτων). Για τον λόγο αυτό, εξετάσαμε την επίδραση της ανασυνδυασμένης ACAT2 μετά τον βρασμό της για 5 λεπτά.

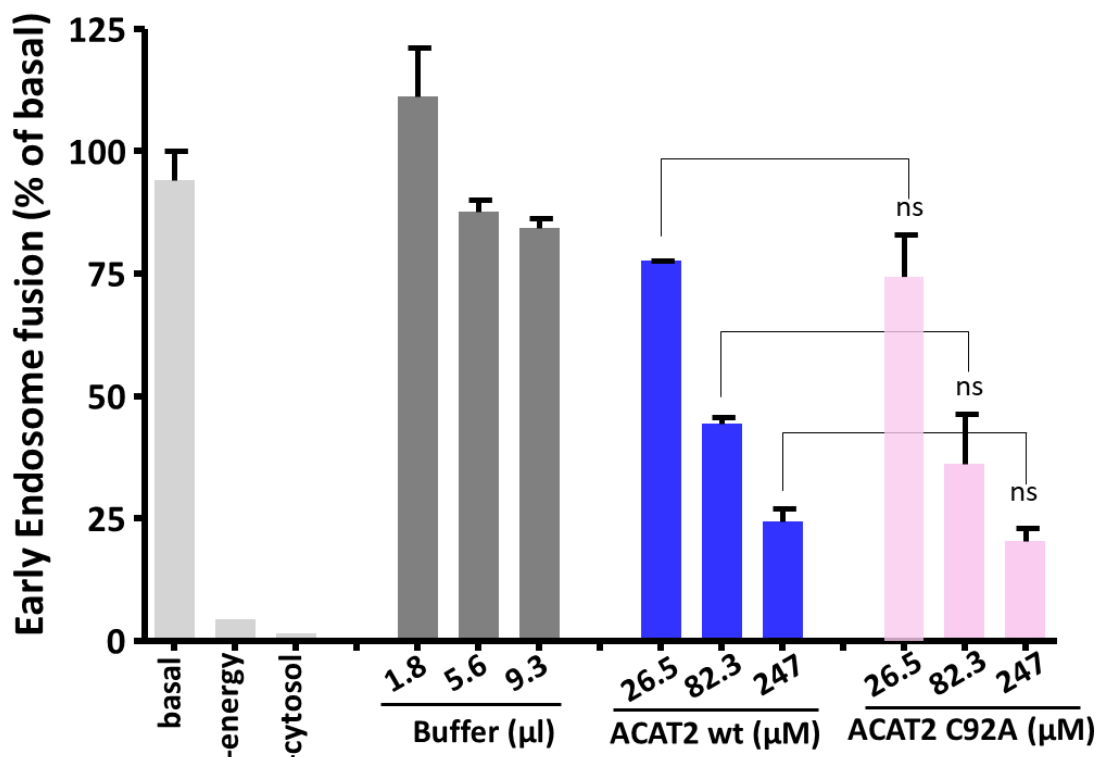
Αυτή η δοκιμή αποκάλυψε ότι η ανασταλτική δράση της ACAT2 στη σύντηξη των ενδοσωμάτων εξαρτάται από την ομαλή διαμόρφωση της ανασυνδυασμένης ACAT2 (Εικόνα 3.36).

Δεδομένου ότι η ACAT2 είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αλληλομετατροπή ακετυλο-CoA σε ακετοακετυλ-CoA και επιπλέον δρα ως ακετυλοτρανσφεράση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων¹¹², θελήσαμε να ελέγξουμε αν η ενζυμική της δράση παίζει ρόλο στην σύντηξη ενδοσωμάτων. Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση της ανενεργής ανασυνδυασμένης ACAT2 (ACAT2 C92A) στην σύντηξη των ενδοσωμάτων, η οποία ωστόσο διατηρεί την φυσιολογική στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου^{102,107,121,144}. Η προσθήκη της ACAT2 C92A ανέστειλε την σύντηξη των ενδοσωμάτων παρόμοια με την ενεργή ACAT2 με τρόπο δόσο-εξαρτώμενο όπως φαίνεται στην εικόνα 3.37, αναιρώντας την υπόθεση ότι η ενζυμική ενεργότητα παίζει ρόλο στην *in vitro* σύντηξη των ενδοσωμάτων. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ACAT2 αναστέλλει μεν την σύντηξη των ενδοσωμάτων, όχι όμως λόγω της ενζυμικής της δράσης, αλλά πιθανότατα διότι δεσμεύει την Rab5 (Rab5-GDP) παρεμποδίζοντας την ενεργοποίησή της και εν συνεχεία την αλληλεπίδρασή της με παράγοντες που προάγουν την μεμβρανική σύντηξη.



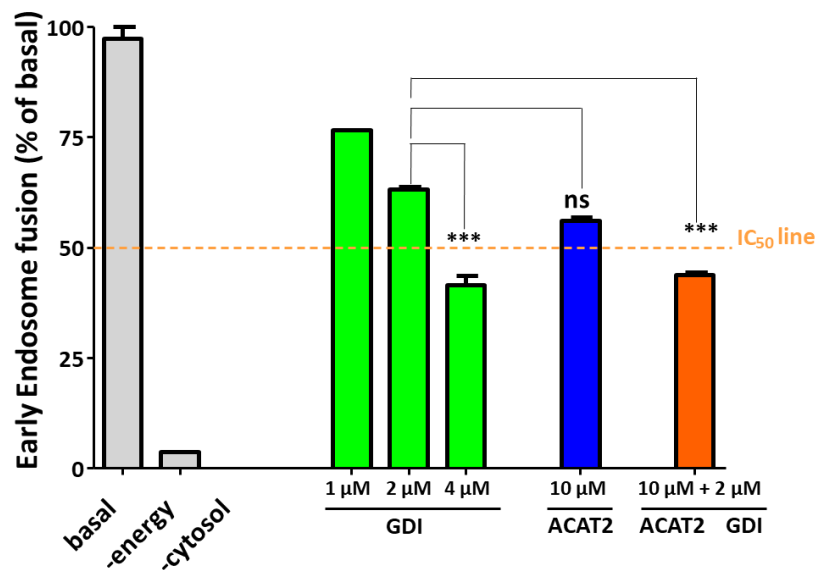
Εικόνα 3.36: Η ανασταλτική δράση της ανασυνδυασμένης ACAT2, στην σύντηξη των ενδοσωμάτων, εξαρτάται από την φυσιολογική διαμόρφωσή της. Τα ενδοσώματα σημάνθηκαν και απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.34 και στην Ενότητα 2.4.6. Οι αντιδράσεις σύντηξης πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ανάμιξη σεσημασμένων ενδοσωμάτων με κυτταρόπλασμα και καθαρισμένη ACAT2 (σε τελική συγκέντρωση 20μM), η οποία είτε διατηρεί της φυσιολογική της διαμόρφωση (native), είτε μετουσιώθηκε (denatured) έπειτα από βρασμό της στους

100 °C για 10 λεπτά. Η πρώτη μπάρα (basal) υποδεικνύει την αντίδραση σύντηξης που λαμβάνει χώρα σε δείγματα ελέγχου που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ενδοσώματα, κυτταρόπλασμα και ATP), ενώ η δεύτερη μπάρα (-energy) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη ενέργειας (ATP) και η τρίτη (-cytosol) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη κυτταροπλάσματος. Όλες οι άλλες μπάρες αντιπροσωπεύουν δείγματα που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (όπως στο basal) μαζί με τις υποδεικνυόμενες πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2 \pm SEM$, $**P<0.01$, ANOVA). (αδημοσίευτα αποτελέσματα, Σ. Χριστοφορίδης, EMBL/Heidelberg)



Εικόνα 3.37: Η ενζυμική ενεργότητα της ACAT2 δεν εμπλέκεται στην ανασταλτική της δράση στην σύντηξη των ενδοσωμάτων. Τα ενδοσώματα σημάνθηκαν και απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.34 και στην Ενότητα 2.4.6. Οι αντιδράσεις σύντηξης πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, με ανάμιξη σεσημασμένων ενδοσωμάτων με κυτταρόπλασμα και με αυξανόμενες ποσότητες ACAT2 (σε τελική συγκέντρωση η οποία αναφέρεται στο διάγραμμα), είτε στην φυσικού τύπου μορφή, είτε στην ανενεργή μορφή (C92A). Η πρώτη μπάρα (basal) υποδεικνύει την αντίδραση σύντηξης που λαμβάνει χώρα σε δείγματα ελέγχου που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ενδοσώματα, κυτταρόπλασμα και ATP). Εφόσον ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι αρκετά ευαίσθητος, και ακόμη και το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να παρεμβαίνει στην σύντηξη των ενδοσωμάτων, εξετάσαμε επίσης την επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η ACAT2 (ονομάζεται "buffer"). Όλες οι άλλες μπάρες αντιπροσωπεύουν δείγματα που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (όπως στο basal) μαζί με τις υποδεικνυόμενες πρωτεΐνες. Οι μπλε μπάρες αντιπροσωπεύουν την σύντηξη των ενδοσωμάτων παρουσία της ACAT2 φυσικού τύπου, ενώ οι ροζ μπάρες αντιπροσωπεύουν την σύντηξη των ενδοσωμάτων παρουσία της μεταλλαγμένης ACAT2C92A. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2 \pm SEM$, ANOVA).

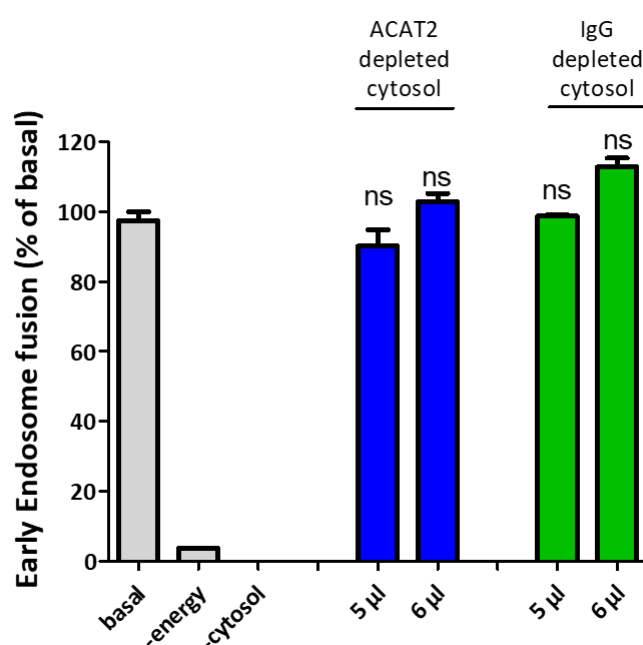
Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, μια από τις βασικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την GDP μορφή της Rab5 στο κυτταρόπλασμα είναι η GDI^{60,81,145,146}. Όπως διαπιστώσαμε και παραπάνω, η GDI αναστέλλει τη σύντηξη ενδοσωμάτων αφαιρώντας την Rab5-GDP από τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, εμποδίζοντας έτσι την ανταλλαγή των νουκλεοτιδίων και την ενεργοποίηση της Rab5 (εικόνα 3.35). Δεδομένου ότι η ACAT2 αλληλεπιδρά επίσης με την Rab5-GDP, προσεγγίσαμε την σύγκριση των αλληλεπιδράσεων της Rab5 με την GDI και την ACAT2, αντίστοιχα, με τη δοκιμασία σύντηξης ενδοσωμάτων. Με την παραπάνω διαδικασία υπολογίσαμε την κατά προσέγγιση συγκέντρωση των ACAT2 και GDI που απαιτούνται για την αναστολή της σύντηξης κατά 50% (IC₅₀). Αυτή η παράμετρος (IC₅₀) βρέθηκε να είναι περίπου 15 μM και 3 μM για τις ACAT2 και GDI, αντίστοιχα (βλέπε οριζόντια γραμμή με πορτοκαλί χρώμα, εικόνα 3.38), υποδηλώνοντας ότι η πρόσδεση της GDI στην Rab5 είναι 5 φορές πιο ισχυρή από την αντίστοιχη σύνδεση της ACAT2 με την Rab5. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στην αντίδραση σύντηξης των ενδοσωμάτων ACAT2 και GDI ταυτόχρονα, σε συγκεντρώσεις 10 και 2 μM, αντίστοιχα, οι οποίες είναι ελαφρώς μικρότερες από τις κατά προσέγγιση τιμές των IC₅₀ τους, και σε μοριακή αναλογία 5:1. Αν οι δύο πρωτεΐνες αναστέλλουν με ανεξάρτητο μηχανισμό την Rab5, η προσθήκη των δύο πρωτεϊνών στην αντίδραση σύντηξης θα είχε προσθετική ανασταλτική δράση στην σύντηξη των ενδοσωμάτων. Πράγματι, όταν προστέθηκαν ACAT2 (10 μM) και GDI (2 μM) ταυτόχρονα (Εικόνα 3.38, πορτοκαλί μπάρα), παρατηρήσαμε προσθετική ανασταλτική δράση στην σύντηξη των ενδοσωμάτων, δηλαδή το ανασταλτικό αποτέλεσμα των δύο συστατικών μαζί ήταν παρόμοιο με την επίπτωση που θα είχε η διπλάσια ποσότητα GDI (4 μM), αν η GDI προστίθενται μόνη της (βλέπε την οριζόντια γραμμή με πορτοκαλί χρώμα στην εικόνα 3.38). Το προσθετικό αποτέλεσμα αυτών των δύο πρωτεϊνών υποδηλώνει ότι τα επιμέρους μόρια των ACAT2 και GDI δρουν με ανεξάρτητο μηχανισμό έναντι της Rab5 ή με άλλα λόγια δεσμεύουν ανεξάρτητα μόρια της Rab5.



