



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΩΝ
ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ
ΣΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ**

**ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α
ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ**

**ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Κωστοπούλου Νικολέτας: 4-7-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 644^α/23-9-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Carol Murphy, Ερευνήτρια Β' Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών, IMBB-ITE.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-1-2009

«Ο Ρόλος των Πρωτεϊνών του Συμπλέγματος των Υποδοχέων της Ακτιβίνης Α στην Μεταγωγή του Σήματος και τη Βιολογική Δραστικότητα της»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 780^α/2-7-2015

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμάη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Murphy Carol	Ερευνήτρια Β' Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών, IMBB, ITE

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις **24-11-2015**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένειά μου.. Ελένη, Αντώνιο Αθανάσιο

Στη γιαγιά Αλεξάνδρα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας (ITE-IMBB), κατά την χρονική περίοδο 2009-2015, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση. Η χρηματοδότηση για τη διεκπεραίωση της διατριβής προήλθε από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα Endotrack (LHG-CT-2006-019050) καθώς και το ελληνικό πρόγραμμα Κρηπίς-Βιοσύς (MIS 448301).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου κ. Θεόδωρο Φώτση, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο εργαστήριο του και για την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διατριβής αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Β' κ. Carol Murthy για την καθημερινή επικοινωνία και καθοδήγηση, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη για τις χρήσιμες συμβουλές του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δ. Γαλάρη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Θ. Παπαμαρκάκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Α. Πολίτου και τον Επίκουρο Καθηγητή Π. Κούκλη για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου, πρώην και νυν, για τη συνεργασία τους αλλά και για τις στιγμές που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια: Εύη Καραλή, Λευτέρη Κωσταρά, Γεώργιο Σφλώμο, Κατερίνα Πανοπούλου, Μπέττυ Χατζή, Λαμπρινή Κύρκου, Ελένη Μπαγκλή, Άγγελο Παπαδόπουλο, Δημήτρη Κουρούπη, Αμαλία Γούλα, Αθηνά Κύρκου, Αναστασία Κουγιουμτζή, Βαγγέλη Ντρούγκα, Μαρία Μάρκου, Άνθιμο Ανθίμου, Δημήτρη Τσελέπη και Μιχάλη Αμοιρίδη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικής Έρευνας και ιδιαίτερα τους Δημήτρη Μπασαγιάννη, Σοφία Ζωγράφου, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα και Μιχάλη Μάντζαρη. Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου τις οφείλω στην εξαιρετική συνάδελφο Δρ. Σοφία Μπέλλου, τη πιο στενή συνεργάτη μου, η οποία εργάστηκε σκληρά για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για τη ψυχολογική ώθηση που μου έδινε πάντα, την αगाστή συνεργασία μας και κυρίως που με τιμά με τη φιλία της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους για τη συμπαράσταση και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια στα Ιωάννινα, και κυρίως τη Λίνα Μπαλτά, την Έλενα Παπακώστα και τη Μαρία Πήχα. Κλείνοντας, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Αντώνιο και Ελένη, τον αδερφό μου Αθανάσιο και τη γιαγιά μου Αλεξάνδρα, για την αγάπη τους, την στήριξή τους, τη ψυχολογική και υλική βοήθεια που πάντα απλόχερα μου χάριζαν. Χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να φέρω εις πέρας τη διατριβή αυτή, τους ευχαριστώ πολύ που δεν έφεραν ποτέ αντίρρηση στις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΑΚΤΙΒΙΝΗ Α.....	1
1.1.2 Η οικογένεια των Ακτιβινών - Βιολογική Δράση	4
1.1.3 Δομή της Ακτιβίνης	5
1.1.4 Ακτιβίνη Α - Ρύθμιση της παραγωγής της	7
1.1.5 Μεταγωγή του σήματος	9
1.1.5.1 Υποδοχείς.....	10
1.1.5.2 Διαμεσολαβητές.....	10
1.1.5.3 Είσοδος και έξοδος από τον πυρήνα	13
1.1.5.4 Γονιδιακή Ρύθμιση	14
1.1.5.5 Τερματισμός της σηματοδότησης - Αρνητική ρύθμιση	15
1.1.5.6 Μεταγωγή σήματος από την Ακτιβίνη Α, ανεξάρτητη από τους διαμεσολαβητές SMADs ..	19
1.2 Η ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΗ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TGF-β. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α ΣΕ ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΙΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ	21
1.2.1 Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού.....	21
1.2.2 Απόπτωση	21
1.2.3. Ακτιβίνη Α και ανοσοποιητικό σύστημα	22
1.2.4. Επούλωση τραύματος και Αναγέννηση Ιστών	24
1.2.5. Ακτιβίνη Α και καρκινογένεση	24
1.2.5.1. Επιθηλιακοί όγκοι	24
1.2.5.2. Ινοβλάστες	25
1.2.5.3. Ενδοθηλιακά κύτταρα-Αγγειογένεση	26
1.2.6 TGF-β/ Ακτιβίνη Α: Μεταστροφή από αναστολείς σε επαγωγείς της καρκινογένεσης.....	27
1.2.7. Εμβρυϊκή Ανάπτυξη και Βιολογία των Βλαστοκυττάρων	29
1.3. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ	31
1.3.1. Γενικά.....	31
1.3.2 Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης	31
1.3.3 Ενδοκυτταρική Διακίνηση - Το πρώιμο ενδόσωμα.....	34
1.3.4 Οι πρωτεΐνες-ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής διακίνησης.....	35

1.3.4.1 Φωσφοϊνοσίδια.....	35
1.3.4.2 Οι Rab πρωτεΐνες	37
1.3.4.3 Άλλες πρωτεΐνες ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής διακίνησης.....	39
1.3.5 Ενδοσώματα ανακύκλησης	40
1.3.6 Πολυκυστιδιακά σωματίδια - Όψιμα ενδοσώματα – Λυσοσώματα	41
1.3.7 Η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση.....	42
1.3.8 Η ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη καβεολίνη	45
1.3.9 Τα υπόλοιπα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης	46
1.4 ΜΑΚΡΟΠΙΝΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	46
1.4.1 Επαγωγή της μακροπinoκυττάρωσης.....	47
1.4.2 Ωρίμανση και ενδοκυτταρική διακίνηση των μακροπinoσωμάτων	51
1.4.3 Η σύνδεση μεταξύ σηματοδότησης TGF-β/Ακτιβίνης A και κυστιδιακής διακίνησης των υποδοχέων	53
1.4.4 Είναι η ενδοκυττάρωση απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF-β σηματοδότηση; - Προηγούμενη Γνώση.....	53
ΣΚΟΠΟΣ	56
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	57
2.1 ΥΛΙΚΑ	57
2.1.1 Αντισώματα και αυξητικοί παράγοντες	57
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης πρωτεϊνών και μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs.....	58
2.1.3 Χημικές ουσίες-αναστολείς.....	59
2.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	59
2.2.1 Καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών	59
2.2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη φλέβα ομφάλιων λώρων νεογνών	61
2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με DNA και siRNA.....	62
2.2.4 Κατασκευή Ανασυνδυασμένων Αδενοϊών	62
2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western	63
2.3.2 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών	64
2.3.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός και στατιστική ανάλυση του συνεντοπισμού	65
2.3.4 Δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης in vivo (co-immunoprecipitation assay)	65
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
3.1 Η ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ.....	68
3.1.1 Εντόπιση των υποδοχέων ALK4 και ActRIIB, απουσία Ακτιβίνης Α, στα πρώιμα ενδοσώματα και ανακύκληση στην κυτταρική μεμβράνη – αποικοδόμηση του ActRIIB στα λυσοσώματα	68
3.1.2 Η Ακτιβίνη Α οδηγεί τους ActRIIB και ALK4 υποδοχείς στα πρώιμα ενδοσώματα και κατόπιν στην κυτταρική μεμβράνη – Υψηλό ποσοστό συνεντόπισης με Rabankyrin-5, μία πρωτεΐνη-δείκτη της μακροπinoκυττάρωσης.....	72
3.1.3 Η σημασμένη Ακτιβίνη Α εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, υφίσταται ανακύκληση και εμφανίζει υψηλή συνεντόπιση με δείκτες της μακροπinoκυττάρωσης.....	76
3.2 ΠΑΡΕΜΒΟΛΕΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ.....	83
3.2.1 Η αποσιώπηση της κλαθρίνης συνοδεύεται από μειωμένη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 και περιορισμένη μετακίνησή τους στον πυρήνα, μετά από χορήγηση Ακτιβίνης Α	83
3.2.2 Ο Ρόλος της καβεολίνης -1 στη μεταγωγή του σήματος της Ακτιβίνης Α και την ενδοκυττάρωσή της	87
3.2.3 Μακροπinoκυττάρωση: Η απρόσμενη οδός ενδοκυττάρωσης του συμπλέγματος της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της	90
3.2.4 Η αναστολή της μακροπinoκυττάρωσης συνδυάζεται με δραματική μείωση της σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α	98
3.2.5 Ο περιορισμένος ρόλος της μακροπinoκυττάρωσης στη μεταγωγή του σήματος της Ακτιβίνης Α στα βλαστικά κύτταρα.....	101
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
4.1 Ενδοκυττάρωση απουσία προσδέματος	106

4.2 Ενδοκυττάρωση παρουσία προσδέματος	107
4.3 Παρέμβαση στην κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση.....	109
4.4 Παρέμβαση στην ενδοκυττάρωση μέσω καβεοσωμάτων.....	110
4.5 Παρέμβαση στη μακροπinoκυττάρωση.....	111
4.6 Η Ακτιβίνη Α επάγει τη μακροπinoκυττάρωση	112
4.7 Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα δεν ενδοκυτταρώνουν με μακροπinoκυττάρωση, η οποία φαίνεται να είναι προϊόν διαφοροποίησης.....	113
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	117
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)	119
ACTIVIN A RECEPTORS INTERACTING PROTEINS AND THEIR ROLE IN SIGNAL TRANSDUCTION AND BIOLOGICAL FUNCTION.	119
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	124

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ακτιβίνη Α

1.1.1 Υπεροικογένεια του TGF-β

Όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί, από τους απλούστερους μέχρι τους ανώτερους, καθώς εξελίσσονται σε συνθετότερες μορφές ζωής, αναπτύσσουν ένα σύστημα επικοινωνίας και ελέγχου μεταξύ των κυττάρων τους, προκειμένου να εξασφαλίσουν την ομοιόσταση και την ομαλή λειτουργία τους.

Οι βασικές λειτουργίες των κυττάρων όλων των μεταζώων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, ακόμη και ο κυτταρικός θάνατος, ελέγχονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδοτικών μορίων όπως είναι οι κυτταροκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι ορμόνες. Ανάμεσά τους, η οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β) κατέχει περίοπτη θέση ^{1,2}. Συγκεκριμένα, 42 μέλη της οικογένειας αυτής κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα, 7 από αυτό της δροσόφιλα (*Drosophila Melanogaster*) και 4 από το γονιδίωμα του νηματοειδή σκώληκα (*C. Elegans*).

Τα μέλη αυτά παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τις λειτουργίες που ρυθμίζουν, στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής, σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η κυτταρική διαίρεση, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση (EMT), η αγγειογένεση και η μετάσταση στον καρκίνο ³. Δύο υποοικογένειες πρωτεϊνών έχουν οριστεί με βάση τις ομοιότητες στην αλληλουχία τους και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορεί να ενεργοποιούν: η υποοικογένεια TGF-β/Ακτιβίνη/Nodal και η υποοικογένεια BMP (Bone Morphogenetic Protein)/GDF (Growth and Differentiation Factor)/MIS (Mullerian Inhibiting Substance).

Η απενεργοποίηση ή η ελαττωματική έκφραση συστατικών της μεταγωγής του σήματος του TGF-β παίζουν σημαντικό ρόλο στη γένεση διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου ⁴ (Πίνακας 1). Ακόμη, η σημασία των μελών της οικογένειας του TGF-β στην ανάπτυξη των οργανισμών αντικατοπτρίζεται εναργέστερα στο πλήθος των κληρονομικών ασθενειών στις οποίες συμμετέχουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια της οικογένειας αυτής.