Εικόνα 3.38: Ο συνδυασμός ACAT2 και GDI έχει προσθετική ανασταλτική δράση στην σύντηξη των ενδοσωμάτων. Τα ενδοσώματα σημάνθηκαν και απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.34 και στην Ενότητα 2.4.6. Οι αντιδράσεις σύντηξης πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ανάμιξη σεσημασμένων ενδοσωμάτων με κυτταρόπλασμα και με αυξανόμενες ποσότητες των υποδεικνυόμενων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Rab5. Η πρώτη μπάρα (basal) υποδεικνύει την αντίδραση σύντηξης που λαμβάνει χώρα σε δείγματα ελέγχου που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ενδοσώματα, κυτταρόπλασμα και ATP), ενώ η δεύτερη μπάρα (-energy) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη ενέργειας (ATP) και η τρίτη (-cytosol) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη κυτταροπλάσματος. Όλες οι άλλες μπάρες αντιπροσωπεύουν δείγματα που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (όπως στο basal) μαζί με τις υποδεικνυόμενες πρωτεΐνες. Οι μπάρες με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν την σύντηξη ενδοσωμάτων παρουσία της GDI, ενώ η μπάρα μπλε χρώματος αντιπροσωπεύει την σύντηξη ενδοσωμάτων παρουσία της ACAT2. Η μπάρα με πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύει την σύντηξη ενδοσωμάτων παρουσία του συνδυασμού των δύο παραπάνω πρωτεϊνών. ($n=2 \pm SEM$, $***P<0.0001$, ANOVA). (αδημοσίευστα αποτελέσματα, Σ.Χριστοφορίδης, EMBL/Heidelberg)

Τέλος, για να ελεγχθεί εάν, στο ελεύθερο κυττάρων *in vitro* σύστημα, η ενδογενής κυτταροπλασματική ACAT2 εμπλέκεται στον μηχανισμό σύντηξης ενδοσωμάτων, χρησιμοποιήσαμε κυτταρόπλασμα HeLa στο οποίο έχει γίνει αφαίρεση της ACAT2, με χρήση αντι-ACAT2 ειδικών αντισωμάτων (ανοσοαφαίρεση, immunodepletion), και ελέγξαμε την σύντηξη των ενδοσωμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.39 δεν υπήρχε διαφορά, μεταξύ του πλήρους κυτταροπλάσματος και αυτού που του έχει αφαιρεθεί η ACAT2, στην ικανότητά τους να υποστηρίξουν την σύντηξη των ενδοσωμάτων. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ενδογενής ACAT2 δεν είναι απαραίτητη για την

ενδοσωματική σύντηξη σε *in vitro* συνθήκες απουσία κυττάρων. Ωστόσο, είναι πιθανό τα ενδογενή επίπεδα της ACAT2 να ρυθμίζουν τη σύντηξη ενδοσωμάτων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες παρουσία όλων των συστατικών του κυττάρου. Σε αυτή την περίπτωση, η επίδραση που προκαλεί η επιπλέον προσθήκη της ACAT2, στην *in vitro* αντίδραση σύντηξης ενδοσωμάτων (βλέπε εικόνα 3.35), οφείλεται μάλλον στην άμεση δέσμευση της Rab5 από την ACAT2, εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίησή της Rab5 στα πρώιμα ενδοσώματα, όπου θα αλληλεπιδρούσε με τους τελεστές για την προώθηση της σύντηξης των ενδοσωμάτων.



Εικόνα 3.39: Η αφαίρεση της ACAT2 (με ανοσο-αφαίρεση, *immunodepletion*) από το κυτταρόπλασμα δεν επηρεάζει την σύντηξη των ενδοσωμάτων. Τα ενδοσώματα σημάνθηκαν και απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.34 και στην Ενότητα 2.4.6. Οι αντιδράσεις σύντηξης πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, με ανάμιξη σεσημασμένων ενδοσωμάτων με κυτταρόπλασμα και ATP. Η πρώτη μπάρα (*basal*) υποδεικνύει την αντίδραση σύντηξης που λαμβάνει χώρα σε δείγματα ελέγχου που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (ενδοσώματα, κυτταρόπλασμα και ATP), ενώ η δεύτερη μπάρα (*-energy*) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη ενέργειας (ATP) και η τρίτη (*-cytosol*) αφορά το δείγμα χωρίς προσθήκη κυτταροπλάσματος. Όλες οι άλλες μπάρες αντιπροσωπεύουν δείγματα που περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά (όπως στο *basal*) μαζί με τις υποδεικνυόμενες πρωτεΐνες. Οι μπλε μπάρες αντιπροσωπεύουν την σύντηξη των ενδοσωμάτων παρουσία κυτταροπλάσματος από το οποίο έχει αφαιρεθεί η ACAT2 (δέσμευση της ACAT2 με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης). Οι πράσινες αντιπροσωπεύουν μπάρες την σύντηξη των ενδοσωμάτων παρουσία κυτταροπλάσματος στο οποίο έχει προστεθεί IgG αντίσωμα. ($n=2 \pm SEM$, ANOVA). (αδημοσίευτα αποτελέσματα, Σ. Χριστοφορίδης, EMBL/Heidelberg)

3.4.5 Διερεύνηση του ρόλου της ACAT2 στην Rab5-διαμεσολαβούμενη στρατολόγηση της EEA1 στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων.

Ο ρόλος της Rab5 είναι κεντρικός στην σύντηξη των ενδοσωμάτων. Στρατολογεί και ενεργοποιεί την δράση της PI3-κινάσης, η οποία εμπλουτίζει την μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων με το λιπίδιο PI3P. Στη συνέχεια, ο συνδυασμός Rab5/PI3P στρατολογεί την EEA1, προκειμένου να πραγματοποιηθεί το στάδιο ελλιμενισμού του κυστιδίου στην μεμβράνη στόχο, το οποίο προηγείται της μεμβρανικής σύντηξης. *In vitro* μελέτες έχουν αποδείξει πως η EEA1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της σύντηξης των ενδοσωμάτων, καθώς η απώλειά της από τα ενδοσώματα δρα ανασταλτικά^{52,54,55,98}.

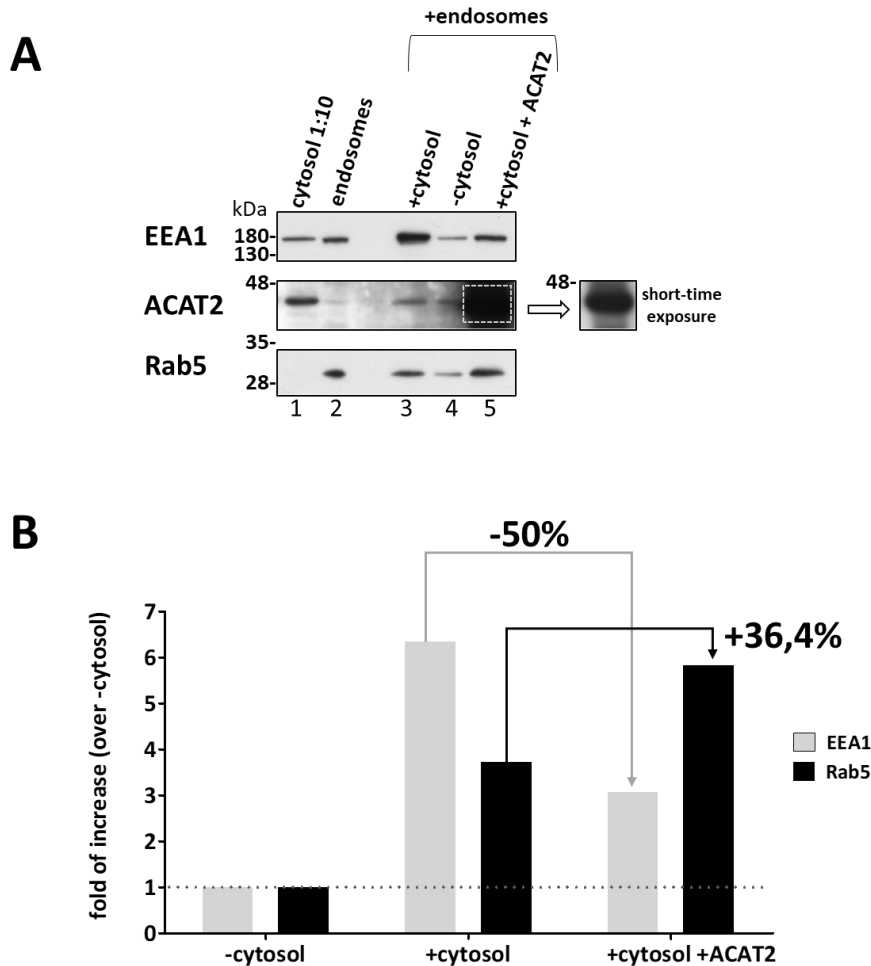
Όπως είδαμε πιο πάνω, η προσθήκη της ACAT2 στην δοκιμασία σύντηξης των πρώιμων ενδοσωμάτων προκαλεί αναστολή της απόδοσης της σύντηξης. Προκειμένου να διερευνήσουμε αν ο μηχανισμός με τον οποίο η ACAT2 παρεμποδίζει την σύντηξη περιλαμβάνει όντως την αναστολή της Rab5, εξετάσαμε αν η ACAT2 αναστέλλει την Rab5-εξαρτώμενη στρατολόγηση της EEA1 στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Για τον σκοπό αυτό, πρώιμα ενδοσώματα επώαστηκαν απουσία ή παρουσία κυτταροπλάσματος (5,6 μg/μl), καθώς και ανασυνδυασμένης ACAT2 (180 μM), για 30 λεπτά στους 37°C (εικόνα 3.40). Η ποσότητα της ανασυνδυασμένης ACAT2 που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για να επιτύχουμε την μέγιστη αναστολή σε δοκιμασίες σύντηξης των ενδοσωμάτων, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 3.37. Στην περίπτωση του δείγματος που δεν χρησιμοποιήθηκε κυτταρόπλασμα, προστέθηκε διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (BSA) ίδιας πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με το κυτταρόπλασμα. Για τον διαχωρισμό των ενδοσωμάτων κάθε δείγματος από το υπερκείμενο διάλυμα πραγματοποιήθηκε καθίζηση με φυγοκέντρηση (100.000g) και πλύση με ισότονο διάλυμα (PBS). Τέλος, όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών EEA1, Rab5 και ACAT2 (εικόνα 3.40A).

Αρχικά, στην περίπτωση που δεν έγινε προσθήκη κυτταροπλάσματος (-cytosol), ανιχνεύθηκε η ποσότητα των EEA1 και Rab5 που βρίσκονται στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων, πριν την στρατολόγηση της EEA1 από το κυτταρόπλασμα (δείγμα 4). Ωστόσο παρατηρούμε ότι η ποσότητα της EEA1 (δείγμα 4), όσο και της Rab5 είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή του δείγματος 2 (αποτελεί δείγμα ελέγχου που περιέχει

ενδοσώματα που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία). Παρουσία κυτταροπλάσματος (δείγμα 3, +cytosol) παρατηρείται ως και 6 φορές αύξηση του ποσοστού της EEA1 στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων συγκριτικά με τα ενδοσώματα στα οποία δεν προστέθηκε κυτταρόπλασμα (δείγμα 4), γεγονός που υποδηλώνει την στρατολόγησή της από το κυτταρόπλασμα (εικόνα 3.40B, γκρι μπάρες). Στην περίπτωση που έγινε προσθήκη της ανασυνδυασμένης ACAT2 στο μίγμα ενδοσωμάτων-κυτταροπλάσματος (δείγμα 5) παρατηρήθηκε μείωση της ποσότητας της EEA1 (50% λιγότερη) σε σχέση με το δείγμα 3 (εικόνα 3.40B, γκρι μπάρες), υποδηλώνοντας ότι η *in vitro* στρατολόγηση της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα παρεμποδίζεται από την ACAT2. Σε αντίθεση με την EEA1, το ποσοστό της Rab5 αυξάνεται στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων παρουσία ACAT2 (36,4% περισσότερη σε σχέση με το δείγμα 3). Το τελευταίο είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι η ACAT2 δεσμεύει μόρια Rab5-GDP τα οποία βρίσκονται στα ενδοσώματα, παρεμποδίζοντας έτσι την εξαγωγή τους από την μεμβράνη μέσω της GDI. Αν υποθέσουμε ότι η ACAT2 είχε την δυνατότητα να συνδέεται στην κυτταροπλασματική Rab5-GDP, τότε παρουσία ACAT2, θα έπρεπε να παρατηρείται μείωση και όχι αύξηση του ποσοστού της Rab5 στα ενδοσώματα. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η ACAT2 συνδέεται στην Rab5, αφού προηγουμένως γίνει η μεταφορά της από το κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων, και όχι στην Rab5 του κυτταροπλάσματος. Πράγματι, παρατηρούμε ότι η ACAT2 ανιχνεύεται στα ενδοσώματα (εικόνα 3.40A), και μάλιστα η ποσότητά της αυξάνεται μετά από επώαση με κυτταρόπλασμα. Δυστυχώς δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί η πιθανή στρατολόγηση της ανασυνδυασμένης ACAT2, στην μεμβράνη, καθώς στο δείγμα 5 υπάρχει πολύ έντονο σήμα της ACAT2 λόγω καθίζησης της πρωτεΐνης κατά την φυγοκέντρηση.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η *in vitro* σύνδεση της ACAT2 με την Rab5-GDP λαμβάνει χώρα αφού αποδεσμευτεί η δεύτερη από την GDI και μεταφερθεί στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων. Επιπρόσθετα, η σύνδεση της ACAT2 με την μεμβρανική Rab5-GDP αφενός μεν παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της δεύτερης, αφετέρου δε επάγει την συσσώρευσή της στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων, καθώς εμποδίζει την εξαρτώμενη από GDI απομάκρυνσή της. Στην περίπτωση αυτή η ισορροπία ανακύκλησης της Rab5 μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση της δέσμευσης στην μεμβράνη. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες σύντηξης των ενδοσωμάτων και της στρατολόγησης της EEA1, συμπεραίνουμε ότι η ACAT2

«κλειδώνει» την Rab5 στην ανενεργή μορφή, γεγονός που αναστέλλει την στρατολόγηση της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα, στάδιο απαραίτητο για να πραγματοποιηθεί η σύντηξή τους.