Ασθένεια	Σηματοδοτικά Μόρια
Καρδιαγγειακά νοσήματα	
Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία	<i>ENG, ACVRL1, SMAD4</i>
Νοσήματα της αορτής (Loeys-Dietz syndrome, familial thoracic aortic aneurysm syndrome, arterial tortuosity syndrome)	<i>TGFBR1, TGFBR2</i>
Πρωτοπαθής πνευμονική υπέρταση	<i>BMPT2, ACVRL1</i>
Προ-εκλαμψία	sEnd
Αρτηριοσκληρυνση	↑ TGFβ1
Επαναστένωση μετα από αγγειοπλαστική	↑ TGFβ1
Υπέρταση	<i>TGFB1</i> (↑ TGFβ1)
Υπερτροφική καρδιομυοπάθεια/καρδιακή ανεπάρκεια	<i>BMP10</i> (↑ BMP10)
Νοσήματα του συνδετικού ιστού	
Σύνδρομο Marfan και συναφή σύνδρομα	<i>FBN1, TGFBR1, TGFBR2</i>
Ινωτικά νοσήματα (fibrotic diseases)	
Σκελετικές και μυϊκές διαταραχές	
Ασθένεια Camurati-Engelman	<i>TGFB1</i>
Προοδευτική Οστεοποιητική Ινοδυσπλασία	<i>ACVR1</i>
Χονδροδυσπλασίες Hunter-Thompson και Grebe-type	<i>GDF5</i>
Οστεοπόρωση	<i>TGFB1</i> (↑ TGFβ1)
Σκληροστέωση και νόσος Van Buchem	<i>SOST</i>
Βραχυδακτυλία	<i>GDF5, BMPR1B</i>
Συμφαλαγγισμός	<i>NOGGIN, GDF5</i>
Μυϊκή δυστροφία Duchenne	

Διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος

Πρώιμη ανεπάρκεια των ωοθηκών	<i>BMP15, INHA</i>
Σύνδρομο παραμένοντα Μυλλεριανού πόρου	<i>MIS, AMHR2</i>

Κληρονομικός καρκίνος

Σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης	<i>BMPR1A, ENG, SMAD4</i>
Κληρονομικός μη πολυποδικός καρκίνος του παχέος εντέρου	<i>TGFB1</i>
Σύνδρομο Bannayan-Riley-Ruvalcaba και Cowden	<i>BMPR1A</i>

Σποραδικός καρκίνος

Μαστού	<i>TGFB1, TGFB2, TGFB1, ALK6,</i> <i>BMP-4, BMP-7</i>
Παχέος εντέρου	<i>BMP, TGFB1, TGFB2, SMAD2,</i> <i>SMAD4</i>
Πνεύμονα	<i>TGFB2, SMAD2, SMAD3</i>
Παγκρέατος	<i>↑ TGFβ1, ↑ TGFβ2, TGFB2,</i> <i>SMAD4</i>
Προστάτη	<i>TGFB1, GDF-5, TβRIII, SMAD3</i>

Διαταραχές της ανάπτυξης

Λαγόστομα	<i>TGFB2, TGFB3</i>
Situs Inversus and Situs Ambiguus	<i>LEFTY1, NODAL</i>

Πίνακας 1. Κατάλογος ασθενειών με ελαττωματική μεταγωγή του σήματος μελών της οικογένειας TGF-β

Προεξάρχουσα θέση στις παραπάνω ασθένειες έχουν ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αναφορικά με τον καρκίνο, είναι γνωστό ότι ο TGF- β ρυθμίζει πολλά γονίδια με σημαντικότερα αυτά που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο⁵. Καθώς ο TGF- β μεταφέρει ανασταλτικά του πολλαπλασιασμού σήματα και θεωρείται σαν το πρότυπο ανασταλτικό πολυπεπτίδιο, μεταλλάξεις αρκετών από τα συστατικά της μεταγωγής σήματος του TGF- β , συμμετέχουν στη δημιουργία καρκίνων, καθιστώντας τα κύτταρα μη ανταποκρίσιμα^{6,7}. Επίσης, οι μεταλλάξεις που καταργούν την ογκοκατασταλτική δράση του (αναστολή του κυτταρικού κύκλου) παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της κακοήθους εξαλλαγής, επιτρέποντας την έναρξη ενός καρκινικού κλώνου. Σε μετέπειτα στάδια όμως, ο TGF- β υπερεκφράζεται⁸ και συνεισφέρει στον κακοήθη φαινότυπο με άλλους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση αυξάνοντας το διεισδυτικό δυναμικό των όγκων, δημιουργεί ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον καταστέλλοντας τη δράση των T κυττάρων και επάγει την αγγειογένεση.

1.1.2 Η οικογένεια των Ακτιβινών - Βιολογική Δράση

Οι ακτιβίνες είναι ομοδιμερή ή ετεροδιμερή πεπτίδια και ανήκουν στην οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF- β). Αρχικά, ταυτοποιήθηκαν με βάση την ικανότητά τους να επάγουν την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από τα κύτταρα της υπόφυσης το 1986, όταν και απομονώθηκαν από ωοθηλακικό υγρό⁹. Σύντομα έγινε αντιληπτό ότι έχουν ένα ευρύτερο φάσμα δράσης τόσο στην αιμοποίηση όσο και στην ανάπτυξη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος^{9,10}. Μόλις 4 χρόνια από την ανακάλυψή της Ακτιβίνης, έγινε γνωστή μια πολύ σημαντική δράση της. Το 1990 ο Thomsen και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η Ακτιβίνη επάγει την δημιουργία μεσοδέρματος σε έμβρυα *Xenopus laevis*¹¹. Την ίδια χρονιά, μια άλλη μελέτη δείχνει ότι η Ακτιβίνη δρα ως παράγοντας επιβίωσης των νευρώνων¹² και ενισχύει την επιβίωση 'τραυματισμένων' νευρικών κυττάρων¹³. Στις δημοσιεύσεις που ακολουθούν η Ακτιβίνη ανιχνεύεται σε πολλές κυτταρικές σειρές φυσιολογικών ιστών, συμπεριλαμβανομένων των όρχεων, των ωοθηκών, του ενδομητρίου, του πλακούντα, της χοληδόχου κύστεως και του παγκρέατος, αλλά και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που απομονώθηκαν από όγκους του προστάτη, του στήθους και το ρετινοβλάστωμα. Σταδιακά έγινε σαφές ότι η Ακτιβίνη δρα ως αυξητικός παράγοντας, αλλά και κυτταροκίνη με παρακρινική και αυτοκρινική δράση¹⁴.

Όσον αφορά την καρκινογένεση ο ρόλος της Ακτιβίνης έχει διερευνηθεί ελάχιστα. Σε αντιδιαστολή με τον TGF- β , η Ακτιβίνη A φαίνεται να έχει αντιαγγειογενετικές ιδιότητες *in vivo*. Με προηγούμενες μελέτες, στις οποίες συμμετείχε το εργαστήριο μας, αποδείχτηκε η αντιπολλαπλασιαστική της δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, αλλά και η ανασταλτική της επιρροή στη δημιουργία αγγείων, στη δοκιμασία αγγειογένεσης στην χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσού όρνιθας *in vivo*^{15, 16}. Επίσης, μελετήθηκε η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης στα νευροβλαστώματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ενίσχυση και υπερέκφραση του ογκογονιδίου MYCN, γεγονός το οποίο συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και αυξημένη νεοαγγείωση. Δείξαμε ότι κύτταρα νευροβλαστώματος με υψηλή έκφραση του ογκογονιδίου MYCN, στα οποία επανεκφράστηκε η Ακτιβίνη A (χρησιμοποιώντας διαφορετικό υποκινητή), δημιουργούν αργά αυξανόμενους ξενομοσχευματικούς όγκους με μειωμένη αγγείωση σε ποντίκια, καταδεικνύοντας την αποφασιστικής σημασίας συμμετοχή του μορίου στην διαδικασία του καοήθους μετασχηματισμού στα νευροβλαστώματα¹⁷.

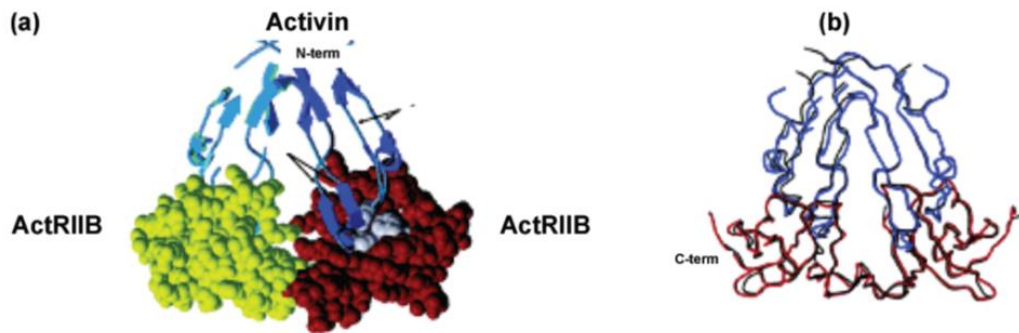
Όλα τα παραπάνω δεδομένα, διαφοροποιούν την Ακτιβίνη A από τον TGF- β και το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντικό σημείο ενδιαφέροντος και μελέτης. Συν τοις άλλοις, τα δεδομένα στη βιβλιογραφία, αναφορικά με τον τρόπο δράσης της Ακτιβίνης A, κρίνονται ελλιπή, γι' αυτό και η διαλεύκανση της δράσης αυτής αποτελεί και ένα από τους βασικούς σκοπούς της παρούσας διατριβής.

1.1.3 Δομή της Ακτιβίνης

Οι ακτιβίνες και οι ινχιπίνες είναι ομο- ή ετεροδιμερείς πρωτεΐνες, των οποίων οι υπομονάδες σταθεροποιούνται με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε κατάλοιπα κυστεϊνών (cysteine knot proteins)^{18, 19, 20}. Από το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται 4 β -υπομονάδες, οι βA , βB , βC , και βE . Παρόλα αυτά, μόνο τα διμερή $\beta A/\beta A$ (Ακτιβίνη A), $\beta B/\beta B$ (Ακτιβίνη B) και $\beta A/\beta B$ (Ακτιβίνη AB) έχουν μελετηθεί σε βάθος. Ο ετεροδιμερισμός μιας β -υπομονάδας με μια α -υπομονάδα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ινχιπίνης A ($\alpha/\beta A$) και της ινχιπίνης B ($\alpha/\beta B$). Όπως και άλλα μέλη της οικογένειας, οι ακτιβίνες συντίθενται αρχικά στην πρόδρομη, ανενεργή μορφή τους. Η αμινοτελική περιοχή των α και β υπομονάδων, προάγει την αναδίπλωση στο χώρο (folding) και τον διμερισμό των καρβοξυτελικών δομικών περιοχών^{21, 22}. Στην Ακτιβίνη A αφαιρούνται 290 αμινοξέα και τελικά η ώριμη μορφή αποτελείται από 116 αμινοξέα σε κάθε υπομονάδα, με συνολικό μοριακό βάρος 25 kDa. Στις «ώριμες» καρβοξυ-τελικές περιοχές, 9 κατάλοιπα κυστεΐνης είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό

δισουλφιδικών δεσμών, μέσα στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα ή μεταξύ αυτών. Η τελική μορφή της Ακτιβίνης παράγεται ενδοκυττάρια, μετά από ενζυμική πέψη ή υδρόλυση ^{23, 24}.

Μέχρι και σήμερα η κρυσταλλική δομή της Ακτιβίνης Α δεν είναι διαθέσιμη στη βιβλιογραφία. Αρκετά στοιχεία για τη δομή της προκύπτουν από το σύμπλοκο Ακτιβίνης Α-υποδοχέα τύπου II (ActA-ActRIIB), από το οποίο φαίνεται (εικόνα 1) ότι η Ακτιβίνη υιοθετεί μια δομή σχήματος V ²⁵. Παρόλα αυτά μεταγενέστερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η δομή της μοιάζει περισσότερο με πεταλούδα ή ανοιχτή παλάμη. Οι ακτιβίνες Α και Β είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στα είδη. Η ομολογία ξεπερνά το 97%, συγκρίνοντας τις αλληλουχίες του ανθρώπινου γονιδιώματος με εκείνες θηλαστικών, μαρσιποφόρων, πτηνών και μονοτρημάτων ²⁶.



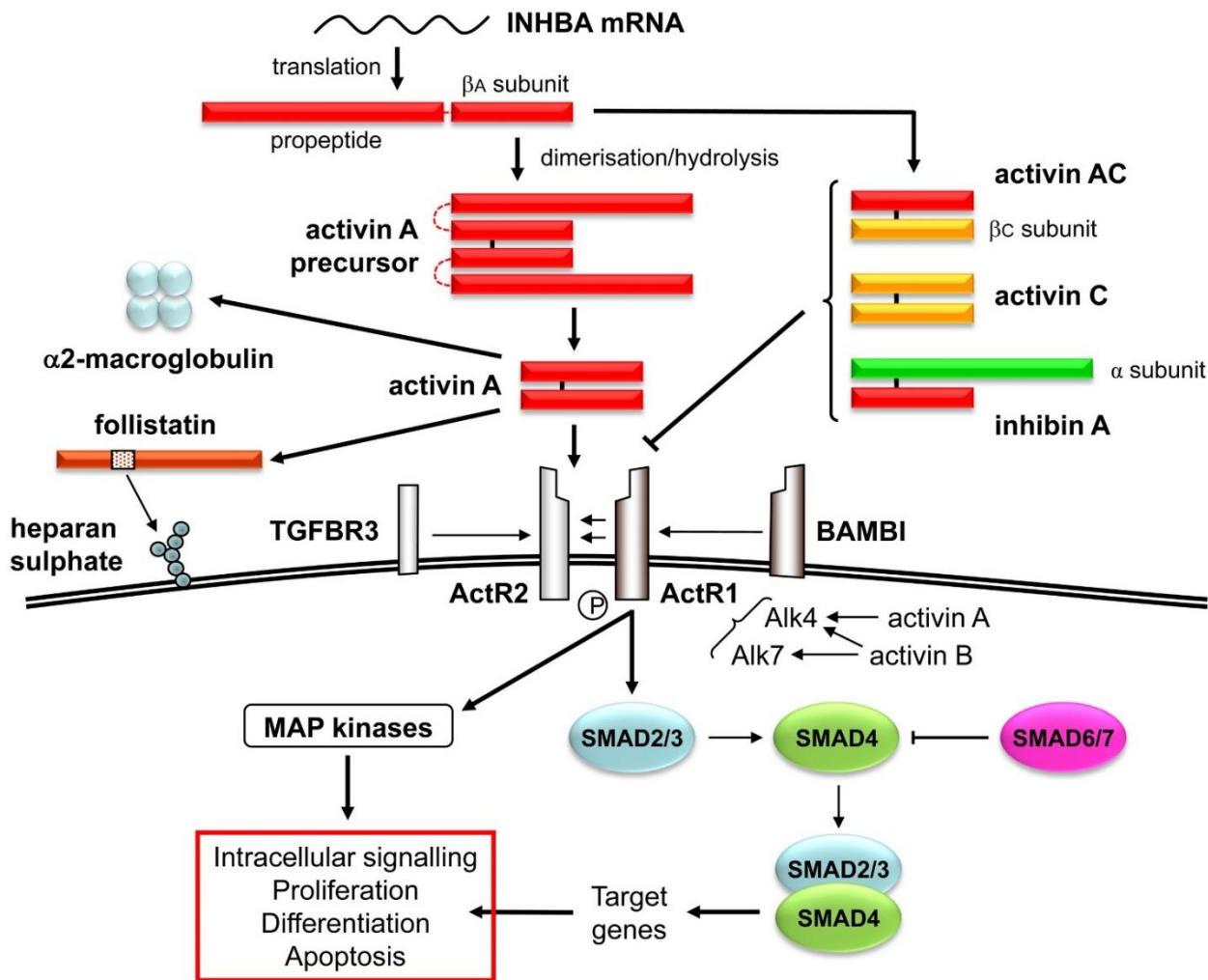
Εικόνα 1. Η δομή του συμπλόκου της Ακτιβίνης Α και του υποδοχέα ActRIIB (εξωκυττάριο τμήμα) ²⁵

1.1.4 Ακτιβίνη Α - Ρύθμιση της παραγωγής της

Οι ακτιβίνες Α και Β ανιχνεύονται στον ορό του αίματος ^{27, 28}, αλλά είναι εξαιρετικά δύσκολο να ανιχνευθεί η πηγή προέλευσής τους. Τα γονίδιά τους εκφράζονται στην πλειοψηφία των ιστών, ενώ μεγαλύτερη ποσότητα mRNA ανιχνεύεται στο αναπαραγωγικό σύστημα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ, το μυελό των οστών, την καρδιά και το λιπώδη ιστό ^{29, 30}.