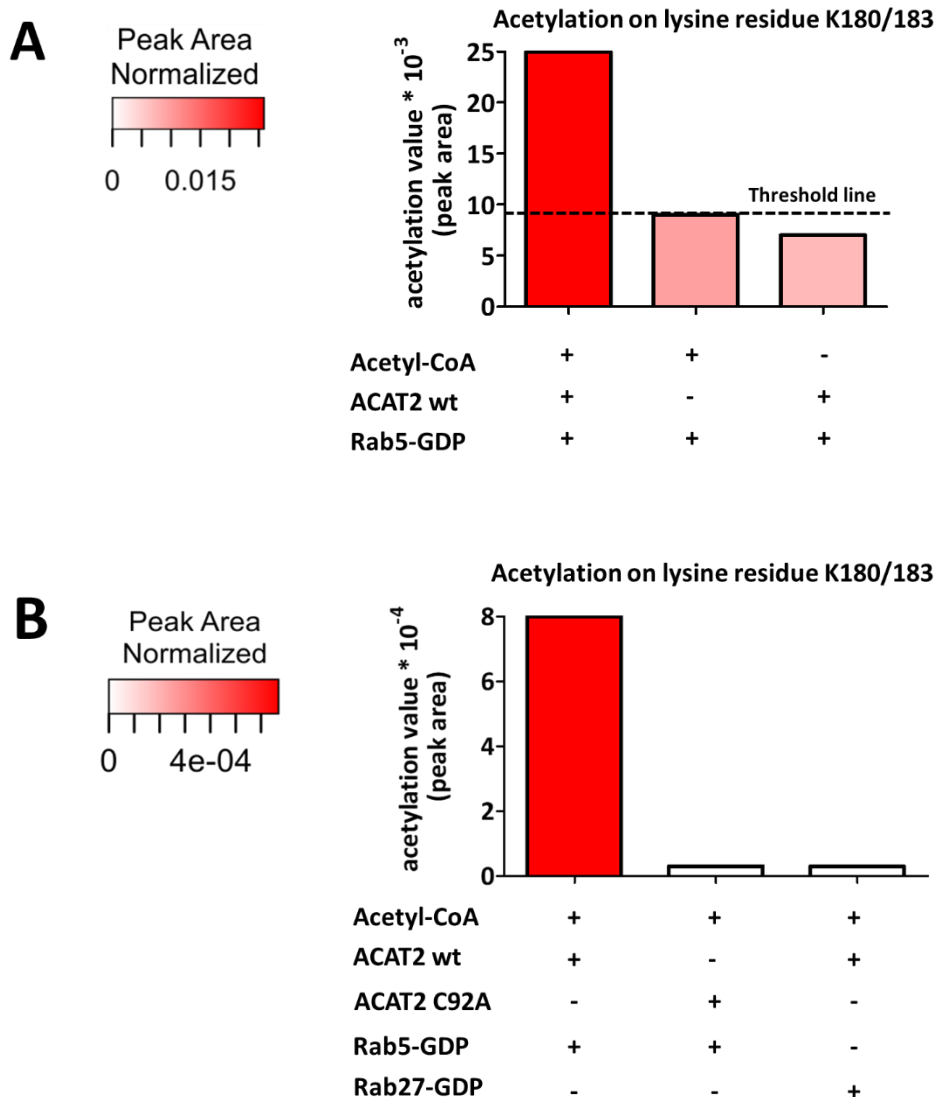
Εικόνα 3.41: Η ACAT2 συνδέεται στην Rab5-GDP στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων και παρεμποδίζει την στρατολόγηση της EEA1. Η απομόνωση του κυτταροπλάσματος και των ενδοσωμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στις *in vitro* δοκιμασίες σύντηξης. (A) Πρώιμα ενδοσώματα επώαστηκαν με ή χωρίς κυτταρόπλασμα, παρουσία της ανασυνδυασμένης ACAT2, για 30 λεπτά στους 37°C, και στη συνέχεια φηγοκεντρήθηκαν (100.000g) σε σωλήνες στον πυθμένα των οποίων είχαν τοποθετηθεί 100 μl διαλύματος σουκρόζης 20%. Ακολούθησε πλύση των σωλήνων με διάλυμα PBS, επαναφηγοκέντρωση και επώαση με διάλυμα SDS-PAGE για 30 λεπτά στους 37°C και βρασμός στους 100°C. Η ανάλυση όλων των δειγμάτων έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενώ χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών EEA1, Rab5 & ACAT2. Τα δείγματα της εικόνας A περιέχουν τα εξής: 1. Cytosol 1:10 (44μg), 2. endosomes (0,15 μg/μl), 3. +cytosol (endosomes 0,15 μg/μl, cytosol 5,6 μg/μl & ATP), 4. -cytosol (endosomes 0,15 μg/μl, BSA 5,6 μg/μl & ATP), 5. +cytosol + ACAT2 (180μM). (B) Παρουσιάζεται η πυκνομετρική ανάλυση των EEA1 και Rab5.

3.5 Η Rab5 ακετυλιώνεται από την ACAT2 *in vitro*

Η ακετυλίωση είναι μια από τις κύριες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών οργανισμών και είναι σημαντική για τη ρύθμιση της λειτουργίας τους, για παράδειγμα επάγει την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης ή μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση της με άλλα μόρια στο κύτταρο. Η ACAT2, εκτός του ότι καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ακετυλο-CoA σε ακετοακετυλο-CoA, στο μονοπάτι παραγωγής του μεβαλονικού^{147,148}, έχει επίσης δράση ακετυλοτρανσφεράσης. Συγκεκριμένα ακετυλιώνει ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ένζυμο 6PGD στο μονοπάτι οξειδωσης των φωσφορικών πεντοζών¹¹². Με βάση τα παραπάνω υποθέσαμε ότι η Rab5 μπορεί να αποτελεί υπόστρωμα της ACAT2.

Αρχικά, επώασαμε την Rab5-GDP με την ACAT2 σε μοριακή αναλογία 1:10 παρουσία Ac-CoA. Επιπλέον, ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα εξής, Rab5-GDP παρουσία μόνο του Ac-CoA, και Rab5-GDP με ACAT2 απουσία του Ac-CoA. Έπειτα, όλα τα σύμπλοκα αναμείχθηκαν με ακετυλο-CoA και επώαστηκαν για ακόμα 2 ώρες στους 30°C. Επίσης, κατά τον ίδιο τρόπο επώασαμε την Rab5-GDP με την ACAT2 C92A. Το δείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας για την ACAT2 φυσικού τύπου. Ως αρνητικό μάρτυρα για την Rab5-GDP χρησιμοποιήσαμε την Rab27-GDP, η οποία επώαστηκε με την ACAT2, όπως παραπάνω, σε μοριακή αναλογία 1:10. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. Οι πρωτεϊνικές ζώνες της Rab5 και της Rab27 απομονώθηκαν από την πηκτή ακρυλαμίδης, αναλυθήκαν με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (nLC-MS/MS) και η ταυτοποίηση των ακετυλιωμένων αμινοξικών καταλοίπων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με εργαλεία βιοπληροφορικής (η ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία μάζας πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του κ. Αϊβαλιώτη, Μ., ΙΤΕ/IMBB, Ηράκλειο). Τα δεδομένα από τρεις διαφορετικές δοκιμασίες ανίχνευσης ακετυλιωμένων καταλοίπων με φασματομετρία μάζας οδήγησαν στην ταυτοποίηση της **ακετυλίωσης της Rab5 στα κατάλοιπα λυσίνης 180/183**, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.41A. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.41B, η ακετυλίωση εξαρτάται από την ενεργότητα του ενζύμου, καθώς η ανενεργή ACAT2 (C92A), δεν φαίνεται να ακετυλιώνει την Rab5. Η εξειδίκευση της δράσης της ACAT2 για την μικρή GTPάση Rab5 επαληθεύεται από το γεγονός ότι η αντίστοιχη λυσίνη, καθώς και καμία άλλη, στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της Rab27 δεν βρέθηκε θετική στον έλεγχο για ακετυλίωση από την ACAT2.

Τα προκαταρκτικά αυτά πειράματα προτείνουν πως η ακετυλίωση συμβαίνει στην περιοχή της Rab5 που βρίσκεται πλησίον του καρβοξυτελικού άκρου της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της Rab5, ακριβώς πριν την υπερμεταβλητή περιοχή της (hypervariable c-terminal domain, HVD). Η HVD - η οποία έχει μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στις RabGTPασες - εξυπηρετεί την ικανότητα της μηχανής πρενυλίωσης να προσθέτει πρενυλο-ομάδες στις καρβοξυτελικές τους αλληλουχίες, ώστε να διευκολύνεται η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μεμβράνη στόχο¹³⁷. Επιπλέον, για την Rab5 η HVD χρησιμεύει ως γέφυρα σύνδεσης με τα ενδοσώματα¹³⁷, και αλληλεπιδρά με την Rab-GDI, δημιουργώντας μια περιοχή στην οποία τοποθετούνται οι υδρόφοβες πρενυλοομάδες⁸¹. Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι πιθανό η ακετυλίωση να παίζει ρόλο στην σύνδεση της Rab5 με άλλες πρωτεΐνες ή/και με τα ενδοσώματα. Η πιθανότητα αυτή αξίζει να διερευνηθεί σε μελλοντικά πειράματα.



Εικόνα 3.41: Ταυτοποίηση της ακετυλίωσης της Rab5-GDP στις λυσίνες 180/183 από την ACAT2, με φασματομετρία μάζας. Οι υποδεικνυόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παρήχθησαν σε βακτήρια και ακολούθησε καθαρισμός. Στις εικόνες A και B παρουσιάζεται η απόδοση της ακετυλίωσης των δειγμάτων σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που φαίνεται πάνω αριστερά σε κάθε σχήμα (peak normalized area). Στα γραφήματα που βρίσκονται δεξιά παρουσιάζεται η ποσοτική ανάλυση της ακετυλίωσης σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα της αντίστοιχης εικόνας. (A) Έλεγχος της ακετυλίωσης της Rab5-GDP από την ACAT2, με φασματομετρία μάζας, μόνο για τα δείγματα που αφορούν την Rab5-GDP και την ACAT2 φυσικού τύπου. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα; Rab5 & Ac-CoA απουσία ACAT2, και Rab5 & ACAT2 απουσία Ac-CoA. (B) Έλεγχος της ακετυλίωσης της Rab5-GDP από την ACAT2. Ως αρνητικός μάρτυρας για την Rab5 χρησιμοποιήθηκε η Rab27-GDP, ενώ για την ACAT2 φυσικού τύπου, η ανενεργή ACAT2 C92A.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή μορφή της Rab5, *in vitro* και *in vivo*

Οι RabGTPασες ενεργοποιούν και καθορίζουν την ακρίβεια της κυστιδιακής διακίνησης, καθορίζοντας παράλληλα τη δομική και λειτουργική ταυτότητα των οργανιδίων. Η Rab5, η οποία θεωρείται ο **βασικός ρυθμιστής του ενδοσωματικού συστήματος**, λειτουργεί ως **χρονοδιακόπτης της ομοτυπικής και ετεροτυπικής σύντηξης των ενδοκυτταρικών κυστιδίων και των πρώιμων ενδοσωμάτων**, καθορίζει τον **ρυθμό κυστιδιακής διακίνησης**, και τον προορισμό, είτε προς το μονοπάτι της αποικοδόμησης είτε προς το μονοπάτι της ανακύκλωσης^{74,77-79}. Σε κάθε μία από τις παραπάνω λειτουργίες της Rab5 συμμετέχει ένας μεγάλος αριθμός γνωστών πρωτεϊνών-τελεστών, οι οποίες είτε αλληλεπιδρούν άμεσα με το μόριο της Rab5 είτε στρατολογούνται στο ενδόσωμα μέσω της ενεργοποίησής της.

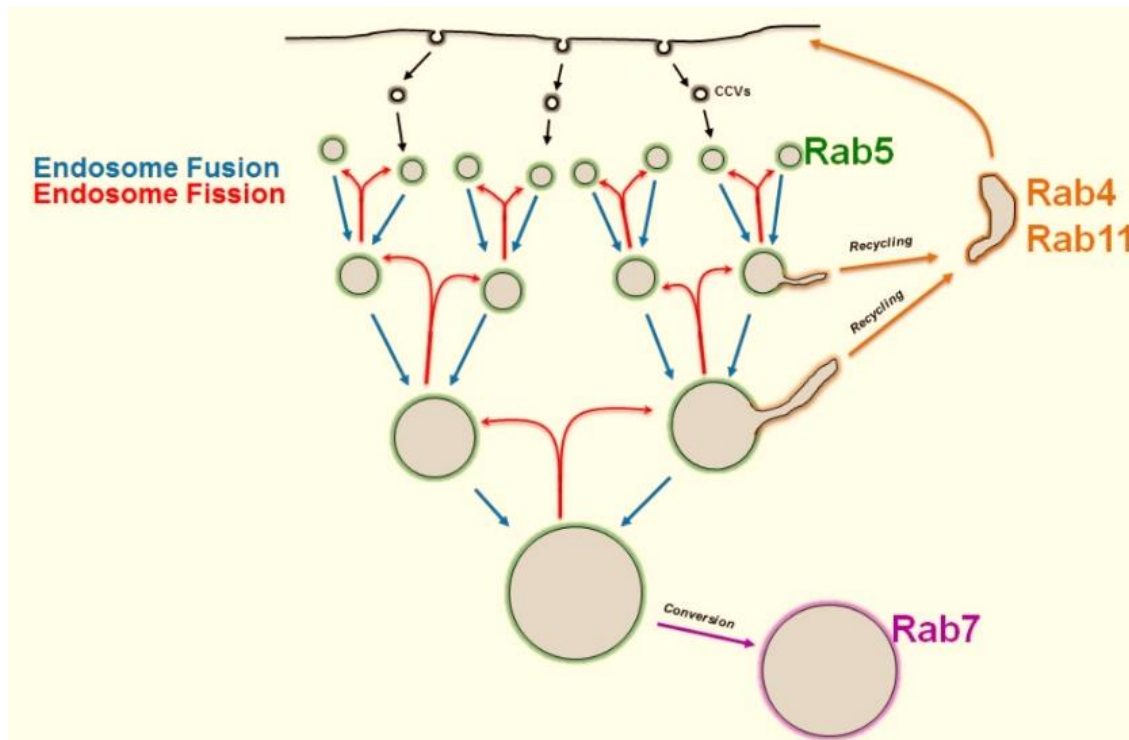
Ανάμεσα στα μόρια που αλληλεπιδρούν με την Rab5, βρέθηκε για πρώτη φορά μια απρόσμενη αλληλεπίδραση μεταξύ της Rab5GDP και της ACAT2 (αδημοσίευτα αποτελέσματα, Σ. Χριστοφορίδης, EMBL/Heidelberg). Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν να επιβεβαιώσουμε την εξειδίκευση αυτής της αλληλεπίδρασης. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε τόσο με πειράματα *in vitro* όσο και στο φυσικό περιβάλλον ανέπαφων κυττάρων. Πράγματι, η σύνδεση μεταξύ Rab5 και ACAT2, σε ανέπαφα κύτταρα, επιβεβαιώθηκε με την στόχευση της Rab5 στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, μέσω του προσδέματος ActA, και την επακόλουθη μετατόπιση της ενδογενούς ACAT2 στις Rab5-θετικές μιτοχονδριακές δομές. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την **σύνδεση μεταξύ Rab5 και ACAT2**. Ωστόσο, δημιουργείται ένα κύριο ερώτημα που αφορά στην λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης.

Ο ρόλος της ACAT2 στο σύστημα των ενδοσωμάτων

Ως κεντρικό μόριο ενός πολύπλοκου δικτύου πρωτεϊνών που ελέγχει την προσάραξη, τη σύντηξη και την διακίνηση των κυστιδίων, η μικρή GTPase Rab5 έχει χαρακτηριστεί ως **κύριος ρυθμιστής της βιογένεσης των πρώιμων ενδοσωμάτων**⁷⁰. Μελέτες που εστιάζουν στον ρόλο της Rab5 στην βιογένεση των ενδοσωμάτων έδειξαν ότι, όταν τα πρωτεϊνικά της επίπεδα μειώνονται, το ενδοσωματικό δίκτυο προσαρμόζεται

αναλόγως ώστε να διατηρήσει σταθερή την αναλογία μορίων Rab5 ανά ενδοσώμα. Ως εκ τούτου, η **απουσία Rab5 καταστέλλει την βιογένεση των πρώιμων ενδοσωμάτων** με αποτέλεσμα αριθμός τους να μειώνεται⁴³. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε ότι η μείωση των επιπέδων της ACAT2 σε κύτταρα HUVE και HepG2 προκαλεί ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή αύξηση του αριθμού των πρώιμων ενδοσωμάτων (κυστίδια θετικά για την EEA1) καθώς και διπλασιασμό της συνολική έντασης του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα. Η παρατήρηση αυτή είναι συμβατή με το γεγονός ότι η ACAT2 συνδέεται με την GDP-μορφή της Rab5 και άρα εμποδίζει τη μετάβασή της στην GTP-μορφή. Κατά συνέπεια, η αποσιώπηση της ACAT2 αναμένεται να αυξάνει τα διαθέσιμα μόρια της Rab5. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι ο διπλασιασμός της συνολικής έντασης του σήματος της EEA1 στα ενδοσώματα σχετίζεται περισσότερο με την αύξηση του αριθμού των ενδοσωμάτων και όχι με την αύξηση της έκφρασης της EEA1, καθώς τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα της EEA1 παραμένουν κατά κύριο λόγο σταθερά. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η ήδη υπάρχουσα κυτταροπλασματική EEA1 στρατολογείται σε όλο και περισσότερα πρώιμα ενδοσώματα. Ωστόσο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι μπορεί να συμβαίνει και αύξηση της EEA1 ανά ενδοσώμα.

Κατά την ενδοκυττάρωση, η προώθηση του φορτίου προς αποικοδόμηση συνεπάγεται την συγκέντρωσή του σε σταδιακά λιγότερα και μεγαλύτερα ενδοσώματα τα οποία μετακινούνται από την περιφέρεια προς το κέντρο του κυττάρου, ενώ παράλληλα η Rab5 αντικαθίσταται από την ειδική για το όψιμα ενδοσώματα Rab7⁶³ (βλέπε εικόνα 4.1). Καθώς το ενδοσωματικό σύστημα τροφοδοτεί τα λυσοσώματα, θα περίμενε κανείς ότι οι αλλαγές στον αριθμό των πρώιμων ενδοσωμάτων προκαλούν αντίστοιχα αλλαγές στον αριθμό των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων. Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η **μείωση του αριθμού των ενδοσωμάτων** σε κύτταρα που απουσιάζει η Rab5 προκαλεί δευτερογενώς **μείωση του αριθμού των όψιμων ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων**⁴³. Στην παρούσα εργασία παρατηρήσαμε ότι η απώλεια της ACAT2 σε κύτταρα HUVE και HepG2 προκάλεσε αντίστοιχα την **αύξηση των όψιμων ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων** (χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα την πρωτεΐνη LAMP1). Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι, πρώτον, ο αριθμός των πρώιμων ενδοσωμάτων επηρεάζει τον αριθμό των όψιμων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων (που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτε⁴³), και δεύτερον ότι η ACAT2 έχει **ρυθμιστικό ρόλο στην Rab5-διαμεσολαβούμενη βιογένεση του ενδολυσοσωματικού συστήματος** (εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Η οργάνωση του δίκτυου των πρώιμων ενδοσωμάτων μοιάζει με “χοάνη”. Στην περιφέρεια του κυττάρου κατανέμονται πολλά μικρά Rab5-θετικά πρώιμα ενδοσώματα τα οποία σταδιακά συντήκονται ομοτυπικά και μετακινούνται προς το κέντρο του κυττάρου. Στο κέντρο του κυττάρου, υπάρχουν λίγα μεγαλύτερα σε μέγεθος πρώιμα ενδοσώματα τα οποία μετατρέπονται σε Rab7-θετικά όψιμα ενδοσώματα. Οι Rab4- και Rab11-θετικές σωληνοειδείς δομές μεταφέρουν το φορτίο προς ανακύκλωση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ το φορτίο προς αποικοδόμηση σταδιακά συσσωρεύεται σε μεγάλα ενδοσώματα. Το σχήμα κατανομής, με βάση το μέγεθος, του ενδοσωματικού δικτύου εξαρτάται από 2 βασικές διαδικασίες: α) την ομοτυπική σύντηξη, η οποία μειώνει τον αριθμό των ενδοσωμάτων, και β) την ομοτυπική σχάση, η οποία αυξάνει τον αριθμό τους. (<http://zerial.mpi-cbg.de/page/project-energydocytosis>)

Πώς θα μπορούσε όμως η ACAT2 να σχετίζεται με τον αριθμό των κυστιδίων του ενδοσωματικού δικτύου; Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο αριθμός των ενδοσωμάτων επηρεάζεται από τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Rab5 στο κύτταρο. Επιπλέον, **το μέγεθος των ενδοσωμάτων επηρεάζεται από την νουκελοτιδική κατάσταση της Rab5 και τον ρυθμό ανακύκλωσης της στην μεμβράνη στόχο**⁴³. Τα πρώιμα ενδοσώματα που αυξάνονται σε μέγεθος λόγω των επαναλαμβανόμενων γεγονότων ομοτυπικής σύντηξης, συσσωρεύουν το φορτίο που προορίζεται για αποικοδόμηση. Ταυτόχρονα, για την ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων σε όψιμα ενδοσώματα και τελικά την δημιουργία λυσοσωμάτων, πρέπει πρώτα να αυξηθεί η συγκέντρωση των μορίων Rab5 στο ενδοσώμα μέχρι ένα κρίσιμο επίπεδο και στη συνέχεια να ενεργοποιηθεί η Rab7, για να γίνει μετατροπή της ταυτότητας

του ενδοσώματος κατά μήκος της αποικοδομητικής οδού^{63,149,150} (εικόνα 4.1). Όπως προαναφέρθηκε, η ACAT2 επηρεάζει το αριθμό των ενδοσωμάτων και όχι το μέγεθος τους. Συνεπώς, όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι **η ACAT2 επηρεάζει τα επίπεδα της Rab5 που εν δυνάμει ενεργοποιούνται στις μεμβράνες-στόχους** και αντιστοίχως προάγουν την βιογένεση του ενδολυσosomalικού συστήματος.

Η ενεργοποίηση της Rab5 στις μεμβράνες-στόχους δεν αφορά μόνο τα πρώιμα ενδοσώματα, αλλά και την κυτταροπλασματική μεμβράνη καθώς και τα κυστιδία που δημιουργούνται από αυτήν. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η αύξηση της Rab5 στα κύτταρα μειώνει τον χρόνο ζωής των εγκολπώσεων που φέρουν κάλυμμα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συγχρόνως αυξάνει τον ρυθμό ενδοκυττάρωσης⁷¹, ενώ η μείωση των επιπέδων της Rab5 αυξάνει τον αριθμό των εγκολπώσεων που φέρουν κάλυμμα κλαθρίνης, και τον αριθμό των κυστιδίων κλαθρίνης, και προκαλεί αναστολή της ενδοκυττάρωσης⁴³. Επιπλέον, η Rab5, μαζί με την GDI, δρα μετά την συναρμολόγηση του καλύμματος κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική συγκρότηση των συμπλόκων αυξητικών παραγόντων-υποδοχέων στις δομές αυτές, καθώς η αφαίρεσή της Rab5 από τις καλυμμένες εσοχές της μεμβράνης παρεμποδίζει την παραπάνω διαδικασία⁶⁰. Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι η αποσιώπηση της ACAT2 στα κύτταρα προκαλεί αφενός μεν αύξηση του ρυθμού ενδοκυττάρωσης και αφετέρου δε αύξηση του αριθμού των ενδοσωμάτων. Δεδομένου ότι η ACAT2 αλληλεπιδρά με την ανενεργή μορφή της Rab5, όπως και η GDI, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση της Rab5 με την ACAT2 να καθυστερεί την ενεργοποίηση της Rab5, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η δημιουργία νέων κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, είτε η μεμβρανική σύντηξη στα πρώιμα στάδια της ενδοκυττάρωσης.

Ο ρόλος της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

Η ενδοκυττάρωση και η διαδοχική αποικοδόμηση, εντός των λυσοσωμάτων, των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων συνιστά έναν θεμελιώδη μηχανισμό στην χωρο-χρονική ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης. Μελέτες για τον κεντρικό ρόλο της Rab5 στην μεμβρανική διακίνηση και σύντηξη στα πρώιμα στάδια της ενδοκυττάρωσης, έχουν δείξει ότι είναι ο κύριος **ρυθμιστής της ταχύτητας** αυτής της οδού^{42,70,77}. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ο ρόλος της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση δύο υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, των **EGFR** και **VEGFR2**, η ενδοκυτταρική κυκλοφορία των

οποίων έχει μελετηθεί εκτενώς. Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι η αποσιώπηση της ACAT2 **αυξάνει τον ρυθμό εσωτερίκευσης και ως εκ τούτου της αποικοδόμησης** των δύο υποδοχέων μετά από επαγωγή με τους αντίστοιχους αυξητικούς παράγοντες (EGF και VEGF). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο μεν EGFR ενδοκυττάρωνεται μέσω του μονοπατιού εξαρτώμενου από κλαθρίνη, ενώ ο VEGFR2 κυρίως μέσω της μακροπινοκυττάρωσης, εκτιμούμε ότι η ACAT2 έχει έναν **γενικό ρυθμιστικό ρόλο στην Rab5-μεσολαβούμενη ενδοκυττάρωση** επηρεάζοντας πολλαπλές οδούς εσωτερίκευσης του φορτίου.

Το ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω ευρήματα είναι ποιος είναι ο μηχανισμός με τον οποίο η ACAT2 εμπλέκεται στην ενδοκυττάρωση; Μελέτες έχουν δείξει σύνδεση του ρυθμού ενδοκυττάρωσης με την Rab5-μεσολαβούμενη σύντηξη των ενδοκυτταρικών κυστιδίων. Η Rab5 βρίσκεται τόσο στα πρώιμα ενδοσώματα όσο και στα προερχόμενα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη ενδοκυτταρικά κυστίδια (πχ κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη), και ελέγχει την προσάραξη των κυστιδίων αυτών στα ενδοσώματα^{43,47,71,78,80,151}. Επιπλέον, η υπερέκφραση είτε της φυσικού τύπου Rab5 είτε της Rab5Q79L (συνεχώς ενεργή), επάγει την σύντηξη των προερχόμενων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη κυστιδίων με τα πρώιμα ενδοσώματα με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός της ενδοκυττάρωσης⁷¹. Λαμβάνοντας υπόψιν το σύνολο των δεδομένων μας για ανασταλτική δράση της ACAT2 στην ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων σε συνδυασμό με τα ευρήματα για το ρόλο της στην ενδοκυττάρωση των υποδοχέων, υποθέτουμε ότι όταν η ACAT2 απουσιάζει από το κύτταρο, μεγαλύτερος αριθμός μορίων Rab5 εν δυνάμει ενεργοποιείται. Τότε, αυξάνεται η κυστιδιακή σύντηξη με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η εσωτερίκευση και διαδοχικά η αποικοδόμηση των υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Βέβαια, η ισορροπία της σύνδεσης της ACAT2 με την ανενεργή Rab5, εξαρτάται και από την RabGDI. Γνωρίζουμε ότι στο κυτταρόπλασμα η Rab5 βρίσκεται κυρίως σε σύμπλοκο με την RabGDI, η οποία συμβάλλει στην αποτελεσματική πρόσδεση της Rab5 στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων⁸³. Συνοψίζοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω προτείνουμε ότι, όσα μόρια Rab5 βρίσκονται σε σύμπλοκο με την ACAT2, βρίσκονται μεν στα πρώιμα ενδοκυτταρικά κυστίδια (είτε πρώιμα ενδοσώματα είτε κυστίδια προερχόμενα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη), παραμένουν όμως στην ανενεργή μορφή, γεγονός που συνεπάγεται αλλαγές αρχικά στο **ποσοστό κυστιδιακής σύντηξης** και εν συνεχεία **στον ρυθμό εσωτερίκευσης του φορτίου**. Μπορούμε να πούμε λοιπόν ότι, η ACAT2 συμμετέχει στην χρονική ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης και της κυστιδιακής διακίνησης.