Είναι αρκετά ξεκάθαρο ότι η έκφραση των γονιδίων της Ακτιβίνης Α επάγεται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις φλεγμονής και ανοσοβιολογικής απόκρισης. Η μεταγραφή του γονιδίου της βΑ υπομονάδας ενεργοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (stress/inflammatory JUN/FOS transcription factor), αλλά και τους παράγοντες c-MAF και NFAT, οι οποίοι εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ³¹. Η παρουσία στον υποκινητή του γονιδίου πολλαπλών στοιχείων απόκρισης σε φορβολικούς εστέρες (phorbol esters), υποδηλώνει ότι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης ³². Επομένως, η έκφραση της Ακτιβίνης Α επάγεται από μόρια-διαμεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως η ιντερλευκίνη-1, και από προσδέτες του υποδοχέα Toll (TLR), όπως ο LPS και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), μέσω σηματοδότησης MyD88/TRAF και MAP κινασών ³³.

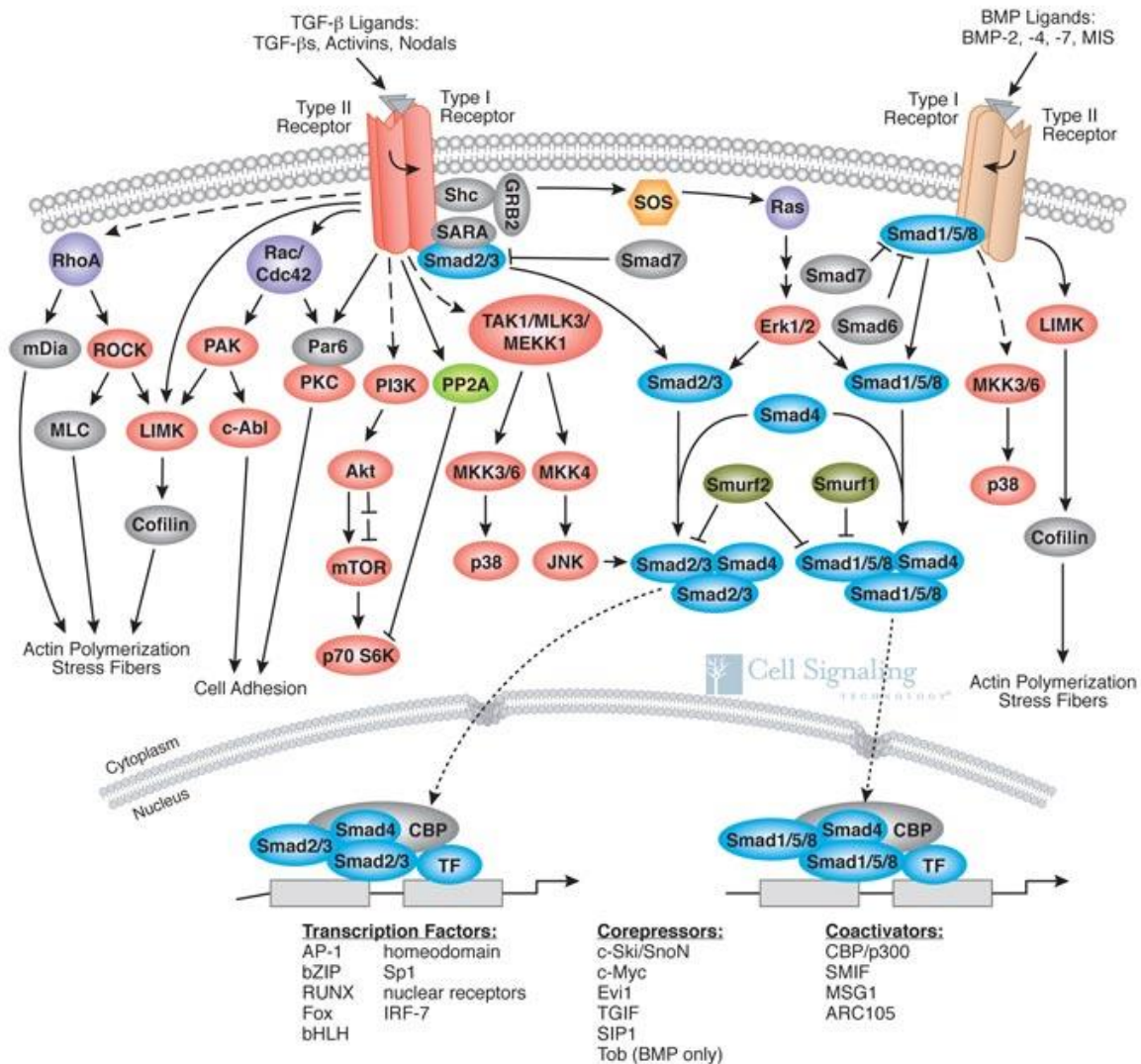
Παρότι η ρύθμιση της έκφρασης της Ακτιβίνης σε γονιδιακό επίπεδο είναι αρκετά αποσαφηνισμένη, ο έλεγχος της σύνθεσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, ο ομο- ή ετεροδιμερισμός, η ωρίμανση αλλά και η έκκριση της πρωτεΐνης, δεν είναι γνωστά. Μετά τη σύνθεσή της, η Ακτιβίνη Α αποθηκεύεται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα κύτταρα του μυελού των οστών ή τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπαραγωγικού ηθμού TRACT των ανδρών. Βασικός σταθμός ελέγχου της δράσης της θα πρέπει να αποτελεί η έκκριση από αυτά τα κύτταρα, κάτι που παραμένει εν πολλοίς άγνωστο. Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται μια γενική επισκόπηση της ρύθμισης παραγωγής και σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α.



Εικόνα 2. Παραγωγή και ρύθμιση της Ακτιβίνης Α. Η Ακτιβίνη Α είναι ομοδιμερές των βA υπομονάδων της ινχιμπίνης που κωδικοποιούνται από το γονίδιο INHBA. Η πρόσδεση της Ακτιβίνης στους υποδοχείς τύπου II και I πυροδοτεί σηματοδοτικά μονοπάτια με κεντρικούς ρυθμιστές τις πρωτεΐνες SMADs, και τις MAP κινάσες ρυθμίζοντας πολλές βιολογικές διεργασίες. Η δραστηριότητα της Ακτιβίνης μπορεί να ρυθμίζεται από την ταυτόχρονη παραγωγή των υπομονάδων που σχηματίζουν μη λειτουργικά ετεροδιμερή (ινχιμπίνη, Ακτιβίνη AC και Ακτιβίνη C), που ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στους υποδοχείς. Η δραστηριότητα της Ακτιβίνης ρυθμίζεται εξωκυττάρια και από την παρουσία της πρωτεΐνης φολλιστατίνης. Η ρύθμιση σε επίπεδο υποδοχέων περιλαμβάνει τους συν-υποδοχείς TGFBR3 και BAMBI.

1.1.5 Μεταγωγή του σήματος

Οι μηχανισμοί μεταγωγής του σήματος είναι υψηλά συντηρημένοι σε όλη την υπεριοικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF- β , με κεντρικούς ρυθμιστές τους υποδοχείς των προσδετών και τις πρωτεΐνες SMADs (SMAD Anchor for receptor activation). Σχηματικά, η ροή της πληροφορίας από την μεμβράνη στον πυρήνα, που απεικονίζεται στην εικόνα 3, έχει ως εξής: η σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα τύπου II ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I, ο οποίος φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το C-τελικό άκρο των SMAD πρωτεϊνών. Ακολουθεί αποσύνδεση των ενεργοποιημένων SMAD από τον υποδοχέα που εν συνεχεία σχηματίζουν ενδοκυττάρια σύμπλοκα με την SMAD4 και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου και ασκούν τον μεταγραφικό τους ρόλο.



Εικόνα 3. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της υπεριοικογένειας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF- β

1.1.5.1 Υποδοχείς

Παρόμοια με τους προσδέτες TGF- β και BMPs, η Ακτιβίνη χρησιμοποιεί 2 τύπους μεμβρανικών υποδοχέων, τύπου I και II. Και οι δύο τύποι υποδοχέων είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, με ικανότητα πρόσδεσης της Ακτιβίνης στο εξωκυττάριο τμήμα τους (πλούσιο σε κυστεΐνες), και δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης στο εσωκυττάριο. Οι υποδοχείς τύπου II, ActRIIA και ActRIIB, προσδένουν την Ακτιβίνη απουσία του υποδοχέα τύπου I (ActRI ή ALK4), ενώ αντίθετα οι υποδοχείς τύπου I δεν έχουν αυτή τη δυνατότητα ^{34, 35}.

Η Ακτιβίνη συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη με 2 υποδοχείς τύπου II, οι οποίοι “στρατολογούν” 2 υποδοχείς τύπου I, δημιουργώντας ένα ισχυρό ετεροτετραμερές σύμπλοκο. Η πρόσδεση της Ακτιβίνης στον υποδοχέα ActRIIB επάγει την ενεργοποίησή του, ο οποίος ως κινάση σερίνης/θρεονίνης φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα ALK4. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στη ρυθμιστική περιοχή GS που είναι πλούσια σε σερίνες και γλυκίνες και βρίσκεται ανοδικά της καταλυτικής περιοχής (κινάση). Η περιοχή αυτή (GS) διαφοροποιεί τους υποδοχείς τύπου I από τους υποδοχείς τύπου II, και είναι υψηλά συντηρημένη σε όλους τους υποδοχείς τύπου I της οικογένειας του TGF- β . Η δομή της είναι έλικα-στροφή-έλικα, με τη στροφή να λειτουργεί ως σφήνα (wedge), που διατηρεί τον υποδοχέα στην ανενεργή μορφή του, ενώ η φωσφορυλίωση στη GS περιοχή παρέχει μια θέση σύνδεσης (docking site) για την πρόσβαση των πρωτεϊνών SMADs. Επομένως, ο ολιγομερισμός των υποδοχέων και η ενεργοποίησή τους οδηγεί στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SMAD 2 και 3, οι οποίες στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με τη SMAD4, σχηματίζοντας έναν σύνθετο μεταγραφικό παράγοντα που μετατοπίζεται στον πυρήνα ^{36, 37}.

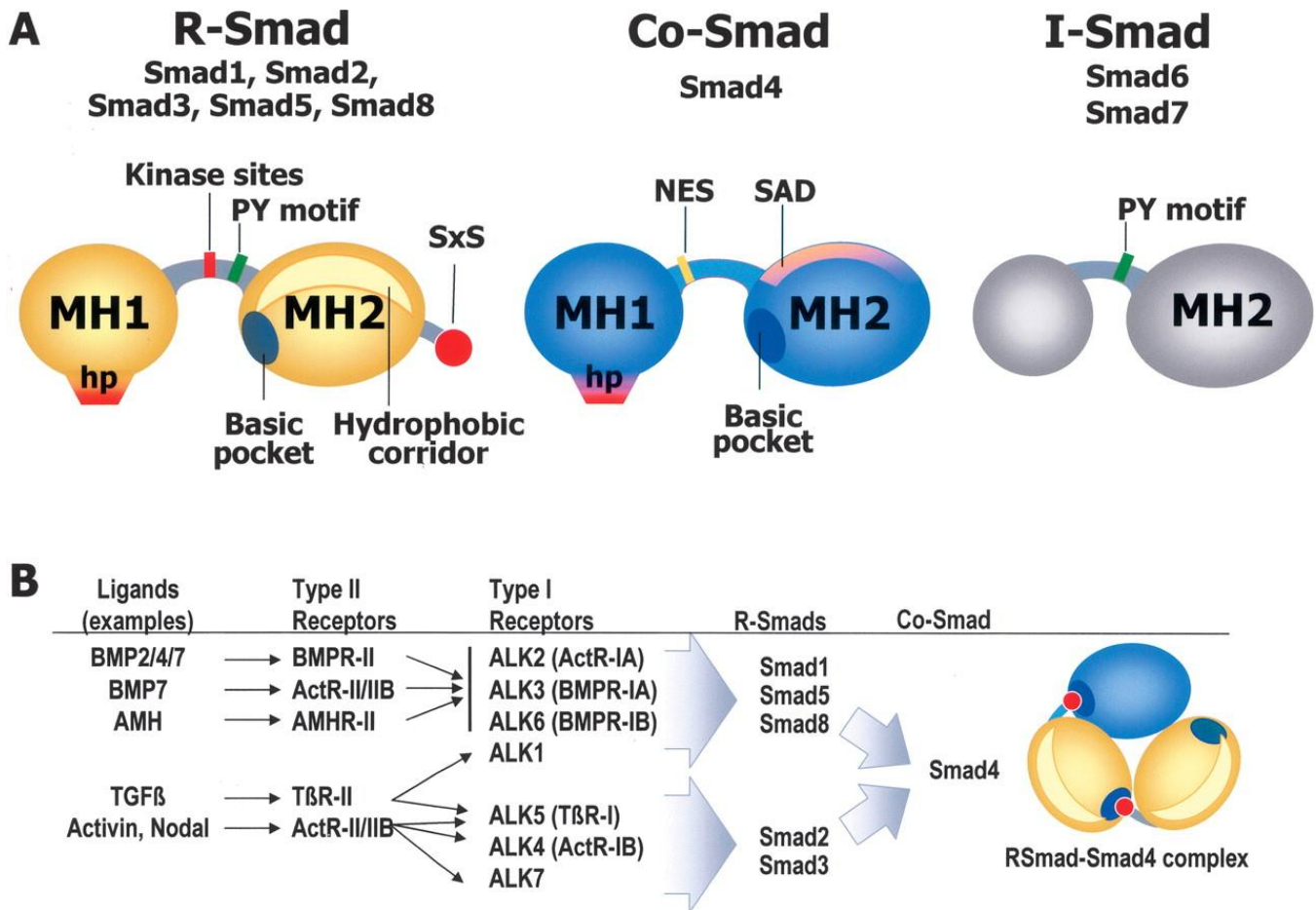
1.1.5.2 Διαμεσολαβητές

Οι πρωτεΐνες SMAD ανακαλύφθηκαν το 1995 ως διαμεσολαβητές της σηματοδότησης της οικογένειας του TGF- β ³⁸, με βάση το αναγνωρισμένο γονίδιο της δροσόφιλα Mad (Mothers against decapentaplegic), το οποίο και θεωρήθηκε απαραίτητο για την μεταγωγή του σήματος από την πρωτεΐνη Dpp (Decapentaplegic protein) ³⁹. Οι πρωτεΐνες SMAD διακρίνονται σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ανήκουν εκείνες που είναι άμεσα υποστρώματα για τους υποδοχείς της οικογένειας TGF- β (Receptor-activated SMADs, ή R-SMADs). Οι R-SMADs (SMAD2/3/1/5/8) είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και συσσωρεύονται στον πυρήνα όταν ενεργοποιηθούν για να δράσουν σαν μεταγραφικοί

παράγοντες. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από μία πρωτεΐνη, τη SMAD4 (Common mediator-SMAD), η οποία αναγνωρίζει και τις πέντε φωσφορυλιωμένες R-SMADs ώστε να συμπλεχθεί μαζί τους και να τις οδηγήσει στον πυρήνα. Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι SMAD6 και SMAD7 που αναστέλλουν τη δράση των R-SMAD και αναφέρονται ως αντί-SMADs (inhibitory SMADs). Ανάμεσα στις SMADs που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς, οι SMAD1, 5 και 8 μεταγουν σήματα από τις BMP πρωτεΐνες (Bone Morphogenic Proteins)^{40, 41}, ενώ οι SMAD2 και 3 μεταγουν σήματα από την Ακτιβίνη και τον TGF-β⁴².

Δομικά και λειτουργικά, οι SMAD πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές: την αμινοτελική περιοχή MH1, την καρβοξυτελική περιοχή MH2, οι οποίες είναι καλά συντηρημένες, καθώς και μία ενδιάμεση περιοχή (Linker region), η οποία μπορεί να είναι ποικίλου μεγέθους και αλληλουχίας (εικόνα 4). Δομική ανάλυση των R-SMADs έδειξε ότι η θηλειά 3 (L3) και η α έλικα 1 (H1) στην περιοχή MH2 παίζουν τον κύριο ρόλο στην σύνδεση των R-SMADs με τους υποδοχείς τύπου I^{43, 44}. Η σύνδεση υποδοχέων και R-SMAD πρωτεϊνών είναι καθοριστικό βήμα για την έναρξη της σηματοδότησης, και για τον λόγο αυτό η αναγνώριση των R-SMAD από τους υποδοχείς διευκολύνεται από την παρουσία άλλων βοηθητικών πρωτεϊνών.

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation), έγινε με βάση την ικανότητά της να συνδέεται με τις μη φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2 και SMAD3 πρωτεϊνών⁴⁵. Η SARA περιέχει μία περιοχή από οκτώ συντηρημένες κυστεΐνες οι οποίες περιβάλλουν δύο ιόντα ψευδαργύρου⁴⁶, και ονομάζεται περιοχή δακτύλου FYVE (FYVE finger domain), η οποία συνδέεται ειδικά σε PI(3)P⁴⁷. Η SARA περιέχει επίσης και μια ειδική περιοχή SBD (SMAD Binding Domain), η οποία συνδέεται με τις μη φωσφορυλιωμένες SMAD2 και SMAD3 και όχι με άλλα μέλη της οικογενείας των SMAD, στο καρβοξυτελικό άκρο (MH2 domain) των πρωτεϊνών αυτών. Το σύμπλοκο SARA-SMAD συνδέεται με τον υποδοχέα τύπου I μέσω του αμινοτελικού άκρου της SARA⁴⁵. Επομένως, ο ρόλος της SARA είναι να προσελκύσει τις SMAD πρωτεΐνες και να τις φέρει σε επαφή με τον υποδοχέα, ώστε να φωσφορυλιωθούν και να δημιουργήσουν σύμπλοκα με την SMAD4 για την επιτυχή μεταγωγή του σήματος.



Εικόνα 4. Οι πρωτεΐνες SMADs και οι δομικές περιοχές τους. (Α) Οι SMADs αποτελούνται από 2 συντηρημένες περιοχές, τις MH1 και MH2 και μια συνδετική περιοχή. Στις R-SMADs και την Co-SMAD, SMAD4, η περιοχή MH1 περιέχει μια δομή φουρκέτας (hp) που προσδένεται στο DNA. Οι I-SMADs δεν διαθέτουν την περιοχή MH1. Η συνδετική περιοχή των R-SMADs περιλαμβάνει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης για τις MAPKs, CDKs, και άλλες κινάσες. Το μοτίβο PY εξυπηρετεί την αναγνώριση από τις λιγάσες ουβικιτίνης Smurfs. Οι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με τις R-SMADs μέσω της περιοχής MH2 (basic pocket). (Β) Αναφέρονται ενδεικτικά κάποιοι προσδέτες της οικογένειας του TGF-β και οι συνδυασμοί με τους 5 υποδοχείς τύπου II, τους 7 τύπου I, τις 5 R-SMADs, και τη μοναδική Co-SMAD. Το σχήμα δεξιά παρουσιάζει ένα ετερο-τριμερές, που αποτελείται από 2 R-SMADs και τη SMAD4 (μόνο οι MH2 περιοχές)

Δεν είναι παράξενο ότι, η φωσφορυλίωση των SMAD2 ή SMAD3 επάγει την αποσύνδεσή τους από την SARA και ότι τα σύμπλοκα SMAD2/SMAD3-SMAD4 με τα σύμπλοκα SMAD2/SMAD3-SARA δεν σχηματίζονται ποτέ ταυτόχρονα. Η SARA λοιπόν, είναι απαραίτητος διαμεσολαβητής για τη μεταγωγή

του σήματος από τον παράγοντα TGF- β γιατί προσελκύει τις SMAD πρωτεΐνες στις μεμβράνες που περιέχουν τον υποδοχέα.

Απουσία προσδέματος, οι R-SMADs απαντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η SMAD4 κατανέμεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων από τον προσδέτη, οι φωσφορυλιωμένες R-SMAD μετατοπίζονται στον πυρήνα.

1.1.5.3 Είσοδος και έξοδος από τον πυρήνα

Η μετατόπιση των πρωτεϊνών SMAD από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και πίσω ξανά στο κυτταρόπλασμα (shuttling) είναι μια αυστηρώς ελεγχόμενη διαδικασία. Η διάρκεια του σήματος ίσως εξαρτάται από το χρόνο που οι SMADs βρίσκονται στον πυρήνα⁴⁸. Η SMAD3 διαθέτει μια αλληλουχία που δρα ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization sequence, NLS) στην περιοχή MH1. Η φωσφορυλιωμένη SMAD3 αλληλεπιδρά με την ινπορτίνη- β 1 του πυρηνικού πόρου και εισέρχεται στον πυρήνα, μια διαδικασία εξαρτώμενη από τη GTPάση Ran^{49,50}. Αντίθετα, η SMAD2 μέσω της περιοχής MH2 αλληλεπιδρά με νουκλεοπορίνες που διαθέτουν τις επαναλήψεις FG (FG-repeat-containing nucleoporins), όπως π.χ. η CAN/Nup214. Η απευθείας σύνδεση με τον πυρηνικό πόρο οδηγεί τις R-SMADs σε μια συνεχή παλινδρόμηση, δημιουργώντας ένα δυναμικό ενεργής μεταφοράς ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η μεταφορά των R-SMADs φαίνεται να είναι καθοριστικό στάδιο για τη μεταγωγή του σήματος από τους TGF- β /Ακτιβίνη, καθώς η συνεχής παλινδρόμησης τους επιτρέπει τη διαρκή ανίχνευση της ενεργοποιημένης ή μη κατάστασης του υποδοχέα, εξασφαλίζοντας έτσι την αποτελεσματική λήξη της μεταγωγής του σήματος⁵¹.

Η επαγωγή από τους προσδέτες TGF- β /Ακτιβίνη προκαλεί τη μετατόπιση και της SMAD4 στον πυρήνα. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί^{52,53}, με τις πιο πρόσφατες έρευνες να δείχνουν ότι η ινπορτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετατόπιση τόσο των R-SMADs όσο και της SMAD4. Ο μηχανισμός εξόδου της SMAD2 από τον πυρήνα παραμένει άγνωστος. Η SMAD3 εξέρχεται του πυρήνα με τη βοήθεια της exportin4 και της GTPάσης Ran⁵⁴. Η έξοδος της SMAD4 διαμεσολαβείται από ένα σήμα εξόδου που εντοπίζεται στη συνδετική περιοχή της πρωτεΐνης, στην οποία προσδένεται η exportin1/CRM1^{52,55}.

1.1.5.4 Γονιδιακή Ρύθμιση

Αρχικά οι πρωτεΐνες SMADs θεωρήθηκαν ως οι βασικοί ρυθμιστές της μεταγραφής, λόγω της ικανότητάς τους να προσδένονται στο DNA. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η ρύθμιση της μεταγραφής γίνεται κυρίως μέσω της πρόσδεσης των SMADs με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η λίστα με αυτούς τους παράγοντες μεγαλώνει συνεχώς. Τα σύμπλοκα των SMAD πρωτεϊνών στον πυρήνα προσδένονται μη ισχυρά στην ακολουθία πρόσδεσης SBE (SMAD Binding Element) στο DNA ^{56, 57}. Η πιο κοινή ισομορφή της SMAD2 δεν προσδέεται σε SBEs, ενώ η SMAD3 αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GTCTG-3' (SBE). Γενικότερα, φαίνεται ότι η πρόσδεση των SMADs στη χρωματίνη εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA με μεγαλύτερη συγγένεια.

Από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA είναι η οικογένεια FAST ⁵⁸. Στο Xenopus, ο παράγοντας FAST-1 προσδέεται στο στοιχείο ανταπόκρισης στην Ακτιβίνη (ARE, Activin Responsive Element), στον υποκινητή των γονιδίων Mix2 ^{59, 60} και goosecoid ⁶¹. Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση και η αποσιώπηση της μεταγραφής αντίστοιχα. Ομόλογα του παράγοντα FAST έχουν βρεθεί στον άνθρωπο και στον ποντικό ^{61, 62}. Απουσία προσδέματος, ο παράγοντας FAST είναι συνεχώς προσδεμένος στις περιοχές ανταπόκρισης, αλλά μόνο παρουσία Ακτιβίνης ή TGF-β δημιουργεί σύμπλοκο με τις SMAD2 και SMAD4 και έχει την δυνατότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής ^{60, 63, 64}.

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι SMADs μπορούν να συνεργάζονται και με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος άλλων μονοπατιών, όπως οι αλληλουχίες AP1 που ενεργοποιούνται από τον ετεροδιμερισμό των c-Jun και c-Fos. Η υπερέκφραση της SMAD3 ενεργοποιεί πολλούς υποκινητές που περιέχουν σημεία AP1. Η SMAD3 μπορεί να συνδέεται άμεσα με την c-Jun και έμμεσα με την c-Fos μέσω της c-Jun ⁶⁵. Αναστολή της κινάσης Jun αναστέλλει και την TGF-β εξαρτώμενη ενεργοποίηση από τις περιοχές AP1 ⁶⁶. Η σύνδεση των SMADs με τις ενεργές c-Jun και c-Fos σηματοδότησε για πρώτη φορά την συνεργασία του SMAD μονοπατιού με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι οι SMAD3 και SMAD4 συνδέονται με τον μεταγραφικό παράγοντα ATF2, μια πρωτεΐνη έλικας-θηλειάς-έλικας με φερμουάρ λευκίνης (bHLH-Zip), η οποία προσδέεται σε περιοχές ανταπόκρισης του cAMP, που αποτελούν στόχο της κινάσης p38 ⁶⁶. Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας bHLH-Zip, ο TFE3, συνδέεται στο DNA μέσω του στοιχείου E (E-box

element). Σύνδεση των SMAD πρωτεϊνών έχει αναφερθεί και για την πρωτεΐνη του ιού πολυώματος PEBP2/CBF (Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2/Core Binding Factor) ⁶⁷.

Μετά τη πρόσδεση στο DNA, οι πρωτεΐνες SMADs στρατολογούν ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών, όπως η p300 και η CBP (CREB binding protein), προκαλώντας την έναρξη της μεταγραφής. Η σύνδεση των R-SMAD με την p300/CBP μπορεί να αυξήσει την μεταγραφική ικανότητα, προσελκύοντας συν-ενεργοποιητές όπως είναι ο MSG1 που συνδέεται στην SMAD4 ⁶⁸.