Ο ρόλος της ACAT2 στην ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων και στη στρατολόγηση της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα

Σε *in vitro* πειράματα ομοτυπικής σύντηξης των ενδοσωμάτων διαπιστώσαμε ότι, η προσθήκη της ACAT2 παρεμποδίζει την ομοτυπική σύντηξη των ενδοσωμάτων κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, η ενζυματική ενεργότητα δεν επηρεάζει την ανασταλτική της δράση. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω ευρήματα, φαίνεται πως η ενζυματική ενεργότητα της ACAT2 δεν σχετίζεται με την ανασταλτική της δράση, καθώς το ανενεργό ένζυμο μπορεί να αναστείλει την ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων σε *in vitro* συνθήκες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μόρια Rab5 που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα πρέπει πρώτα να στρατολογηθούν στις ενδοσωματικές μεμβράνες και έπειτα να γίνει η ενεργοποίησή τους, δηλαδή ανταλλαγή του GDP από το GTP νουκλεοτίδιο. Η διαδικασία αυτή προηγείται της ενδοσωματικής σύντηξης, επομένως αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ολοκλήρωσή της. Επιπλέον, φαίνεται ότι σε *in vitro* συνθήκες η ACAT2 δεσμεύει την Rab5-GDP **η οποία βρίσκεται στα ενδοσώματα**, με αποτέλεσμα η δεύτερη να παραμένει στην ανενεργή της μορφή αναστέλλοντας έτσι την κυστιδιακή σύντηξη, **καθώς παρεμποδίζεται η στρατολόγηση της EEA1 από το κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων**. Προηγούμενες μελέτες συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα καθώς έχουν δείξει ότι παρουσία της Rab5S34N (η οποία βρίσκεται στην μονίμως ανενεργή μορφή) η σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων παρεμποδίζεται, ενώ παρουσία της Rab5Q79L (η οποία βρίσκεται στην μονίμως ενεργή μορφή) η σύντηξη των ενδοσωμάτων ενισχύεται περισσότερο και από την φυσικού τύπου Rab5^{79,151}.

Στηριζόμενοι στα ευρήματα της παρούσας μελέτης, δηλαδή ότι, η ACAT2 παίζει ρόλο στην ενδοκυττάρωση, η σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών ACAT2 και Rab5 εμπλέκεται άμεσα στην *in vitro* σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων, η ACAT2 διατηρεί την Rab5 στην GDP μορφή και καταστέλλει την στρατολόγηση της EEA1, υποθέτουμε ότι η ACAT2 είναι ρυθμο-καθοριστής της Rab5-ελεγχόμενης μεμβρανικής διακίνησης. Παρόλο που η Rab5 αποτελεί μια από τις πιο καλά μελετημένες Rab5GTPασες, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι σήμερα το πώς συντονίζει την λειτουργία του πολύπλοκου δικτύου των πρώιμων ενδοσωμάτων αλλά και την αλληλεπίδρασή της με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών. Είναι πιθανό ότι η ACAT2 δεσμεύοντας τα ανενεργά μόρια Rab5, συμβάλει στην συγκέντρωσή τους στην μεμβράνη των ενδοκυτταρικών κυστιδίων μέχρι ένα κρίσιμο ποσοστό, το οποίο θα μπορούσε αφενός μεν να επιτρέπει την διατήρηση της

ταυτότητας του κυστιδίου (για παράδειγμα, παρεμποδίζοντας την αντικατάσταση της Rab5 από την Rab7 και την ωρίμανση του πρώιμου ενδοσώματος σε όψιμο), αφετέρου δε να επιτρέπει, υπό ειδικές κυτταρικές συνθήκες, μια μαζική ενεργοποίηση των μορίων της Rab5, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αποτελεσματική στρατολόγηση των κυτταροπλασματικών παραγόντων που συντονίζουν την δημιουργία των κυστιδίων και τη διακίνησή τους προς το σωστό μεμβρανικό διαμέρισμα.

Ο ρόλος της ACAT2 ως ακετυλοτρανσφεράση της Rab5

Γνωρίζοντας ότι, η ACAT2, εκτός από ένζυμο του μονοπατιού παραγωγής μεβαλονικού^{147,148}, έχει χαρακτηριστεί και ως μια κυτταροπλασματική ακετυλοτρανσφεράση¹¹², ελέγξαμε αν είναι σε θέση να ακετυλιώσει την Rab5. Πράγματι, πειράματα φασματοφωτομετρίας μάζας έδειξαν ότι η Rab-GDP ακετυλιώνεται από την ACAT2, στα κατάλοιπα λυσίνης 180/183, τα οποία βρίσκονται πλησίον του καρβοξυτελικού της άκρου, ακριβώς πριν την υπερμεταβλητή περιοχή της ή HVD (**h**yper**v**ariable **c**-terminal **d**omain). Η HVD, η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο όλων των Rabs, εμπεριέχει το μοτίβο πρενυλίωσης, και μπορεί να δράσει δομικά ως μια “εύκαμπτη γέφυρα” ανάμεσα στην μεμβράνη-στόχο και στην αντίστοιχη Rab. Επιπλέον, ενώ για ορισμένες Rabs η HVD παίζει ρόλο στην στόχευσή τους στον σωστό προορισμό, για την Rab5 αποτελεί τον σύνδεσμο ανάμεσα σε G πρωτεϊνική περιοχή και την μεμβράνη-στόχο¹³⁷. Ακόμη, η HVD, η οποία αποτελεί την επιφάνεια σύνδεσης των Rabs με την GDI, ποικίλει σε μήκος ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των Rabs. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των αμινοξέων που παρεμβάλλεται ανάμεσα στο μοτίβο πρενυλίωσης της HVD και στην G-πρωτεϊνική περιοχή των Rabs σχετίζεται με την συγγένεια πρόσδεσής τους στην GDI^{81,152}. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο γεγονός ότι τα κατάλοιπα λυσίνης 180/183 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της Rab5, λόγω της θέσης τους, σχετίζονται με την λειτουργία της. Επομένως, η προσθήκη ακετυλομάδων σε αυτές τις λυσίνες, εξουδετερώνοντας το θετικό τους φορτίο, μπορεί να επηρεάζει την συγγένεια σύνδεσης της Rab5 με την GDI. Μια τέτοια αλλαγή θα μπορούσε να σχετίζεται με την ταχύτητα διαχωρισμού του συμπλόκου Rab5-GDI, βήμα που προηγείται της ενεργοποίησης της Rab5 από τον GEF της στην μεμβράνη-στόχο. Μέχρι σήμερα ελάχιστα είναι γνωστά για τον μηχανισμό αποδέσμευσης της GDI από τις Rab-GDP πρωτεΐνες⁶⁷, που ακολουθείται από την

ενεργοποίησή τους από τον αντίστοιχο παράγοντα GEF. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η διαδικασία αυτή διαμεσολαβείται είτε από παράγοντες αποδέσμευσης της GDI ή GDFs (GDI displacement factors)^{62,153}, είτε οι ίδιοι οι GEFs έχουν δράση GDF^{132,154,155}. Όμως, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις σε πρενυλιωμένες Rabs αυξάνουν την ικανότητα αποδέσμευσής τους από την GDI, και ακολούθως ελέγχουν την στρατολόγηση των Rabs στην μεμβράνη-στόχο πριν την ενεργοποίησή τους¹⁵⁶. Επιπλέον, καθώς η συγγένεια σύνδεσης της GDI με τις πρενυλιωμένες Rabs είναι γενικευμένη, δεν είναι απίθανη η ύπαρξη ενζύμων που να τροποποιούν ξεχωριστά κάθε Rab, εξυπηρετώντας την αποτελεσματική διάσταση του συμπλόκου Rab-GDI, ώστε στη συνέχεια να επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση από τον αντίστοιχο GEF. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η ACAT2 έχει ειδικό ρόλο ακετυλοτρανσφεράσης της Rab5 εξυπηρετώντας την αποδέσμευσή της από την GDI. Δεν μπορούμε βέβαια να αποκλείσουμε την πιθανότητα η ακετυλίωση να σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα σύνδεσης της Rab5 στην μεμβράνη π.χ. των ενδοσωμάτων, καθώς τα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια PI3P μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις θετικά φορτισμένες λυσίνες που βρίσκονται πλησίον της HVD. Αν και μέχρι τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την ακετυλίωση της Rab5 σε κυτταρικό περιβάλλον, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι άλλες μικρές GTPασες, όπως οι Ras, Rho, Cdc42 και Ran, καθώς και ορισμένοι τελεστές τους ακετυλιώνονται σε διάφορα κατάλοιπα λυσίνης, και συσχετίζουν αυτές τις τροποποιήσεις με τις διάφορες λειτουργίες τους¹⁵⁷⁻¹⁶¹. Είναι λοιπόν σημαντικό, στο μέλλον, να γίνει ταυτοποίηση της ακετυλίωσης της ενδογενούς Rab5, σε κύτταρα, και στη συνέχεια να μελετηθεί η επίδραση αυτής της μεταμεταφραστικής τροποποίησης στις διάφορες λειτουργίες της.

Ο πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης των Rab5 και ACAT2 στην διασύνδεση του μεταβολισμού και της ενδοκυττάρωσης

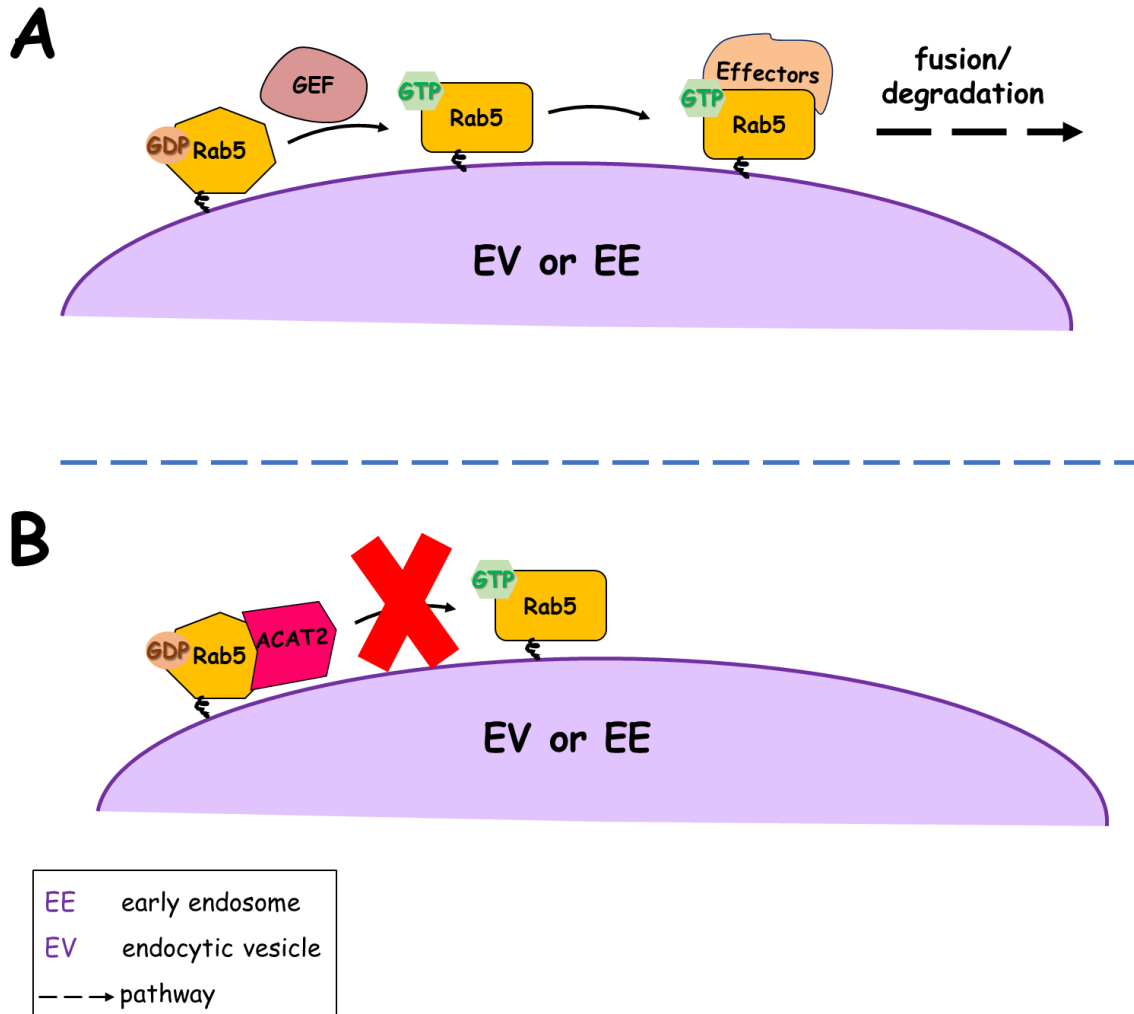
Η ενδοκυττάρωση είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά υποδοχέων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τα ενδοσώματα, από τα οποία οι υποδοχείς ενεργοποιούν εξειδικευμένα σηματοδοτικά μόρια. Έτσι, η ενδοκυττάρωση, μεταφέροντας σηματοδοτικά μόρια και υποδοχείς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τα ενδοσώματα, ελέγχει το είδος, τη διάρκεια και την ένταση της μεταγωγής του σήματος²³. Η

μεταγωγή του σήματος των υποδοχέων παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού¹⁶². Για παράδειγμα, οι υποδοχείς της ινσουλίνης, της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης ελέγχουν τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπών. Σε ό,τι αφορά την Rab5, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η Rab5, ως ρυθμιστής της ενδοκυττάρωσης, και της μεταγωγής του σήματος^{20,84,85}, παίζει σημαντικό ρόλο στην διακίνηση μεταγραφικών παραγόντων γονιδίων της γλυκονεογένεσης - όπως αυτού της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (glucose-6-phosphatase, G6Pase) - από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η έλλειψη της Rab5 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του ενζύμου G6Pase, προκαλώντας σημαντικές μεταβολικές διαταραχές (όπως υπογλυκαιμία, υπερχοληστερολαιμία, υπερλιπιδαιμία και ηπατομεγαλία)⁸⁷.