Η αρνητική ρύθμιση των πρωτεϊνών SMADs μέσω ουβικιτίνωσης αναφέρθηκε προηγουμένως. Πρόσφατα, έχει δειχθεί και η θετική ρύθμιση με ουβικιτίνωση σε έμβρυα ποντικού και κύτταρα θηλαστικών ⁶⁹. Τα πυρηνικά σύμπλοκα των πρωτεϊνών SMAD αλληλεπιδρούν με τη λιγάση ουβικιτίνης Arkadia, προκαλώντας την αποδόμηση των SMAD αποσιωποητών SKI και SNON ⁷⁰. Η πρωτεΐνη Arkadia επάγει την ουβικιτίνωση της ανασταλτικής SMAD7 ⁷¹, όμως παραμένει άγνωστο εάν αυτό συμβαίνει στο πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα.

1.1.5.5 Τερματισμός της σηματοδότησης - Αρνητική ρύθμιση

Ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη η Ακτιβίνη παρουσιάζει ενδοκρινή, αυτοκρινή και παρακρινή δράση ⁷². Η μετάδοση του σήματος από την Ακτιβίνη υποβάλλεται σε αυστηρά ελεγχόμενη ρύθμιση τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια (εικόνα 5). Εξωκυττάρια, η πρόσδεση στους υποδοχείς περιορίζεται από ανταγωνιστικές προσδένουσες πρωτεΐνες όπως η φολλιστατίνη. Η φολλιστατίνη είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία όταν προσδεθεί με την Ακτιβίνη την καθιστά σε μεγάλο βαθμό ανενεργή ⁷³. Επίσης η ινχιμπίνη, η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια, θεωρείται ισχυρός ανταγωνιστής της Ακτιβίνης ⁷⁴, καθώς προσδένεται στους υποδοχείς τύπου II εκτοπίζοντάς την από τη θέση πρόσδεσης. Η συγγένεια της ινχιμπίνης για τους υποδοχείς τύπου II είναι 10 φορές μικρότερη από εκείνη της Ακτιβίνης ⁷⁵.

Σε επίπεδο υποδοχέων υπάρχουν μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς της Ακτιβίνης, ρυθμίζοντας αρνητικά τη σηματοδότηση. Η διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη BAMBI (BMP and Activin membrane-bound inhibitor) λειτουργεί ως ψευδο-υποδοχέας, σχηματίζοντας σύμπλοκα με τους υποδοχείς τύπου I και II, ανεξάρτητα από τη παρουσία προσδέτη, αναστέλλοντας τη σηματοδότηση από τις BMPs, την Ακτιβίνη και τον TGF-β ⁷⁶. Οι πρωτεΐνες ARIP (Activin Receptor Interacting Proteins) αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα ActRIIA και τη

SMAD3, μέσω της PDZ περιοχής τους. Έχει δειχθεί ότι υπερέκφραση της ARIP1 σε νευρικά κύτταρα αναστέλλει τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης και την έναρξη της μεταγραφής από τη SMAD3 (Shoji 2000). Υπερέκφραση της ARIP2 μειώνει την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από τα κύτταρα της υπόφυσης και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από καρκινικούς όγκους του στήθους ^{77, 78}.

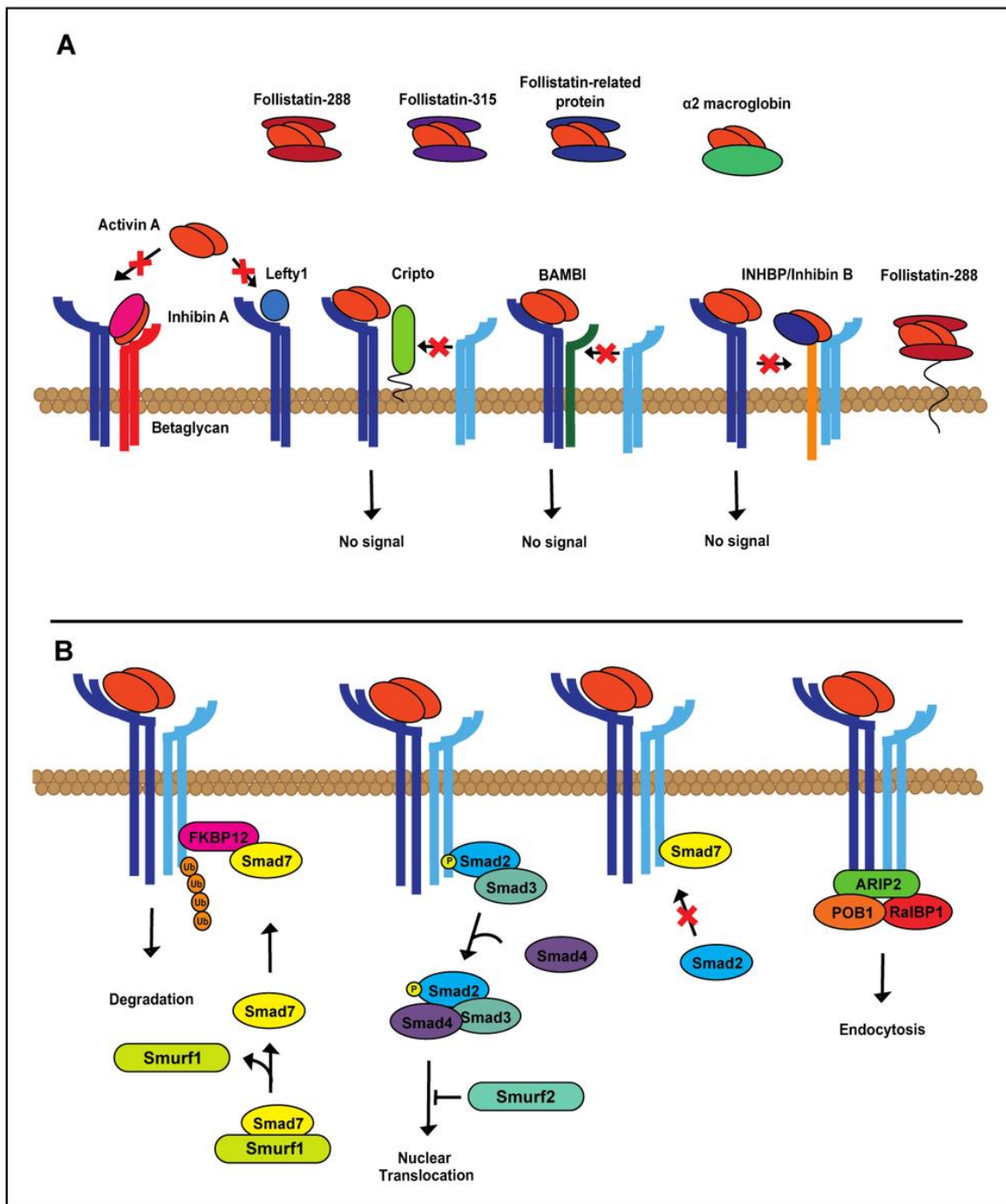
Εντός του κυττάρου η τρίτη κατηγορία των SMADs, οι I-SMADs (Inhibitory-SMADs) δρουν ανταγωνιστικά για την κατάργηση των σημάτων από την οικογένεια TGF-β. Δύο ανασταλτικές SMAD πρωτεΐνες, η SMAD6 και η SMAD7, έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα στα σπονδυλωτά ^{79, 80, 81, 82}. Η SMAD7 δρα ως γενικός αναστολέας της οικογένειας TGF-β, ενώ η SMAD6 αναστέλλει ειδικά τους παράγοντες BMPs ⁸³. Η ανασταλτική δράση της SMAD7 έγκειται στον ανταγωνισμό της με τις R-SMADs για την σύνδεση με τον υποδοχέα τύπου I ^{81, 84}. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι η SMAD7 μέσω της περιοχής PY (PY motif) συνδέεται με τις λιγάσες της ουβικιτίνης, Smurf1 και Smurf2. Το σύμπλοκο SMAD7/Smurf μεταφέρεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I και αναστέλλει την φωσφορυλίωση των R-SMADs ⁸⁵. Η Smurf1 επάγει την αποδόμηση των υποδοχέων μέσω του πρωτεοσωμικού και λυσοσωμικού μονοπατιού ⁸⁶.

Η ίδια η SMAD7 υφίσταται ουβικιτίνωση και αποδόμηση κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Ο κύκλος αυτός της αρνητικής ανάδρασης παρατείνεται, αφού ο παράγοντας TGF-β και οι BMPs μπορούν να ενεργοποιούν την SMAD7 σε μεταγραφικό επίπεδο εξασφαλίζοντας έτσι την συνεχή παραγωγή της πρωτεΐνης καθώς αυτή αποδομείται. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι δομικά μοτίβα στις πρωτεΐνες Smurf (WW μοτίβα) αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές στην ενδιάμεση περιοχή (linker region) των R-SMADs, πλούσιες σε προλίνες (PY μοτίβα) (86). Η αποδόμηση των R-SMADs από τις Smurfs ελαττώνει την ικανότητα της υπεροικογένειας TGF να μετάγει συγκεκριμένες κυτταρικές ανταποκρίσεις ⁸⁷. Διάφοροι μηχανισμοί, κυρίως μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, εμπλέκονται στον τερματισμό της σηματοδότησης από τις πρωτεΐνες SMAD. Σε μια πρόσφατη μελέτη, η πολυμεράση-1 PARP-1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1) φαίνεται να αλληλεπιδρά και να προσθέτει σάκχαρα ADP-ριβόζης στις SMAD3 και SMAD4 ⁸⁸. Αυτή η προσθήκη προκαλεί την αποδέσμευση των SMADs από το DNA, ελέγχοντας την ένταση και τη διάρκεια του σήματος. Ένας άλλος μηχανισμός είναι η αποφωσφορυλίωση των σερινών στο καρβοξυτελικό άκρο των SMAD πρωτεϊνών, από φωσφατάσες που έχουν ταυτοποιηθεί προσφάτως, όπως η PPM1A/PP2Ca ⁸⁹. Αντιστρόφως, οι ενδοκυττάριοι διάλυοι

χλωρίου (chloride intracellular channel 4, CLIC4) και ο μεταγραφικός παράγοντας Schnurri-2 αλληλεπιδρούν με τις φωσφορυλιωμένες SMAD2 και 3, αποτρέποντας την αποφωσφορυλίωσή τους ⁹⁰.

Η αποδόμηση των SMADs μετά από ουβικιτίνωση είναι πιθανό να οδηγεί στο τερματισμό της σηματοδότησης. Ο TGF-β επάγει τη φωσφορυλίωση των SMAD2 και 3 στη συνδετική περιοχή τους, από τις κινάσες CDK8 και CDK9 στο κυτταρόπλασμα, αλλά και από τη GSK3 στον πυρήνα ^{91, 92}. Αυτή η φωσφορυλίωση αρχικά επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση των SMADs και εν συνεχεία την ουβικιτίνωσή τους από τις Nedd4-2/Nedd4L και την αποδόμησή τους στο πρωτεόσωμα ⁹³.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες τονίζουν την σημασία ύπαρξης μοριακών μηχανισμών για την αυστηρή ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από την οικογένεια TGF-β σε όλα τα επίπεδα. Είναι σαφές ότι υπάρχουν και άλλοι ρυθμιστικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση των προσδετών της οικογένειας. Σε κάθε περίπτωση δεν πρέπει να παραβλέπουμε και την αλληλεπίδραση κάθε σηματοδοτικού μονοπατιού με άλλα ανταγωνιστικά μονοπάτια.

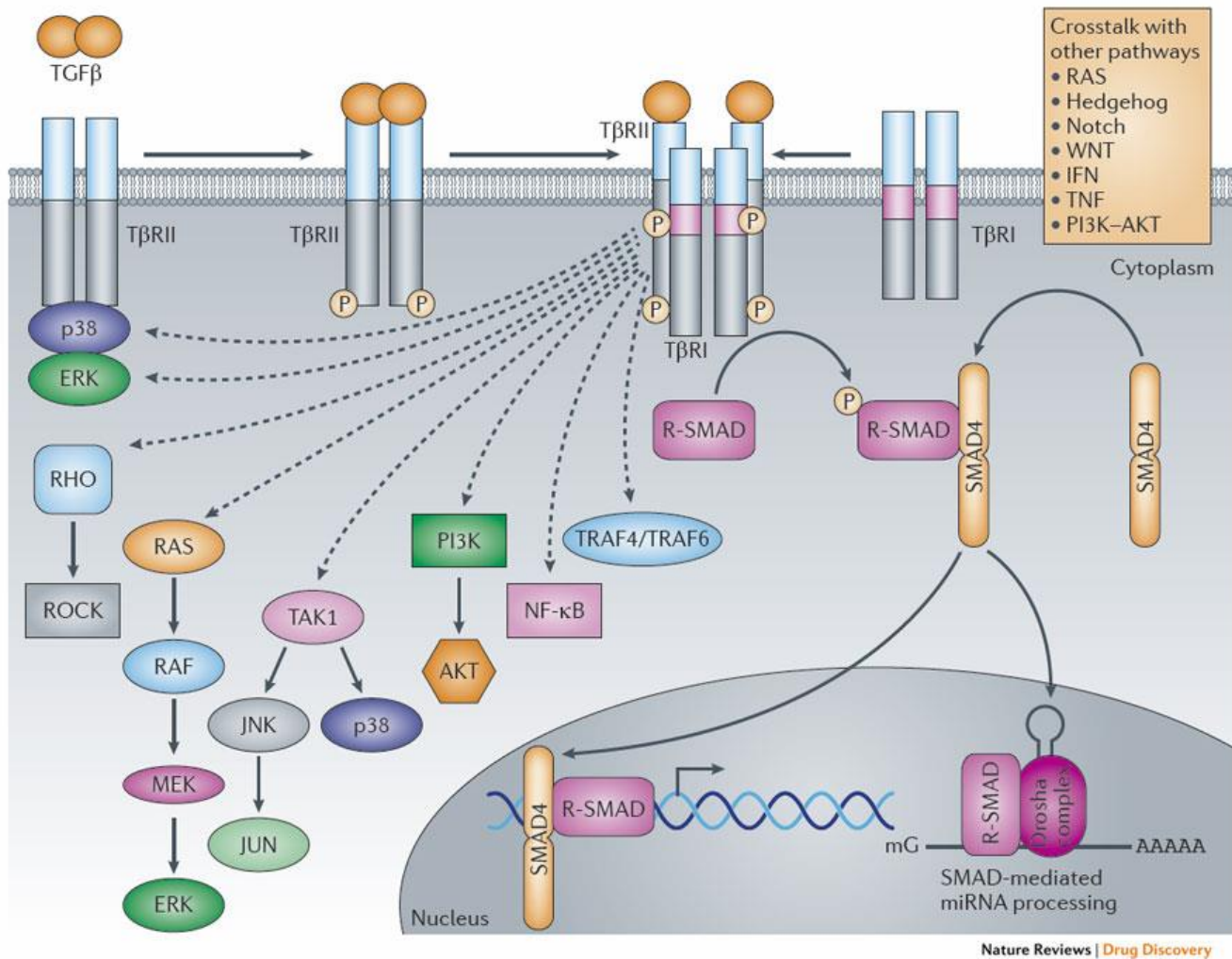


Εικόνα 5. Εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια ρύθμιση της σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α. (Α) Εξωκυττάρια, η δραστηριότητα της Ακτιβίνης ελέγχεται από πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, φολλιστατίνη-288 και-315, τη *follistatin-related protein*, την $\alpha 2$ -macroglobin, τον παράγοντα Lefty1 και την ινχιμπίνη, αλλά και πρωτεΐνες που προσδένονται στη μεμβράνη όπως οι Betaglycan, Cripto, BAMBI, INHBP/inhibin B και φολλιστατίνη-288. (Β) Στο κυτταρόπλασμα το μονοπάτι που διαμεσολαβείται από τις SMADs, υφίσταται έλεγχο σε κάθε βήμα

1.1.5.6 Μεταγωγή σήματος από την Ακτιβίνη Α, ανεξάρτητη από τους διαμεσολαβητές SMADs

Το μονοπάτι σηματοδότησης των TGF-β/Ακτιβίνης με διαμεσολαβητές τις πρωτεΐνες SMAD είναι μελετημένο εκτενώς, και θεωρείται δικαίως το κεντρικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος της οικογένειας του TGF-β. Τα τελευταία χρόνια, πειραματικά δεδομένα βιοχημείας και αναπτυξιακής βιολογίας υποστηρίζουν την ύπαρξη εναλλακτικών μονοπατιών σηματοδότησης· τα μη εξαρτώμενα από τις SMADs μονοπάτια. Οι υποδοχείς TGF-β έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, εκτός των SMADs, και να μετάγουν παράλληλα σήματα, τα οποία δρουν συνεργιστικά. Δεδομένα από πειράματα *in vitro* δείχνουν ότι πρωτεΐνες όπως η GTPάση Ras, οι κινάσες MAPKs, ERKs, p38, και οι JNKs εμπλέκονται στη σηματοδότηση του TGF-β. Η Ακτιβίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό της επιδερμίδας, μια διαδικασία που απαιτεί την εναρμονισμένη κίνηση των επιθηλιακών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι το μονοπάτι MEKK1-JNK είναι απαραίτητο για το σχηματισμό και το «κλείσιμο» του βλεφάρου στα θηλαστικά. Ο TGF-β και η Ακτιβίνη το ενεργοποιούν, ανεξάρτητα από τη SMAD4, με σκοπό τη σωστή κίνηση των επιθηλιακών κυττάρων κατά τη δημιουργία του βλεφάρου.

Επιπρόσθετα η Ακτιβίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p38 και αναστέλλει τις ERK1/2 σε κύτταρα K562. Στα κερατινοκύτταρα, η επαγωγή με Ακτιβίνη οδηγεί σε φωσφορυλίωση των JNK και c-Jun, η οποία εξαρτάται από τις MEKK1 και RhoA αντίστοιχα. Επίσης, έχει προταθεί ότι η Dok-1, μια Ras GAP-προσδεσμένη πρωτεΐνη-στόχος των κινασών Src and Abl, είναι διαμεσολαβητής της σηματοδότησης της Ακτιβίνης, καθώς προσδένεται στους υποδοχείς ActRIIA and ALK4. Αν και δεν έχει αποδειχθεί πλήρως, φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση της Dok-1 και η μεταγωγή του σήματος καθοδικά στις GTPάσες, γίνονται ανεξάρτητα από τις SMADs ^{94, 95, 96}.



Εικόνα 6. Μεταγωγή σήματος από τον TGF-β ανεξάρτητη από τις πρωτεΐνες SMADs.

Στο μη κανονικό μονοπάτι, όπως ονομάζεται εναλλακτικά (*non-SMAD/non-canonical*), οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς του TGF-β μεταγουν τα σήματα μέσω άλλων παραγόντων όπως ο TRAF4 (*TNF receptor associated factor 4*) ή ο TRAF6, η κινάση TAK1 (*TGF-β-activated kinase 1*), η κινάση p38MAPK, η πρωτεΐνη RHO, οι κινάσες AKT και ERK, η κινάση JNK (*JUN N-terminal kinase*) και ο παράγοντας NF-κB (*nuclear factor-κB*). Η σηματοδότηση του TGF-β επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτά των WNT, Hedgehog, Notch, ιντερφερόνης (IFN), RAS, και του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF)

1.2 Η πολυδιάστατη υπεροικογένεια TGF-β. Ο ρόλος της Ακτιβίνης Α σε θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες

1.2.1 Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού

Έχει δειχθεί ότι η Ακτιβίνη έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα επιθηλιακά, τα λεμφοκύτταρα, τα επινεφριδιακά του εμβρύου, και τα καρκινικά με προέλευση καρκινικούς όγκους του προστάτη, του στήθους, της υπόφυσης, της ουροδόχου κύστης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η Ακτιβίνη προάγει την αντιπολλαπλασιαστική της δράση δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την οικογένεια TGF-β/Ακτιβίνης έχει συνδεθεί με την ρύθμιση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKIs, Cyclin-dependent Kinase Inhibitors) p15(Ink4B), p21(Cip1) και p27(Kip1) ⁹⁷. Η περιορισμένη γνώση προέρχεται κυρίως από μελέτες στα καρκινικά κύτταρα προστάτη LNCaP, στα ηπατικά κύτταρα HepG2 και στα Β-λεμφοκύτταρα ποντικού HS-72. Για παράδειγμα, στα τελευταία, η Ακτιβίνη επάγει την έκφραση του αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p21Cip1/WAF1, αναστέλλοντας την έκφραση της κυκλίνης D2, γεγονός το οποίο οδηγεί στη μειωμένη δράση της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης Cdk4 και κατά συνέπεια στη συσσώρευση υποφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Rb (Retinoblastoma). Έτσι προκαλείται παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ⁹⁸.

Είναι γνωστό ότι ο TGF-β έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης (5). Πολλοί καρκινικοί τύποι «ξεφεύγουν» από αυτή τη δράση, λόγω μεταλλάξεων που συσσωρεύονται, και καθιστούν τα κύτταρα μη ανταποκρίσιμα στον TGF-β (6) ⁹⁹. Μεταλλάξεις στους υποδοχείς τύπου II και στη SMAD4 είναι συνήθεις σε επιθηλιακούς όγκους του εντέρου και του παγκρέατος ⁹⁹. Είναι πιθανό, ορισμένοι καρκινικοί τύποι να μην ανταποκρίνονται στους αντιπολλαπλασιαστικούς μηχανισμούς που επάγονται από την Ακτιβίνη. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του ActR-IB έχουν ταυτοποιηθεί σε όγκους του παγκρέατος ^{100, 101}.

1.2.2 Απόπτωση

Η Ακτιβίνη επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε αρκετές κυτταρικές σειρές, μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών. Σε ηπατικά κύτταρα HepG2 η επαγόμενη από την Ακτιβίνη απόπτωση, αποτρέπει με υπερέκφραση της συνεχώς ανενεργού μορφής του ActR-IIIB ή της SMAD2, ενώ αντίθετα

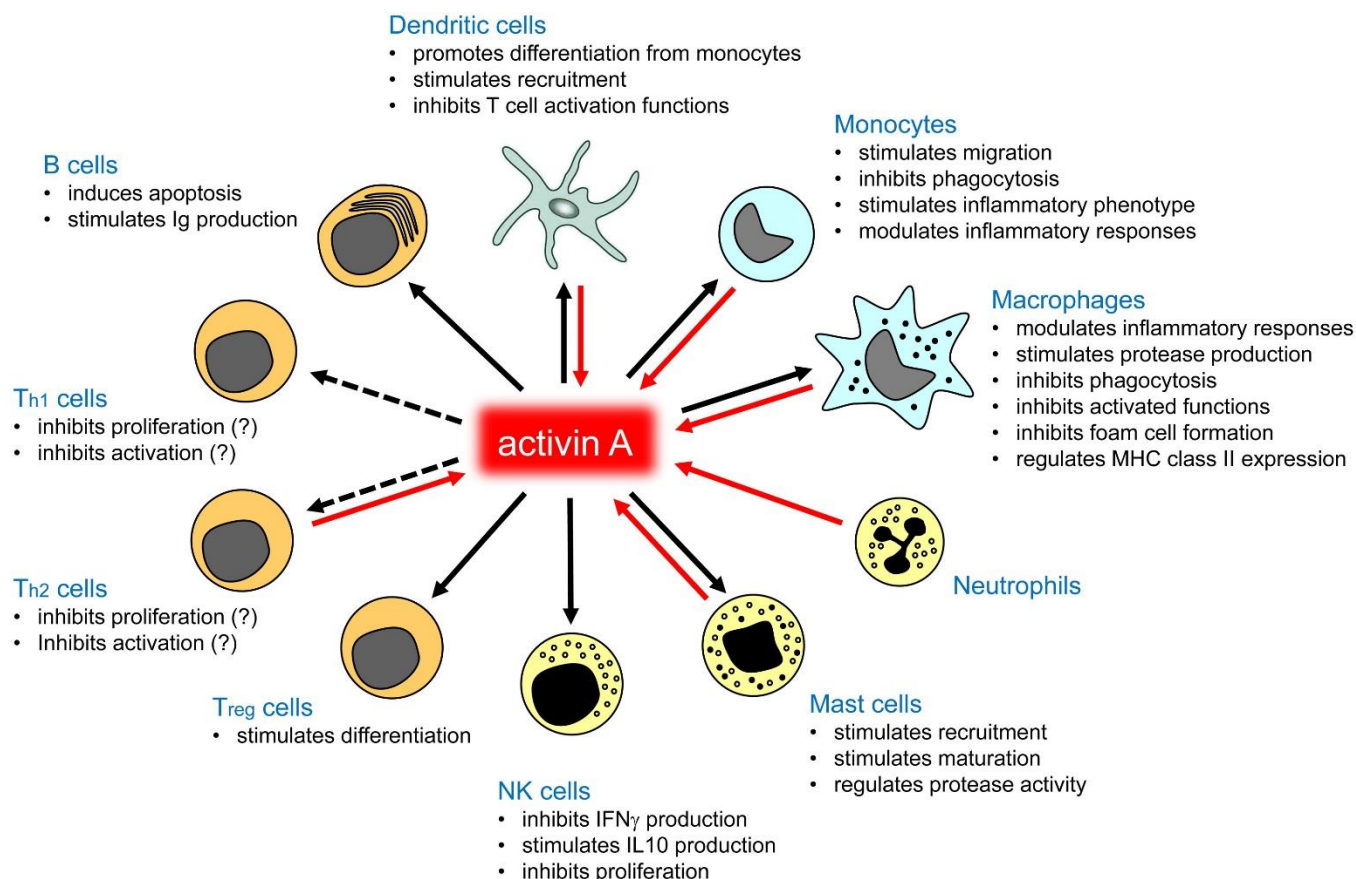
υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης εκ των ActR-IB, ActR-IIB, SMAD2 ή SMAD4 αρκεί για να ενεργοποιήσει την απόπτωση, απουσία Ακτιβίνης. Και σε αυτή τη διαδικασία είναι φανερό ότι τόσο οι υποδοχείς όσο και οι πρωτεΐνες SMAD διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο. Σε μία μελέτη του Zauberman και των συνεργατών του σε κύτταρα HepG2, παρουσία Ακτιβίνης, υποφωσφορυλιώνεται η Rb, υπερεκφράζεται η p21 από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και προκαλείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ¹⁰².

Μελέτες που έγιναν σε Β λεμφοκύτταρα ποντικού δείχνουν ότι η Ακτιβίνη επάγει την απόπτωση μέσω περιορισμού της δραστηριότητας της πρωτεΐνης bcl-2 ¹⁰³. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής στα Β λεμφοκύτταρα περιορίζει δραματικά την επαγόμενη από Ακτιβίνη απόπτωση. Επιπρόσθετες έρευνες αποδεικνύουν ότι η απόπτωση που επάγεται από την Ακτιβίνη, διαμεσολαβείται από τη κινάση PKC, καθώς η χρήση του αναστολέα της PKC, H7, παρεμποδίζει την απόπτωση. Στα κύτταρα χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας KU812 η Ακτιβίνη αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης Bax, που προκαλεί καταστολή της Bcl-2, ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 9, με συνέπεια τον κατακερματισμό του DNA ¹⁰⁴.