Η ACAT2 είναι ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του ακέτυλο-CoA σε ακετοακέτυλο-CoA, δηλαδή την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, που οδηγεί στη σύνθεση χοληστερόλης. Επιπλέον, η ACAT2 είναι ακετυλο-τρανφεράση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων¹¹². Έτσι, η ACAT2 όχι μόνο ελέγχει τα επίπεδα του ακέτυλο-CoA, το οποίο αποτελεί κεντρικό ρυθμιστικό μόριο του μεταβολισμού, αλλά επιπλέον χρησιμοποιεί το μεταβολικό αυτό μόριο για να ακετυλιώσει πρωτεϊνικά υποστρώματα, συνδέοντας τον μεταβολισμό με μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών¹⁶³. Συνοψίζοντας τα παραπάνω, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση της ACAT2 με την Rab5 να επηρεάζει άμεσα την ποσότητα του διαθέσιμου, ελεύθερου ενζύμου ACAT2 για την συμμετοχή του στα γεγονότα του μεταβολισμού και, πιο συγκεκριμένα, στην κατάλυση της αντίδρασης μετατροπής του ακέτυλο-CoA σε ακετοακέτυλο-CoA. Αναμένεται, σε μελλοντικά πειράματα, να αποσαφηνιστεί αν η ενζυμική δραστηριότητα της ACAT2 μετά την αλληλεπίδραση με την Rab5-GDP μειώνεται ή παραμένει σταθερή σε φυσιολογικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη το ενεργειακό προφίλ του κυττάρου, είναι γνωστό ότι η υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση GTP αντικατοπτρίζει μία κατάσταση υψηλής ενέργειας, ενώ τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου είναι χαμηλά όταν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση GDP. Επομένως, η διερεύνηση του ρόλου της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ACAT2 και Rab5 -η οποία εξαρτάται ειδικά από το GDP νουκλεοτίδιο- στην αμφίδρομη σχέση μεταξύ της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου και της ενδοκυττάρωσης των αυξητικών υποδοχέων, θα διαλευκάνει τον μηχανισμό με τον οποίο αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να σχετίζεται με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου.

Τέλος, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα η αλληλεπίδραση της ACAT2 με την Rab5-GDP να μην σχετίζεται με τον ρόλο της ACAT2 στον μεταβολισμό. Στην περίπτωση αυτή, η ACAT2, πέρα από τον ρόλο της στον μεταβολισμό, φαίνεται να κατέχει και ένα ακόμη λειτουργικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να την κατατάξουμε στις λεγόμενες «moonlighting proteins», ένας όρος που αποδίδεται σε πρωτεΐνες που επιτελούν περισσότερες από μία λειτουργίες μέσα στο κύτταρο¹⁶⁴. Ο αριθμός των «moonlighting» πρωτεϊνών συνεχώς αυξάνεται καθώς ανακαλύπτονται καινούργιες λειτουργίες των πρωτεϊνών, εντελώς διαφορετικές από εκείνες με τις οποίες είναι καταχωρημένες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα «moonlighting» πρωτεϊνών αποτελούν ορισμένα κυτταροπλασματικά ένζυμα και συνοδοί πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν και ως υποδοχείς στην μεμβράνη ή ως μεταγραφικοί παράγοντες στον πυρήνα¹⁶⁵.

Συνοπτικά, όλα τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση της ACAT2 με την ανενεργή μορφή της Rab5 (Rab5-GDP) αναστέλλει την ενεργοποίηση της δεύτερης όταν βρίσκεται στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων. Συνεπώς, καθυστερεί ή ακόμα παρεμποδίζεται η κυστιδιακή διακίνηση και διαδοχικά η προώθηση του ενδοκυτταρωμένου φορτίου (σύμπλοκο υποδοχέα-αυξητικού παράγοντα) προς το λυσοσωματικό μονοπάτι για αποικοδόμηση (βλέπε προτεινόμενο μοντέλο, εικόνα 4.2). Είναι λοιπόν πιθανό ότι, παρεμβαίνοντας στην λειτουργία της Rab5, η ACAT2 προστατεύει τους μεμβρανικούς υποδοχείς από την αποικοδόμηση τους στα λυσοσώματα. Επιπλέον, ο ανταγωνισμός μεταξύ ACAT2 και GDI για σύνδεση στην Rab5-GDP είναι πιθανό ότι καθορίζει τον ρυθμό σύντηξης των ενδοκυτταρικών κυστιδίων (πχ πρώιμα ενδοσώματα ή/και κυστίδια με κάλυμμα κλαθρίνης) στα πρώτα στάδια του μονοπατιού της ενδοκυττάρωσης, ελέγχοντας έτσι σε πρώτη φάση την τύχη του ενδοκυτταρωμένου φορτίου (αυξητικοί παράγοντες, θρεπτικά υλικά, κτλ), και διαδοχικά το δυναμικό απόκρισης του κυττάρου στο περιβάλλον μέσα και έξω από αυτό. Τέλος, αν και είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη για να διαλευκάνουμε την διασύνδεση μεταξύ του μεταβολισμού, της μεμβρανικής διακίνησης και της μεταγωγής του σήματος, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση της ACAT2 με την Rab5 να παίζει ρόλο στην ενορχήστρωση των λειτουργιών αυτών με στόχο την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.



Εικόνα 4.2: Προτεινόμενο μοντέλο για τον ρόλο της αλληλεπίδρασης της Rab5-GDP με την ACAT2 στην μεμβρανική διακίνηση και στην αποικοδόμηση του ενδοκυτταρωμένου φορτίου. Για τη διακίνηση του ενδοκυτταρωμένου φορτίου από την κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τα λυσοσώματα (για αποικοδόμηση) απαιτείται πρώτα η διαλογή τους στα ενδοκυτταρικά κυστίδια και στα πρώιμα ενδοσώματα. Η Rab5 ρυθμίζει τη διαλογή του φορτίου, την εκβλάστηση, την μετατόπιση κατά μήκος του κυτταροσκελετού, τον ελλιμενισμό και την σύντηξη των παραπάνω κυστιδίων. (A) Αρχικά, η Rab5 στρατολογείται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια και στα πρώιμα ενδοσώματα, όπου ενεργοποιείται από τον παράγοντα GEF. Στη συνέχεια η ενεργή Rab5 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες τελεστές και προάγει γεγονότα μεμβρανικής σύντηξης. Έτσι, τα κυστίδια μαζί με το φορτίο τους μετακινούνται σταδιακά προς το μονοπάτι αποικοδόμησης στα λυσοσώματα. (B) Όταν η ACAT2 συνδεθεί με την ανενεργή Rab5 στην μεμβράνη των κυστιδίων αυτών, παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της Rab5 από τον παράγοντα GEF. Επομένως, είναι πιθανό να παρεμποδίζεται η διακίνηση του φορτίου προς τα λυσοσώματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενδοκυττάρωση είναι η διαδικασία εσωτερίκευσης τμημάτων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθώς και ποικίλων διαλυτών μορίων του εξωκυττάρου περιβάλλοντος (συμπεριλαμβανομένων και των θρεπτικών ουσιών). Εκτός όμως από τα παραπάνω, η ενδοκυττάρωση είναι υπεύθυνη και για τη μεταφορά υποδοχέων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη προς τα ενδοσώματα, από τα οποία οι υποδοχείς ενεργοποιούν εξειδικευμένα σηματοδοτικά μόρια. Έτσι, η ενδοκυττάρωση ελέγχει το είδος, τη διάρκεια και την ένταση της μεταγωγής του σήματος.

Η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων χαρακτηρίζεται από την κυστιδιακή διακίνηση από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα. Η Rab5 είναι ο κύριος ρυθμιστής των πρώιμων σταδίων της ενδοκυττάρωσης, αφού ελέγχει την ταχύτητα εισόδου των υποδοχέων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, το είδος των ενδοσωμάτων στα οποία μεταφέρονται, αλλά και την περαιτέρω τύχη τους. Λόγω της δράσης αυτής, η Rab5 είναι σημαντικός ρυθμιστής της μεταγωγής του σήματος. Για να επιτελέσει η Rab5 τις διάφορες λειτουργίες της απαιτείται η σύνδεσή της με ένα απρόσμενα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών/τελεστών.

Από προηγούμενες μελέτες, στις οποίες συμμετείχε ο επιστημονικός υπεύθυνος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία χρωματογραφίας συγγένειας με την οποία ταυτοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ενεργή μορφή της Rab5 (Rab5-GTP). Παρά τον μεγάλο αριθμό των γνωστών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την GTP- μορφή της Rab5, μόνο μία πρωτεΐνη βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την GDP-μορφή της Rab5, η κυτταροπλασματική ακετυλοCoA θειολάση (ACAT2). Η ACAT2 είναι ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του ακετυλο-CoA σε ακετοακετυλο-CoA, δηλαδή την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, που οδηγεί στη σύνθεση χοληστερόλης. Επιπλέον, η ACAT2 είναι ακετυλο-τρανφεράση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Έτσι, η ACAT2 όχι μόνο ελέγχει τα επίπεδα του ακετυλο-CoA, το οποίο αποτελεί κεντρικό ρυθμιστικό μόριο του μεταβολισμού, αλλά επιπλέον χρησιμοποιεί το μεταβολικό αυτό μόριο για να ακετυλιώσει πρωτεϊνικά υποστρώματα, συνδέοντας τον μεταβολισμό με μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Με δοκιμασίες χρωματογραφίας συγγένειας (pull-down) επιβεβαιώθηκε η εξειδίκευση της πρόσδεσης της ACAT2 στην Rab5, έναντι άλλων μελών της οικογένειας των Rabs, όπως η Rab4 και Rab27. Στη συνέχεια, μελετήσαμε την σταθερά σύνδεσης μεταξύ των Rab5-GDP και ACAT2 ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με την μέθοδο ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC),

και διαπιστώσαμε ότι πρόκειται για μια ευνοούμενη θερμοδυναμικά, ασθενή σύνδεση, με K_d της τάξεως των μM , η οποία είναι τυπική για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που σχηματίζουν δυναμικά πρωτεϊνικά δίκτυα.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αποδείξαμε ότι η σύνδεση μεταξύ Rab5 και ACAT2 μπορεί να συμβεί και σε ανέπαφα κύτταρα. Πράγματι, πραγματοποιώντας τεχνητή μετατόπιση της Rab5 άγριου τύπου στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των μιτοχονδρίων (χρησιμοποιώντας ένα σήμα μιτοχονδριακής στόχευσης, ActA), προκλήθηκε μετακίνηση της ενδογενούς ACAT2 από, την φυσιολογική της τοπολογία, δηλαδή το κυτταρόπλασμα, στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε σε δύο διαφορετικές σειρές (HUVEC και HepG2), υποδεικνύοντας την καθολική ύπαρξη και ρόλο της αλληλεπίδρασης για την λειτουργία των κυττάρων.

Προκειμένου να διαλευκάνουμε τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab5 και ACAT2, έγινε αποσιώπηση της ACAT2 σε κύτταρα HUVE και HepG2, και διερευνήσαμε τις επιπτώσεις στον αριθμό των ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η μείωση των επιπέδων της ACAT2 προκαλεί αύξηση του αριθμού των πρώιμων ενδοσωμάτων και δευτερογενώς των λυσοσωμάτων. Ακολούθως, μελετήθηκε ο ρόλος της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα αυξητικών παραγόντων VEGFR2 σε κύτταρα HUVE. Διαπιστώθηκε ότι η μείωση των επιπέδων της ACAT2 επιταχύνει την εσωτερίκευση και την αποικοδόμηση των ενεργοποιημένων VEGFR2 στην μεμβράνη των κυττάρων. Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από προηγούμενη μελέτη σε κύτταρα HeLa (μεταπτυχιακή μελέτη Αθανάσιου Ζιώγα, αδημοσίευτα αποτελέσματα), όπου η μείωση των επιπέδων της ACAT2 επιταχύνει την αποικοδόμηση του EGF υποδοχέα. Ακολούθως, για να μελετήσουμε τον ακριβή ρόλο της ACAT2 στην λειτουργία της Rab5 χρησιμοποιήσαμε μία *in vitro* δοκιμασία σύντηξης ενδοσωμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε παραγωγή και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην δοκιμασία. Τα αποτελέσματά μας αποκάλυψαν ότι η ACAT2 φυσικού τύπου αναστέλλει τη Rab5-μεσολαβούμενη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων, υποδηλώνοντας ότι ασκεί ανασταλτικό ρόλο στην Rab5. Επιπλέον, η ανασταλτική δράση της ACAT2 στην σύντηξη των ενδοσωμάτων είναι συγκρίσιμη με άλλους γνωστούς ρυθμιστές της σύντηξης των ενδοσωμάτων, γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την ύπαρξη ενός ειδικού ρόλου της ACAT2 στην λειτουργία του ενδοσωματικού συστήματος. Με την παραπάνω πειραματική διαδικασία διαπιστώσαμε επίσης ότι ο συνδυασμός ACAT2 και GDI (η οποία συνδέεται με την Rab5-GDP) έχει προσθετική ανασταλτική δράση στην σύντηξη των ενδοσωμάτων.

Επομένως, τα επιμέρους μόρια των ACAT2 και GDI δεσμεύουν ανεξάρτητα μόρια της Rab5, συμπεραίνοντας έτσι ότι η ACAT2 ανταγωνίζεται την GDI για σύνδεση με την Rab5-GDP. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η ανασταλτική δράση της ACAT2 στην σύντηξη των ενδοσωμάτων δεν οφείλεται στην ενζυμική δράση του μορίου, καθώς και το ανενεργό ένζυμο αναστέλλει σχεδόν στον ίδιο βαθμό την σύντηξη. Εμβαθύνοντας ακόμα περισσότερο στον μηχανισμό της αλληλεπίδρασης στην σύντηξη των ενδοσωμάτων, μελετήσαμε την Rab5-διαμεσολαβούμενη στρατολόγηση της EEA1 στα πρώιμα ενδοσώματα παρουσία ανασυνδυασμένης ACAT2. Από το πείραμα αυτό προέκυψε η ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι η ACAT2 συνδέεται με την Rab5-GDP στην μεμβράνη των ενδοσωμάτων παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση της δεύτερης, αναστέλλοντας έτσι τη στρατολόγηση της EEA1, η οποία παίζει κυρίαρχο ρόλο στην σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων.