1.2.3. Ακτιβίνη Α και ανοσοποιητικό σύστημα

Με βάση τις πρώτες μελέτες γίνεται σαφές ότι η Ακτιβίνη Α συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο στον μυελό των οστών όσο και στο θύμο αδέν (εικόνα 6). Επίσης, είναι ένας παράγοντας διαφοροποίησης των ολιγοδύναμων πρόδρομων κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος, και ειδικότερα των ερυθρών σειρών του αίματος ^{10, 105}. Όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα η Ακτιβίνη φαίνεται να έχει διττό ρόλο. Κατά τη φυσιολογική ανοσοβιολογική απόκριση μεταδίδει ανοσοδιεγερτικά μηνύματα για την αντιμετώπιση του ξένου παράγοντα και κυρίως των ιογενών λοιμώξεων. Αντίθετα, κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης μετáγει ανοσοκατασταλτικά μηνύματα, συμβάλλοντας στη δημιουργία κατάλληλου ογκογόνου μικροπεριβάλλοντος. Για παράδειγμα, η Ακτιβίνη προάγει τη μετατροπή των CD4+CD25-Foxp3- (Foxp3: forkhead box P3) Τ λεμφοκυττάρων σε CD4+CD25+Foxp3+ Τ-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα οποία προκαλούν ανοσοκαταστολή σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ^{106, 107, 108}. Τα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα μειώνουν την δράση των βοηθητικών Th1, Th2 and T-17, περιορίζοντας την

ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα ¹⁰⁹. Επιπλέον, η Ακτιβίνη έχει σύνθετες επιδράσεις στη λειτουργία των μακροφάγων.



Εικόνα 6. Οι δράσεις της Ακτιβίνης A στο ανοσοποιητικό σύστημα. Παρουσιάζονται οι κυτταρικοί τύποι που παράγουν και δέχονται μηνύματα από την Ακτιβίνη

Τα δενδριτικά κύτταρα παράγουν Ακτιβίνη A, η οποία διατηρεί τον αντιγονοειδικό πολλαπλασιασμό των CD8+ T λεμφοκυττάρων in vitro ³³. Η Ακτιβίνη παράγεται και από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα ποντικού (Th2), κι επάγει τη δημιουργία φαινοτύπου M2 στα μακροφάγα (υψηλή παραγωγή IL-10 και TGF- β , χαμηλή IL-12), που σχετίζεται με την επούλωση τραυμάτων αλλά και την καρκινογένεση ¹⁰⁹. Τέλος, η Ακτιβίνη A αναστέλλει ενώ η φολλιστατίνη προάγει τη μετατροπή των μακροφάγων σε «αφρώδη» κύτταρα (macrophage foam cell), που συσσωρεύουν χοληστερόλη και επικάθονται στα τοιχώματα των αγγείων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών ¹¹⁰. Συμπερασματικά λοιπόν, θα λέγαμε ότι η Ακτιβίνη είναι μια σημαντική κυτταροκίνη για τη λειτουργία του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος.

1.2.4. Επούλωση τραύματος και Αναγέννηση Ιστών

Η επούλωση ενός τραύματος είναι μια πολύπλοκη και αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία. Αρχικά, στην τραυματισμένη περιοχή εκκρίνονται αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες. Τα τραυματισμένα αγγεία δημιουργούν μικρούς θρόμβους με την εναπόθεση πρωτεϊνών, όπως η φιβρονεκτίνη και το κολλαγόνο. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ινοβλάστες προσελκύονται στην τραυματισμένη περιοχή, καθαρίζοντάς την από νεκρά στοιχεία και στη συνέχεια αναδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Όλα τα κύτταρα που συμμετέχουν πρέπει να έχουν την ικανότητα να επάγουν την κυτταρική μετακίνηση, την αντικατάσταση και την ανάπλαση του ιστού. Η Ακτιβίνη Α θεωρείται καθοριστικός παράγοντας σε αυτή τη διαδικασία. Στο zebrafish, η αναστολή της μεταγωγής του σήματος της Ακτιβίνης παρεμποδίζει την αναγέννηση του ιστού μετά από τραυματισμό ^{111, 112}. Ομοίως στον ποντικό, η διαθεσιμότητα της Ακτιβίνης Α, φαίνεται να καθορίζει την αντίδραση μετά τον τραυματισμό ¹¹¹. Τα επίπεδα της Ακτιβίνης ανεβαίνουν άμεσα με την πρόκληση του τραύματος, κάτι που θεωρείται αποτέλεσμα της φλεγμονώδους αντίδρασης ¹¹³. Όσον αφορά την επούλωση του τραύματος και ο TGF- β εμφανίζει παρόμοιες λειτουργίες, καθώς μπορεί να προσελκύει μακροφάγα και ινοβλάστες και φυσικά να επάγει την αγγειογένεση.

1.2.5. Ακτιβίνη Α και καρκινογένεση

Ο επιστήμονας Harold Dvorak περιέγραψε τον καρκίνο ως “μια πληγή που ποτέ δεν κλείνει”. Η Ακτιβίνη Α και ο TGF- β είναι εξαιρετικά παραδείγματα αυτού του φαινομένου, καθώς εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες κατά την ανάπτυξη και την επούλωση τραυμάτων, αντίστοιχες με εκείνες που εμφανίζουν στην καρκινογένεση. Και οι δύο αυξητικοί παράγοντες διαδραματίζουν εξειδικευμένους ρόλους στο μικροπεριβάλλον των όγκων, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό.

1.2.5.1. Επιθηλιακοί όγκοι

Ο ρόλος της Ακτιβίνης έχει διερευνηθεί σε αρκετούς επιθηλιακούς όγκους, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Έχει δειχθεί ότι η Ακτιβίνη Α μπορεί να εμφανίζει μια προστατευτική δράση στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης. Πειράματα με τη χρήση κυττάρων καρκίνου του προστάτη και μη μεταστατικών κυττάρων LNCaP, δείχνουν ότι η Ακτιβίνη Α σταματά τον κυτταρικό κύκλο και επομένως τον πολλαπλασιασμό ^{114, 115, 116}. Τα κύτταρα LNCaP δεν ανταποκρίνονται όταν τους χορηγείται TGF- β .

Μια *in vitro* μελέτη σε 15 κυτταρικές σειρές από νεοπλάσματα του μαστού, δείχνει ότι μόνο οι 4 εκφράζουν ακτιβίνη A. Η *in vitro* επώαση με Ακτιβίνη A, είχε ως αποτέλεσμα στα κύτταρα T47D τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την αύξηση της απόπτωσης ¹¹⁷. Τέλος, στο μικροπεριβάλλον του όγκου κύτταρα όπως τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και οι ινοβλάστες αυξάνουν την έκφραση της Ακτιβίνης σε μια προσπάθεια να περιορίσουν την ανάπτυξη του όγκου. Πάραυτα, τα καρκινικά κύτταρα σταδιακά προσαρμόζονται και δεν ανταποκρίνονται σε τέτοια μηνύματα ^{118, 119}.

Αντίθετα, η Ακτιβίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3, μιας πιο επιθετικής σειράς καρκίνου του προστάτη ¹²⁰. Πρόσφατα δεδομένα εμπλέκουν την ενδογλίνη, έναν υποδοχέα TGF-β τύπου III, στη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη μέσω της επαγόμενης από την Ακτιβίνη A σηματοδότησης ¹²¹. Επιπρόσθετα, ο TGF-β εμφανίζει ογκοδιεγερτική δράση στα κύτταρα PC3, όπως και στα κύτταρα καρκίνου του μαστού MDA-MB-231. Η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού MAPK/TRAF6, προκαλεί τον προ-μεταστατικό φαινότυπο των κυττάρων αυτών ¹²². Σε αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και σε στοματικές νεοπλασίες πλακωδών κυττάρων, η έκφραση της Ακτιβίνης σχετίζεται με την επαγωγή επιθετικού, μεταστατικού φαινοτύπου, που οδηγεί στη δημιουργία μεταστάσεων στους λεμφαδένες και κακή πρόγνωση των ασθενών ^{123, 124}. Η έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνης MMP-7, που αποδομεί πολλά συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ενεργοποιεί άλλες MMPs, προωθώντας με τον τρόπο αυτό την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων, αυξάνεται σημαντικά παρουσία Ακτιβίνης A ¹²⁵. Αυτό συμβαίνει μέσω της δραστηριότητας των c-Jun/SMAD και του υποκινητή AP-1 ¹²⁶.

1.2.5.2. Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες στο μικροπεριβάλλον του νεοπλάσματος συμβάλουν στη μετατροπή του φυσιολογικού στρώματος σε «αντιδραστικό» στρώμα. Το στρώμα αυτό χαρακτηρίζεται από διαφορετική σύσταση εξωκυττάριας ουσίας με αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα και την παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων και ινοβλαστών, οι οποίοι έχουν αποκτήσει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά λείων μυϊκών κυττάρων και αποκαλούνται μυοϊνοβλάστες ¹¹⁹. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ινοβλάστες εκφράζουν Ακτιβίνη A σε αμελητέες ποσότητες. Η Ακτιβίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών του πνεύμονα και των λείων μυϊκών κυττάρων της αναπνευστικής οδού. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι οι φυσιολογικοί ινοβλάστες του οισοφάγου σε ένα προ-νεοπλασματικό περιβάλλον υπερεκφράζουν

Ακτιβίνη Α, παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό με αυτοκρινικό και παρακρινικό τρόπο. Όταν όμως συνυπάρχουν καρκινικά κύτταρα η Ακτιβίνη Α προάγει την ανάπτυξη της κακοήθειας^{127, 128, 129}.

Οι μυοϊνοβλάστες του στρώματος από πλακώδες καρκίνωμα του στόματος αυξάνουν την έκκριση της Ακτιβίνης Α, κάτι που σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή και έκκριση κολλαγόνου τύπου Ι, μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1, MMP-2, MMP-9 και MMP-13, καθώς επίσης με αυξημένο πολλαπλασιασμό και μεγαλύτερο όγκο του νεοπλάσματος^{130, 131}. Επιπρόσθετα, οι μυοϊνοβλάστες εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και πρωτεάσες προκειμένου να επάγουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την ενδοθηλιακή- και επιθηλιακή-μεσεγγυματική μεταδιαφοροποίηση (EMT) των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων αντίστοιχα¹³². Τέλος, οι μυοϊνοβλάστες προσελκύουν ανοσοκατασταλικά κύτταρα στα όρια καρκίνου-στρώματος¹²¹. Όλα τα δεδομένα συγκλίνουν ότι τα κύτταρα αυτά συντελούν στη διαμόρφωση ενός μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί την ανάπτυξη επιθηλιακών καρκινωμάτων, μεταβάλλοντας τα χαρακτηριστικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η παρουσία τους στο στρώμα των νεοπλασμάτων σχετίζεται με επιθετικό, μεταστατικό φαινότυπο και κακή πρόγνωση για τους ασθενείς^{133, 134, 135}.

1.2.5.3. Ενδοθηλιακά κύτταρα-Αγγειογένεση

Με βάση αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα, η Ακτιβίνη Α θεωρείται ένας αντιαγγειογενετικός παράγοντας. Επώση ενδοθηλιακών κυττάρων με Ακτιβίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους και περιορίζει το σχηματισμό αγγείων, μέσω ενεργοποίησης της p21 και μειωμένης έκφρασης της κυκλίνης D1 και της Rb^{136, 137}. Τα περισσότερα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς ActRII/IIIB κι έτσι ανταποκρίνονται στα επαγόμενα από την Ακτιβίνη μηνύματα. Στην *in vivo* δοκιμασία αγγειογένεσης, στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσού όρνιθας, η Ακτιβίνη αναστέλλει την δημιουργία αγγείων^{16, 17}.

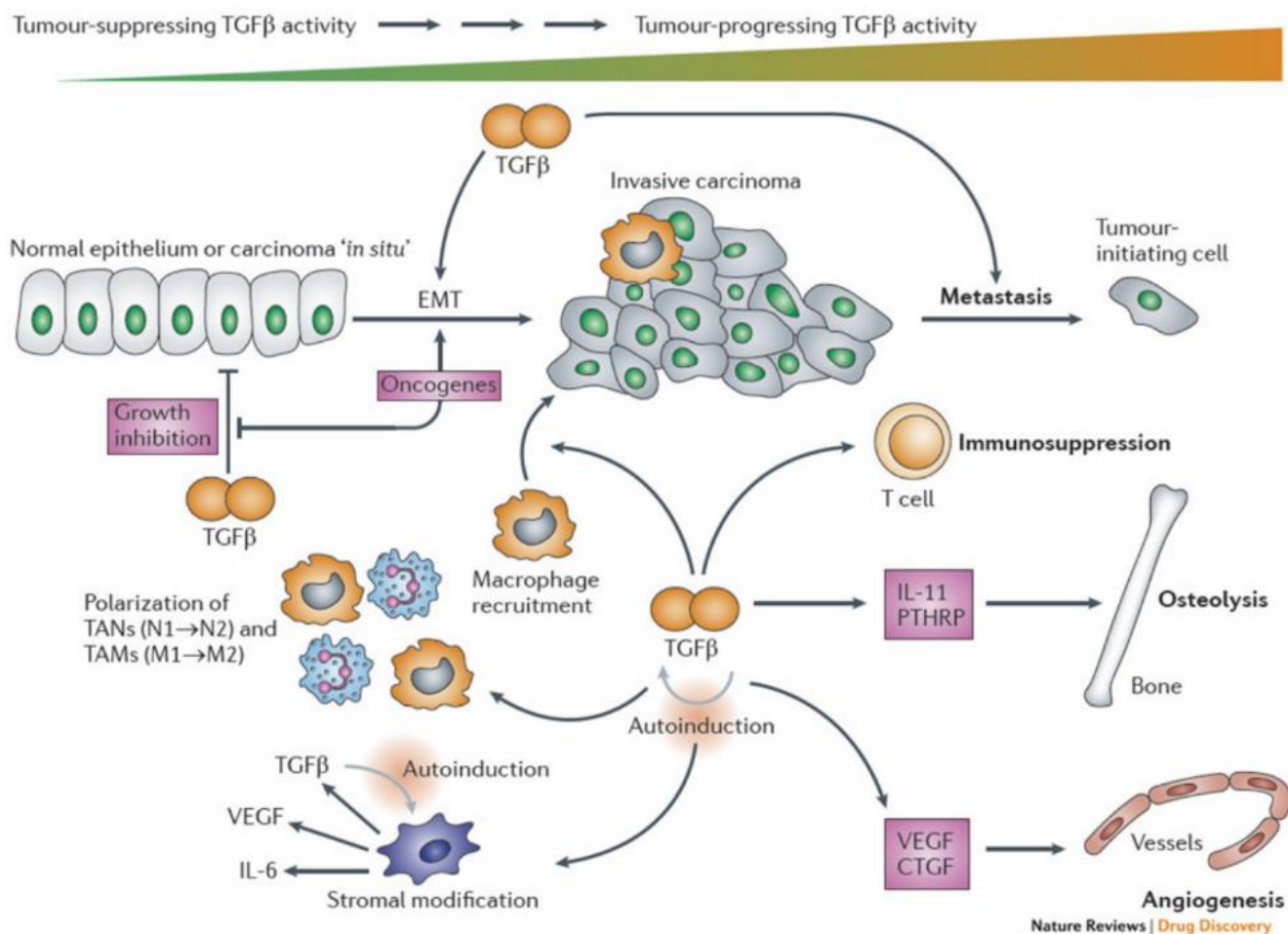
Επιπλέον, η υπερέκφραση της Ακτιβίνης από τους ινοβλάστες μειώνει την έκφραση του αγγειακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth factor), που είναι ίσως ο πιο σημαντικός ρυθμιστής της αγγειογενετικής διαδικασίας¹³⁷. Λόγω αυτής της αντιαγγειογενετικής δράσης της Ακτιβίνης, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς ώστε να την «εξουδετερώσουν». Στο νευροβλάστωμα, που η Ακτιβίνη μειώνει την έκφραση του υποδοχέα VEGFR2, το ογκογονίδιο *N-myc*, αντιστρέφει αυτό το αποτέλεσμα, παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της βΑ υπομονάδας της Ακτιβίνης και κατ' επέκταση το σχηματισμό των ομοδιμερών της¹⁷. Ακόμη, η ιντερλευκίνη 32 (IL-

32) ρυθμίζει αρνητικά την παραγωγή Ακτιβίνης και προάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης ¹³⁸.