Τέλος, με φασματομετρία μάζας ταυτοποιήσαμε την *in vitro* ακετυλίωση της Rab5-GDP από την ACAT2. Συγκεκριμένα βρέθηκαν ακετυλιωμένα τα κατάλοιπα λυσίνης 180/183, τα οποία βρίσκονται ακριβώς πριν την υπερμεταβλητή περιοχή (hypervariable domain, HVD) του καρβοξυτελικού άκρου της Rab5, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεσή της με την Rab-GDI και την πρενυλίωσή της.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, προτείνουμε ότι η αλληλεπίδραση της ACAT2 με την Rab5-GDP, έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή της δεύτερης στην ανενεργή μορφή, στην ενδοσωματική μεμβράνη. Ως εκ τούτου, δεν επιτρέπει την στρατολόγηση EEA1 από το κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων με αποτέλεσμα την αναστολή της κυστιδιακής σύντηξης. Ακόμα, είναι πιθανό η ακετυλίωση της Rab5 από την ACAT2 να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με άλλα μόρια, όπως για παράδειγμα η GDI, προκαλώντας αλλαγές είτε στην σταθεροποίηση της Rab5 στην μεμβράνη στόχο, είτε στον κύκλο ενεργοποίησής της, επηρεάζοντας κατά συνέπεια γεγονότα μεμβρανικής σύντηξης. Λαμβάνοντας υπόψιν τον ρόλο της ACAT2 στην ενδοκυττάρωση και την βιογένεση του ενδολυσωσσομικού συστήματος, συμπεραίνουμε ότι η ACAT2 παρεμποδίζει την κυστιδιακή διακίνηση (και του ενδοκυτταρωμένου φορτίου τους π.χ. μεμβρανικοί υποδοχείς και οι προσδέτες τους) προς την αποικοδομητική οδό. Συνοψίζοντας λοιπόν, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής συμπεραίνουμε ότι η ACAT2 είναι μια νέα πρωτεΐνη αναστολέας της Rab5 και παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης. Τέλος, μελλοντικά πειράματα θα συμβάλλουν στην περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης, και διαλευκάνουν τον ακριβή ρόλο της στην διασύνδεση μεταξύ μεταβολισμού, ενδοκυττάρωσης και μεταγωγής του σήματος.

SUMMARY

Endocytosis is the process by which cells internalize macromolecules from the extracellular environment (i.e. nutrients) and surface proteins. Besides, endocytosis controls the internalization of membrane receptors from plasma membrane to endosomes, where they activate specific signaling molecules. Thus, endocytosis is a fine-tuning mechanism of the duration and intensity of signaling process.

Trafficking of receptors, from the plasma membrane to endosomes and lysosomes, is achieved via vesicular transport. A key regulatory factor of the endocytic network is Rab5, a small GTPase that controls trafficking and signaling of a wide range of receptors. Rab5 controls the internalization rate of receptors, the type of endosomes to which receptors are transported, and their fate. Thus, Rab5 regulates signal transduction. To exert its various functions Rab5 interacts with an ever-increasing network of proteins/effectors.

In previous studies, an affinity chromatography methodology was developed, by which most of the identified proteins associated with the active form of Rab5 (Rab5-GTP). Despite the large number of known proteins interacting with Rab5-GTP, only one protein was found associated with the Rab5 inactive form (Rab5-GDP), the cytoplasmic enzyme Acetoacetyl-CoA Thiolase 2 (ACAT2). ACAT2 catalyzes the conversion of acetyl-CoA to acetoacetyl-CoA, the first reaction of the mevalonate pathway, which produces cholesterol, heme, steroid hormones etc. Besides, ACAT2 has been recently characterized as a new cytoplasmic protein acetyl-transferase. Thereby, ACAT2 not only controls the cellular levels of Acetyl-CoA, a central metabolic intermediate, but also uses this metabolite for acetylation of proteins in eukaryotes, and links metabolism with protein modifications. The specificity of the Rab5-ACAT2 interaction was confirmed by employing an affinity chromatography approach, using different members of the Rab family (such as Rab4 and Rab27). To assess the strength and the kinetics of ACAT2-Rab5 interaction, isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were performed for ACAT2 and Rab5-GDP. The data suggest that binding of ACAT2 to Rab5-GDP, is a thermodynamically favored, yet weak, interaction, with a K_d at the scale of μM , which is rather typical for protein-protein interactions forming dynamic regulatory networks.

We proceeded in testing the specificity of the interaction in a cell-based assay. To this end, we employed a method where acute artificial translocation of Rab5 to the

mitochondrial surface, by fusing it to the ActA tag, induced the recruitment of ACAT2 to the mitochondria. Our observation was confirmed in two different cell-types (HUVEC and HepG2) suggesting that ACAT2 not only interacts specifically with Rab5-GDP in a cellular environment, but also that the interaction between the two proteins is not cell-type specific.

To get insights into the functional significance of ACAT2-Rab5 interaction, we initially tested the effect of knock down of ACAT2 in the number of early endosomes and lysosomes in HUVE and HepG2 cells. Our results demonstrate that knock down of ACAT2 caused an increase in the number of early endosomes, and secondary to that, increase in late endosomes and lysosomes. To further estimate the role of ACAT2 in Rab5 functions, we tested the role of ACAT2 in VEGFR2 endocytosis, which is mainly mediated via macropinocytosis, in a Rab5-dependent manner. Interestingly, we found that knock down of ACAT2 in HUVEC, induces internalization and subsequently degradation of VEGFR2, after induction with VEGF. Previous data have shown that knock down of ACAT2 also accelerates EGF induced EGFR degradation, in HeLa cells (Thanasis Ziogas, master thesis 2011). In addition, to determine the exact mechanism by which ACAT2 regulates Rab5 functions, we tested the effect of ACAT2 in homotypic fusion of early endosomes *in vitro*, a well-established content mixing assay that depends on Rab5. We found that, ACAT2 inhibits fusion of endosomes, in a dose dependent manner, and the inhibitory effect of purified ACAT2 depends on its native conformation. Furthermore, the data suggest that the amount of ACAT2 required to interfere with endosome fusion is comparable to other established regulators of endosome fusion, further substantiating a specific role of ACAT2 in endosomal function. We also found that when GDI and ACAT2 are concomitantly present in the fusion reaction, there is an additive inhibitory effect in endosome fusion, suggesting that individual molecules of ACAT2 and GDI bind to, and block independent molecules of, Rab5-GDP. Finally, fusion experiments revealed that the enzymatic activity of ACAT2 is not essential for the inhibition of fusion, as the inactive mutant of ACAT2 caused a similar inhibitory effect as the wild type protein. To determine the mechanism by which ACAT2-Rab5 interaction interferes with endosome fusion, we tested the Rab5-mediated recruitment of EEA1 on early endosomes, in the presence of recombinant ACAT2. Surprisingly, we found that ACAT2 inhibits Rab5-mediated EEA1 recruitment on early endosomes, thus resolving the inhibitory role of ACAT2 in endosome fusion.

Finally, we tested whether ACAT2 acetylates Rab5GDP *in vitro*. Using a mass spectroscopy approach, we found that Rab5 is acetylated, by ACAT2, in lysine residues 180/183, which are near the hypervariable region (HVR), a domain in the carboxy-tail of the protein, which plays important role in the interaction with GDI, as well as the prenylation.

Taken together, the above findings suggest the interaction between ACAT2 and the inactive form of Rab5 (GDP form) results in the retainment of the latter in the inactive state on endosome membranes. Consequently, EEA1 recruitment to early endosomes is inhibited, resulting in an attenuation of early endosome fusion. Given the role of ACAT2 in endocytosis and the biogenesis of endolysosomal pathway, our data indicate that ACAT2 inhibits the transport of endocytic vesicles and of the receptor cargo molecules that they carry, towards lysosomal degradation. All in all, we suggest that ACAT2 is a novel Rab5 inhibitor, which regulates endocytic membrane transport. Finally, further studies are necessary to unravel the role of the ACAT2-Rab5 interaction in the interconnection between endocytosis, signaling and metabolism.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Grosshans, B.L., Ortiz, D. & Novick, P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11821-11827 (2006).
2. Reynolds, G.D., Wang, C., Pan, J. & Bednarek, S.Y. Inroads into Internalization: Five Years of Endocytic Exploration. *Plant Physiol* **176**, 208-218 (2018).
3. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *The EMBO Journal* **30**, 3481-3500 (2011).
4. Antonescu, C.N., McGraw, T.E. & Klip, A. Reciprocal regulation of endocytosis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **6**, a016964-a016964.
5. Scita, G. & Di Fiore, P.P. The endocytic matrix. *Nature* **463**, 464-473 (2010).
6. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50 (2010).
7. Pike, L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research* **44**, 655-667 (2003).
8. de Laurentiis, A., Donovan, L. & Arcaro, A. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *The open biochemistry journal* **1**, 12-32 (2007).
9. Parton, R.G. Caveolae: Structure, Function, and Relationship to Disease. *Annual review of cell and developmental biology* **34**, 111-136 (2018).
10. Kerr, M.C. & Teasdale, R.D. Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364-371 (2009).
11. Kirkham, M. & Parton, R.G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochimica et biophysica acta* **1745**, 273-286 (2005).
12. Mayor, S. & Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 603 (2007).
13. Swanson, J.A. & Watts, C. Macropinocytosis. *Trends in cell biology* **5**, 424-428 (1995).
14. Goh, L.K. & Sorkin, A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a017459 (2013).
15. Irannejad, R. & von Zastrow, M. GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* **27**, 109-116 (2014).
16. Sigismund, S. *et al.* Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological reviews* **92**, 273-366 (2012).
17. Miaczynska, M. Effects of Membrane Trafficking on Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5** (2013).
18. Sorkin, A. & von Zastrow, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 609-622 (2009).
19. Scott, C.C., Vacca, F. & Gruenberg, J. Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in cell & developmental biology* **31**, 2-10 (2014).
20. Miaczynska, M., Pelkmans, L. & Zerial, M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Current opinion in cell biology* **16**, 400-406 (2004).
21. Platta, H.W. & Stenmark, H. Endocytosis and signaling. *Current opinion in cell biology* **23**, 393-403 (2011).
22. Sadowski, L., Pilecka, I. & Miaczynska, M. Signaling from endosomes: Location makes a difference. *Experimental cell research* **315**, 1601-1609 (2009).
23. Miaczynska, M. & Zerial, M. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Experimental cell research* **272**, 8-14 (2002).
24. Bonifacino, J.S. & Glick, B.S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-166 (2004).
25. Mellman, I. Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology* **12**, 575-625 (1996).
26. Munro, S. *Munro, S. Organelle identity and the organization of membrane traffic. Nature Cell Biol.* **6**, 469-472, Vol. 6. (2004).
27. Banach-Orlowska, M., Pilecka, I., Torun, A., Pyrzynska, B. & Miaczynska, M. Functional characterization of the interactions between endosomal adaptor protein APPL1 and the NuRD co-repressor complex. *Biochem J* **423**, 389-400 (2009).

28. Miaczynska, M. *et al.* APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* **116**, 445-456 (2004).
29. Sadowski, L., Pilecka, I. & Miaczynska, M. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp Cell Res* **315**, 1601-1609 (2009).
30. Wiley, H.S. & Burke, P.M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* **2**, 12-18 (2001).
31. Palfy, M., Remenyi, A. & Korcsmaros, T. Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends Cell Biol* **22**, 447-456 (2012).
32. Burke, P., Schooler, K. & Wiley, H.S. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Molecular biology of the cell* **12**, 1897-1910 (2001).
33. Hayes, S., Chawla, A. & Corvera, S. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *The Journal of cell biology* **158**, 1239-1249 (2002).
34. Jopling, H.M., Howell, G.J., Gamper, N. & Ponnambalam, S. The VEGFR2 receptor tyrosine kinase undergoes constitutive endosome-to-plasma membrane recycling. *Biochemical and biophysical research communications* **410**, 170-176 (2011).
35. Zhang, L., Wu, G., Herrle, F., Niedergethmann, M. & Keese, M. Single nucleotide polymorphisms of genes for EGF, TGF-beta and TNF-alpha in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer genomics & proteomics* **9**, 287-295 (2012).
36. Nada, S. *et al.* The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *Embo j* **28**, 477-489 (2009).
37. Dobrowolski, R. & M De Robertis, E. *Dobrowolski R, De Robertis EM* Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:53-60, Vol. 13. (2011).
38. Gruenberg, J. & Maxfield, F.R. Membrane transport in the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* **7**, 552-563 (1995).
39. Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. & Caplan, S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology* **25**, 99-112 (2010).
40. Gruenberg, J. & Howell, K.E. Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annual review of cell biology* **5**, 453-481 (1989).
41. Gruenberg, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 721-730 (2001).
42. Mayor, S., Presley, J.F. & Maxfield, F.R. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *The Journal of cell biology* **121**, 1257-1269 (1993).
43. Zeigerer, A. *et al.* Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* **485**, 465 (2012).
44. Cai, H., Reinisch, K. & Ferro-Novick, S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental cell* **12**, 671-682 (2007).
45. Duman, J.G. & Forte, J.G. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *American journal of physiology. Cell physiology* **285**, C237-249 (2003).
46. Ohya, T. *et al.* Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* **459**, 1091-1097 (2009).
47. Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925 (1991).
48. Gournier, H., Stenmark, H., Rybin, V., Lippe, R. & Zerial, M. Two distinct effectors of the small GTPase Rab5 cooperate in endocytic membrane fusion. *Embo j* **17**, 1930-1940 (1998).
49. Horiuchi, H. *et al.* A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**, 1149-1159 (1997).

50. Hu, Y.-B., Dammer, E.B., Ren, R.-J. & Wang, G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational neurodegeneration* **4**, 18-18 (2015).
51. Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508 (2010).
52. Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D. & Zerial, M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625 (1999).
53. Christoforidis, S. & Zerial, M. [14] Purification of EEA1 from bovine brain cytosol using Rab5 affinity chromatography and activity assays, Vol. 329. (2001).
54. Mills, I.G., Jones, A.T. & Clague, M.J. Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Current biology : CB* **8**, 881-884 (1998).
55. Simonsen, A. *et al.* EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498 (1998).
56. Somsel Rodman, J. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of cell science* **113 Pt 2**, 183-192 (2000).
57. Kelly, E.E., Horgan, C.P., Goud, B. & McCaffrey, M.W. The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochemical Society transactions* **40**, 1337-1347 (2012).
58. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 513-525 (2009).
59. Wittinghofer, A. *et al.* Three-dimensional structure and properties of wild-type and mutant H-ras-encoded p21. *Ciba Foundation symposium* **176**, 6-21; discussion 21-27 (1993).
60. McLauchlan, H. *et al.* A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Current biology : CB* **8**, 34-45 (1998).
61. Kucera, A., Bakke, O. & Progida, C. The multiple roles of Rab9 in the endolysosomal system. *Communicative & integrative biology* **9**, e1204498 (2016).
62. Soldati, T., Shapiro, A.D., Svejstrup, A.B. & Pfeffer, S.R. Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**, 76-78 (1994).
63. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749 (2005).
64. Vonderheit, A. & Helenius, A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS biology* **3**, e233 (2005).
65. Wandinger-Ness, A. & Zerial, M. Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **6** (2014).
66. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* **93**, 269-309 (2013).
67. Muller, M.P. & Goody, R.S. Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. **9**, 5-21 (2018).
68. Pfeffer, S.R. Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15485-15488 (2005).
69. Pfeffer, S.R. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Molecular biology of the cell* **28**, 712-715 (2017).
70. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 107-117 (2001).
71. Bucci, C. *et al.* The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728 (1992).
72. Bucci, C. *et al.* Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5061-5065 (1994).
73. Chen, X. & Wang, Z. Regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis by wortmannin through activation of Rab5 rather than inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO reports* **2**, 842-849 (2001).

74. Gulappa, T., Clouser, C.L. & Menon, K.M.J. The role of Rab5a GTPase in endocytosis and post-endocytic trafficking of the hCG-human luteinizing hormone receptor complex. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**, 2785-2795 (2011).
75. Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A. & Zerial, M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature cell biology* **1**, 376-382 (1999).
76. Zerial, M. Regulation of endocytosis by the small GTP-ase Rab5. *Cytotechnology* **11**, S47-49 (1993).
77. Feliciano, W.D., Yoshida, S., Straight, S.W. & Swanson, J.A. Coordination of the Rab5 cycle on macropinosomes. *Traffic* **12**, 1911-1922 (2011).
78. Rybin, V. *et al.* GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266-269 (1996).
79. Stenmark, H. *et al.* Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo j* **13**, 1287-1296 (1994).
80. Woodman, P.G. Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. *Traffic* **1**, 695-701 (2000).
81. Edler, E. & Stein, M. Recognition and stabilization of geranylgeranylated human Rab5 by the GDP Dissociation Inhibitor (GDI). *Small GTPases* **10**, 227-242 (2019).
82. Li, G. & Stahl, P.D. Post-translational processing and membrane association of the two early endosome-associated rab GTP-binding proteins (rab4 and rab5). *Archives of biochemistry and biophysics* **304**, 471-478 (1993).
83. Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C. & Zerial, M. Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160 (1994).
84. Clague, M.J. & Urbe, S. The interface of receptor trafficking and signalling. *Journal of cell science* **114**, 3075-3081 (2001).
85. Panopoulou, E. *et al.* Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 18046-18052 (2002).
86. Barbieri, M.A., Fernandez-Pol, S., Hunker, C., Horazdovsky, B.H. & Stahl, P.D. Role of rab5 in EGF receptor-mediated signal transduction. *European journal of cell biology* **83**, 305-314 (2004).
87. Zeigerer, A. *et al.* Regulation of liver metabolism by the endosomal GTPase Rab5. *Cell reports* **11**, 884-892 (2015).
88. Christoforidis, S. & Zerial, M. Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods* **20**, 403-410 (2000).
89. Mishra, A., Eathiraj, S., Corvera, S. & Lambright, D.G. Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 10866-10871 (2010).
90. Murray, D.H. *et al.* An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together. *Nature* **537**, 107 (2016).
91. Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R. & Zerial, M. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 3745-3748 (2000).
92. Langemeyer, L., Fröhlich, F. & Ungermann, C. Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. *Trends in cell biology* **28**, 957-970 (2018).
93. Zhang, Z. *et al.* Molecular mechanism for Rabex-5 GEF activation by Rabaptin-5. *eLife* **3** (2014).
94. Zhu, G. *et al.* Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nature structural & molecular biology* **11**, 975-983 (2004).
95. Zhu, H., Qian, H. & Li, G. Delayed onset of positive feedback activation of Rab5 by Rabex-5 and Rabaptin-5 in endocytosis. *PloS one* **5**, e9226 (2010).

96. Nielsen, E. *et al.* Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *The Journal of cell biology* **151**, 601-612 (2000).
97. Schnatwinkel, C. *et al.* The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS biology* **2**, E261 (2004).
98. Christoforidis, S. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature cell biology* **1**, 249-252 (1999).
99. Gaullier, J.-M. *et al.* FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**, 432-433 (1998).
100. Gillooly, D.J., Raiborg, C. & Stenmark, H. Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes. *Histochemistry and cell biology* **120**, 445-453 (2003).
101. Hasegawa, J., Strunk, B.S. & Weisman, L.S. PI5P and PI(3,5)P2: Minor, but Essential Phosphoinositides. *Cell structure and function* **42**, 49-60 (2017).
102. Modis, Y. & Wierenga, R.K. Crystallographic analysis of the reaction pathway of Zoogloea ramigera biosynthetic thiolase. *Journal of molecular biology* **297**, 1171-1182 (2000).
103. Pereto, J., Lopez-Garcia, P. & Moreira, D. Phylogenetic analysis of eukaryotic thiolases suggests multiple proteobacterial origins. *Journal of molecular evolution* **61**, 65-74 (2005).
104. Middleton, B. The oxoacyl-coenzyme A thiolases of animal tissues. *Biochem J* **132**, 717-730 (1973).
105. Hovik, R., Brodal, B., Bartlett, K. & Osmundsen, H. Metabolism of acetyl-CoA by isolated peroxisomal fractions: formation of acetate and acetoacetyl-CoA. *Journal of lipid research* **32**, 993-999 (1991).
106. Kursula, P., Ojala, J., Lambeir, A.M. & Wierenga, R.K. The catalytic cycle of biosynthetic thiolase: a conformational journey of an acetyl group through four binding modes and two oxyanion holes. *Biochemistry* **41**, 15543-15556 (2002).
107. Kursula, P., Sikkila, H., Fukao, T., Kondo, N. & Wierenga, R.K. High resolution crystal structures of human cytosolic thiolase (CT): a comparison of the active sites of human CT, bacterial thiolase, and bacterial KAS I. *Journal of molecular biology* **347**, 189-201 (2005).
108. Fukao, T. *et al.* Enzymes of Ketone Body Utilization in Human Tissues: Protein and Messenger RNA Levels of Succinyl-Coenzyme A (CoA):3-Ketoacid CoA Transferase and Mitochondrial and Cytosolic Acetoacetyl-CoA Thiolases. *Pediatric research* **42**, 498-502 (1997).
109. Miziorko, H.M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **505**, 131-143 (2011).
110. Ameer, F., Munir, R. & Zaidi, N. Lipid Metabolism, in *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)*. (eds. P. Boffetta & P. Hainaut) 369-373 (Academic Press, Oxford; 2019).
111. Wang, M. & Casey, P.J. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 110 (2016).
112. Shan, C. *et al.* Lysine acetylation activates 6-phosphogluconate dehydrogenase to promote tumor growth. *Molecular cell* **55**, 552-565 (2014).
113. Bennett, M.J., Hosking, G.P., Smith, M.F., Gray, R.G.F. & Middleton, B. Biochemical investigations on a patient with a defect in cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase, associated with mental retardation. *Journal of inherited metabolic disease* **7**, 125-128 (1984).
114. Groot, C.J., Haan, G.L., Hulstaert, C.E. & Hoomes, F.A. A patient with severe neurologic symptoms and acetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *Pediatric research* **11**, 1112-1116 (1977).
115. Riechman, S.E., Andrews, R.D., Maclean, D.A. & Sheather, S. Statins and dietary and serum cholesterol are associated with increased lean mass following resistance training. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **62**, 1164-1171 (2007).
116. Ushio, H. & Nagasaka, R. Utilization of Biological Responses of Fish and Shellfish for Improving Seafood Qualities. *Aqua-BioScience Monographs* **6**, 91-98 (2013).

117. Abudoukelimu, M. *et al.* Human acetyl-CoA acetyltransferase-2 (ACAT-2) gene was associated with hyperlipidemia in han chinese population: A case-control study, Vol. 9. (2016).
118. Zhao, Z. *et al.* Prognostic significance of two lipid metabolism enzymes, HADHA and ACAT2, in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**, 8121-8130 (2016).
119. Liscum, L. CHAPTER 14 - Cholesterol biosynthesis, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*. (eds. D.E. Vance & J.E. Vance) 399-421 (Elsevier, San Diego; 2008).
120. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59 (1989).
121. Middleton, B. The kinetic mechanism and properties of the cytoplasmic acetoacetyl-coenzyme A thiolase from rat liver. *Biochem J* **139**, 109-121 (1974).
122. Middleton, B. 3-Ketoacyl-CoA thiolases of mammalian tissues. *Methods in enzymology* **35**, 128-136 (1975).
123. Yamaguchi, S., Orii, T., Sakura, N., Miyazawa, S. & Hashimoto, T. Defect in biosynthesis of mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase in cultured fibroblasts from a boy with 3-ketothiolase deficiency. *The Journal of clinical investigation* **81**, 813-817 (1988).
124. Christoforidis, S. & Zerial, M. Purification of EEA1 from bovine brain cytosol using Rab5 affinity chromatography and activity assays. *Methods in enzymology* **329**, 120-132 (2001).
125. Bubeck, P., Pistor, S., Wehland, J. & Jockusch, B.M. Ligand recruitment by vinculin domains in transfected cells. *Journal of cell science* **110 (Pt 12)**, 1361-1371 (1997).
126. Freyer, M.W. & Lewis, E.A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions, in *Methods in Cell Biology*, Vol. 84 79-113 (Academic Press, 2008).
127. Zhang, Z. *et al.* Two novel cis-elements involved in hepatocyte nuclear factor 4alpha regulation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **44**, 162-171 (2012).
128. Clinkenbeard, K.D., Sugiyama, T., Moss, J., Reed, W.D. & Lane, M.D. Molecular and catalytic properties of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase from avian liver. *The Journal of biological chemistry* **248**, 2275-2284 (1973).
129. Pierce, M.M., Raman, C.S. & Nall, B.T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**, 213-221 (1999).
130. Merithew, E., Stone, C., Eathiraj, S. & Lambright, D.G. Determinants of Rab5 interaction with the N terminus of early endosome antigen 1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 8494-8500 (2003).
131. Shin, D. *et al.* Site-specific monoubiquitination downregulates Rab5 by disrupting effector binding and guanine nucleotide conversion. **6** (2017).
132. Blumer, J. *et al.* RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *The Journal of cell biology* **200**, 287-300 (2013).
133. Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. & Wehland, J. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *Embo j* **13**, 758-763 (1994).
134. Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U. & Wehland, J. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Current biology : CB* **5**, 517-525 (1995).
135. Gorvel, J.-P., Chavrier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925 (1991).
136. Li, G., Barbieri, M.A., Colombo, M.I. & Stahl, P.D. Structural features of the GTP-binding defective Rab5 mutants required for their inhibitory activity on endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **269**, 14631-14635 (1994).

137. Li, F. *et al.* The role of the hypervariable C-terminal domain in Rab GTPases membrane targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 2572-2577 (2014).
138. Kummel, D. & Ungermann, C. Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Current opinion in cell biology* **29**, 61-66 (2014).
139. Cook, N.R., Row, P.E. & Davidson, H.W. Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic* **5**, 685-699 (2004).
140. Basagiannis, D. & Christoforidis, S. Constitutive Endocytosis of VEGFR2 Protects the Receptor against Shedding. *The Journal of biological chemistry* **291**, 16892-16903 (2016).
141. Basagiannis, D., Zografou, S., Galanopoulou, K. & Christoforidis, S. Dynasore impairs VEGFR2 signalling in an endocytosis-independent manner. *Scientific reports* **7**, 45035 (2017).
142. Basagiannis, D. *et al.* VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. **129**, 4091-4104 (2016).
143. Ullrich, O. *et al.* Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**, 18143-18150 (1993).
144. Palmer, M.A. *et al.* Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. Evidence for a mechanism involving Cys-378 as the active site base. *The Journal of biological chemistry* **266**, 8369-8375 (1991).
145. Novick, P. & Zerial, M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current opinion in cell biology* **9**, 496-504 (1997).
146. Pfeffer, S.R. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Current opinion in cell biology* **6**, 522-526 (1994).
147. Clinkenbeard, K.D., Sugiyama, T., Moss, J., Reed, W.D. & Lane, M.D. Molecular and Catalytic Properties of Cytosolic Acetoacetyl Coenzyme A Thiolase from Avian Liver. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 2275-2284 (1973).
148. Watanabe, H. *et al.* Practical assay method of cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase by rapid release of cytosolic enzymes from cultured lymphocytes using digitonin. *The Tohoku journal of experimental medicine* **184**, 29-38 (1998).
149. Lakadamyali, M., Rust, M.J. & Zhuang, X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**, 997-1009 (2006).
150. Del Conte-Zerial, P. *et al.* Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. *Mol Syst Biol* **4**, 206-206 (2008).
151. Barbieri, M.A., Li, G., Colombo, M.I. & Stahl, P.D. Rab5, an early acting endosomal GTPase, supports in vitro endosome fusion without GTP hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* **269**, 18720-18722 (1994).
152. Edler, E. & Stein, M. Probing the druggability of membrane-bound Rab5 by molecular dynamics simulations. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **32**, 434-443 (2017).
153. Pfeffer, S. & Aivazian, D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 886-896 (2004).
154. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G. & Roy, C.R. Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-369 (2007).
155. Machner, M.P. & Isberg, R.R. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 974-977 (2007).
156. Oesterlin, L.K., Goody, R.S. & Itzen, A. Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5621-5626 (2012).
157. Abdelkarim, H. *et al.* The Hypervariable Region of K-Ras4B Governs Molecular Recognition and Function. *International journal of molecular sciences* **20** (2019).
158. de Boor, S. *et al.* Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E3679-3688 (2015).

159. Knyphausen, P., Kuhlmann, N., de Boor, S. & Lammers, M. Lysine-acetylation as a fundamental regulator of Ran function: Implications for signaling of proteins of the Ras-superfamily. *Small GTPases* **6**, 189-195 (2015).
160. Knyphausen, P., Lang, F., Baldus, L., Extra, A. & Lammers, M. Insights into K-Ras 4B regulation by post-translational lysine acetylation. *Biological chemistry* **397**, 1071-1085 (2016).
161. Yin, G. *et al.* A KRAS GTPase K104Q Mutant Retains Downstream Signaling by Offsetting Defects in Regulation. *The Journal of biological chemistry* **292**, 4446-4456 (2017).
162. Lin, Hua V. & Accili, D. Hormonal Regulation of Hepatic Glucose Production in Health and Disease. *Cell Metabolism* **14**, 9-19 (2011).
163. Xing, S. & Poirier, Y. The protein acetylome and the regulation of metabolism. *Trends in plant science* **17**, 423-430 (2012).
164. Jeffery, C.J. Moonlighting proteins. *Trends in biochemical sciences* **24**, 8-11 (1999).
165. Jeffery, C.J. Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **373**, 20160523 (2018).