Όσον αφορά τον TGF-β, φαίνεται πως έχει αντιαγγειογενετική δράση *in vitro* και αγγειογενετική *in vivo*. Πληθώρα δημοσιευμένων μελετών αναδεικνύουν το ρόλο του TGF-β στην αγγειογενετική διαδικασία. Πειράματα σε ποντικούς δείχνουν ότι η στοχευμένη απαλοιφή είτε του TGF-β1, είτε των υποδοχέων TβRI και TβRII, οδηγεί σε ανωμαλίες κατά τη δημιουργία νέων αγγείων ^{139, 140, 141}. Επίσης, δύο ειδικοί για τα ενδοθηλιακά κύτταρα υποδοχείς του TGF-β, η ενδογλίνη (υποδοχέας τύπου III) και ο ALK-1, θεωρούνται καθοριστικοί για την αγγειογένεση, καθώς μεταλλάξεις σε αυτούς τους υποδοχείς ευθύνονται για την κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία (σύνδρομο Osler-Weber) ¹⁴². Επιπλέον, μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της ενδογλίνης και του ALK-1 σε έμβρυα ποντικού είναι θανάσιμες λόγω προβλημάτων στην αγγειογένεση ¹⁴³. Τέλος, η έκφραση της ενδογλίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνεται δραματικά όταν η αγγειογενετική διαδικασία επάγεται από τα καρκινικά κύτταρα ¹²². Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταγωγή του σήματος από τον TGF-β μέσω της SMAD3 επάγει την έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A), που είναι κύριος ρυθμιστής της αγγειογένεσης και ο βασικός στόχος των περισσότερων σύγχρονων anti-VEGF θεραπειών ¹⁴⁴. Η επαγόμενη από τον TGF-β αγγειογένεση μπορεί να παρεμποδιστεί με τη χρήση αναστολέων ή αντισωμάτων έναντι του TGF-β1 αλλά και των πρωτεϊνών LAP, BMPs και BAMBI ^{145, 146}.

1.2.6 TGF-β/ Ακτιβίνη A: Μεταστροφή από αναστολείς σε επαγωγείς της καρκινογένεσης

Γενετική απενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος μέσω των SMAD πρωτεϊνών, παρατηρείται πολύ συχνά στον καρκίνο. Για παράδειγμα η SMAD4 απενεργοποιείται στο 50% των νεοπλασιών του παγκρέατος. Σαν γενικότερο φαινόμενο, φαίνεται ότι τα καρκινικά κύτταρα αποστέλλουν ογκογόνα μηνύματα σε μια προσπάθεια να περιορίσουν την ανασταλτική δράση των TGF-β/Ακτιβίνης A. Πολλές ογκοπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα ή τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τις SMAD πρωτεΐνες. Αυτή η απενεργοποίηση ή η εξασθένηση της σηματοδότησης μέσω SMADs, επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να υπερκεράσουν την αντιπολλαπλασιαστική δράση των TGF-β/Ακτιβίνης στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης, και να πολλαπλασιάζονται απεριορίστα. Ενδέχεται με παρόμοιους μηχανισμούς, στα πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου, να ενισχύεται η «εισβολή» των καρκινικών κυττάρων σε άλλους ιστούς για τη δημιουργία μεταστάσεων ^{147, 148}.



Εικόνα 7. Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού, TGF-β έχει διττό ρόλο κατά την ογκογένεση. Στα πρώτα στάδια διαδραματίζει ογκοκατασταλτικό ρόλο, ενώ στα πιο προχωρημένα, εμφανίζει ογκογόνο δράση, περιορίζοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης θεραπειών που στοχεύουν στην επαγόμενη από τον TGF-β σηματοδότηση. Τα βέλη με ανοιχτό γκρι χρώμα υποδηλώνουν την ύπαρξη ρυθμιστικού μηχανισμού θετικής ανάδρασης, χαρακτηριστικό της νεοπλασματικής νόσου ¹⁴⁹

Δύο πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της σηματοδότησης των SMADs σε σχέση με τον ιστό εμφάνισης και τη σταδιοποίηση του καρκίνου. Ενεργοποίηση του μονοπατιού calcineurin/NFAT (calcineurin/nuclear factor of the activated T-cells (NFAT) προκαλεί την εκτόπιση της SMAD3 από τον υποκινητή του γονιδίου c-Myc. Εφόσον η SMAD3 εμποδίζει τη μεταγραφή του γονιδίου, ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT ενεργοποιεί τη μεταγραφή του c-Myc, προάγοντας τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η διαθεσιμότητα

της SMAD3, που μπορεί να μετάγει επιπρόσθετα ογκογόνα μηνύματα ¹⁵⁰. Στις νεοπλασίες των πλακωδών κυττάρων (squamous cell carcinomas) το γονίδιο που κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Dab2, συχνά μεθυλιώνεται και απενεργοποιείται. Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων του TGF-β στα πρώιμα ενδοσώματα. Χαμηλή έκφρασή της οδηγεί σε αδυναμία δημιουργίας συμπλόκων υποδοχέων-SMADs στα ενδοσώματα με αποτέλεσμα να «χάνονται» αποκρίσεις επαγόμενες από τον TGF-β ¹⁵¹.

Ένας ακόμη πολύ σημαντικός μηχανισμός είναι η διαφορετική ρύθμιση των SMAD2 και SMAD3. Για παράδειγμα, σε συνθήκες υποξίας, που επικρατούν στο περιβάλλον των όγκων, η φωσφατάση PP2A αποφωσφορυλιώνει κι απενεργοποιεί τη SMAD3, αφήνοντας τη SMAD2 ανεπηρέαστη ¹⁵². Με αυτόν τον τρόπο, μηνύματα με αντιπολλαπλασιαστική δράση, όπως η ρύθμιση του γονιδίου p15 από τη SMAD3, χάνονται, ενώ άλλα μένουν ανέπαφα ή μπορεί και να ενισχύονται. Επιπλέον, διαφορετική ρύθμιση στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης, φαίνεται να υφίσταται και η SMAD7. Σε συνθήκες υποξίας, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1α επάγει την έκφραση της SMAD7, κάτι που ενισχύει την ικανότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Ακόμη και φυσιολογικά κερατινοκύτταρα μπορούν να γίνουν διεισδυτικά (invasive) σε συνθήκες υποξίας και επαγωγής με TGF-β, ενώ η αναστολή της SMAD7 αντιστρέφει αυτόν τον φαινότυπο ^{152, 153}. Η εικόνα 7 απεικονίζει συνοπτικά τη μεταστροφή του TGF-β κατά την ογκογένεση και προέρχεται από μια αξιόπιστη ανασκόπηση του 2012, στο περιοδικό Nature ¹⁴⁹.

1.2.7. Εμβρυϊκή Ανάπτυξη και Βιολογία των Βλαστοκυττάρων

Ως γνωστόν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη πραγματοποιούνται σύνθετες διαδικασίες που απαιτούν συγκεκριμένοι πληθυσμοί κυττάρων, ώστε να υποστούν επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση, να μεταναστεύσουν και να ολοκληρώσουν συντονισμένα αναπτυξιακά στάδια, όπως η αυλάκωση και η γαστριδίωση ^{154, 155}. Η Ακτιβίνη Α διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε αυτές τις διεργασίες. Αρχικά, ταυτοποιήθηκε ως ένα μορφογόνο που καθορίζει το σχηματισμό-σχεδιασμό του μεσοδέρματος (mesodermal patterning) ^{113, 156}. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η Ακτιβίνη επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μεσοδέρματος και των κυττάρων της επιδερμίδας, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις καθορίζει το σχεδιασμό (patterning) στον οργανωτή Spemann ^{157, 158, 159}. Ο σχεδιασμός

στο χώρο γίνεται μέσω βαθμίδωσης της συγκέντρωσης της διάχυτης Ακτιβίνης Α στον εξωκυττάριο χώρο ^{160, 161}.

Στην βιολογία του ανθρώπου, η Ακτιβίνη Α είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πολυδυναμίας αλλά και τη μετέπειτα διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (hPSCs). Παρατεταμένη επώαση με Ακτιβίνη Α των hPSC επάγει την οριστική διαφοροποίησή τους σε ενδόδεσμα ¹⁶²⁻¹⁶⁶. Κατά την πρώιμη διαφοροποίησή τους η σηματοδότηση των Ακτιβίνη Α/Nodal είναι πολύ σημαντική για την επαγωγή της επιθηλιακής-μεσοδερμικής μεταδιαφοροποίησης, όπως προκύπτει από την απώλεια της πρωτεΐνης-μάρτυρα των επιθηλιακών κυττάρων, CD326 (epithelial cell adhesion molecule, EPCAM) και την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης-μάρτυρα των μεσοδερμικών κυττάρων CD56 (neural cell adhesion molecule 1, NCAM1) ¹⁶⁷. Η Ακτιβίνη Α, σε συνεργασία με τη Nodal, μετάγει σήματα μέσω των SMAD2/3 με σκοπό τη μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης Nanog, η οποία αποτελεί έναν καθοριστικό μεταγραφικό παράγοντα για την αυτοανανέωση των βλαστοκυττάρων και τη διατήρηση της πολυδυναμίας ^{168, 169}. Η διατήρηση της πολυδυναμίας είναι απαραίτητη για την σωστή εκπλήρωση της αναπτυξιακής διαδικασίας, και η Ακτιβίνη Α το εξασφαλίζει μέσω της έκφρασης πρωτεϊνών όπως η Nanog, η Oct4, η nodal και η Wnt3 και κυρίως του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (bFGF-2), με ταυτόχρονη καταστολή της BMP7 ¹⁶⁶.

1.3. Ενδοκυττάρωση και διακίνηση των μεμβρανικών κυστιδίων

1.3.1. Γενικά

Μια από τις βασικές διαδικασίες, υπεύθυνες για το σωστό εντοπισμό των μορίων μέσα στο κύτταρο, ονομάζεται μεμβρανική μεταφορά ή διακίνηση κυστιδίων (membrane trafficking/vesicular transport). Κατά τη διαδικασία αυτή μεμβρανικές δομές-φορείς, μικρά κυστίδια ή και μεγαλύτερες κυλινδρικές δομές, αποκόβονται από ένα κυτταρικό διαμέρισμα-δότη (budding) και ενοποιούνται/συντήκονται (fusion) με ένα άλλο κυτταρικό διαμέρισμα-δέκτη, μεταφέροντας είτε το μεμβρανικό είτε το διαλυτό περιεχόμενο τους στο οργανίδιο-στόχο. Η κυστιδιακή μεταφορά περιλαμβάνει δύο κύρια στάδια: (1) το βιοσυνθετικό μονοπάτι, υπεύθυνο για την μεταφορά των πρωτεϊνών που συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και εξέρχονται στον εξωκυττάριο χώρο (εξωκυττάρωση), ή σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα και (2) το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, υπεύθυνο για την πρόσληψη συστατικών από τον εξωκυττάριο χώρο που θα χρησιμοποιηθούν στον κυτταρικό μεταβολισμό (170). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή το ενδιαφέρον εστιάζεται στην ενδοκυττάρωση, και τις διαφορετικές οδούς που αυτή πραγματοποιείται.

Η ισορροπία μεταξύ των δύο μονοπατιών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των οργανιδίων και την επαναχρησιμοποίηση των συστατικών της μηχανής μεταφοράς ¹⁷¹. Τα μονοπάτια εξωκυττάρωσης και ενδοκυττάρωσης επικοινωνούν διαμέσου αμφίδρομης μεταφοράς μεταξύ συμπλόκου Golgi και ενδοσωμάτων ¹⁷². Σε γενικές γραμμές, τα βήματα στην ανταλλαγή υλικού μέσω κυστιδίων συνίστανται από τα ίδια στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν διαλογή πρωτεϊνών και λιπιδίων, σχηματισμό φορέων μεταφοράς (transport carriers), μετακίνηση κυστιδίων στον κυτταροσκελετό, αναγνώριση από το οργανίδιο-στόχο και σύντηξη των κυστιδίων με το κυτταρικό διαμέρισμα-στόχο ¹⁷³.

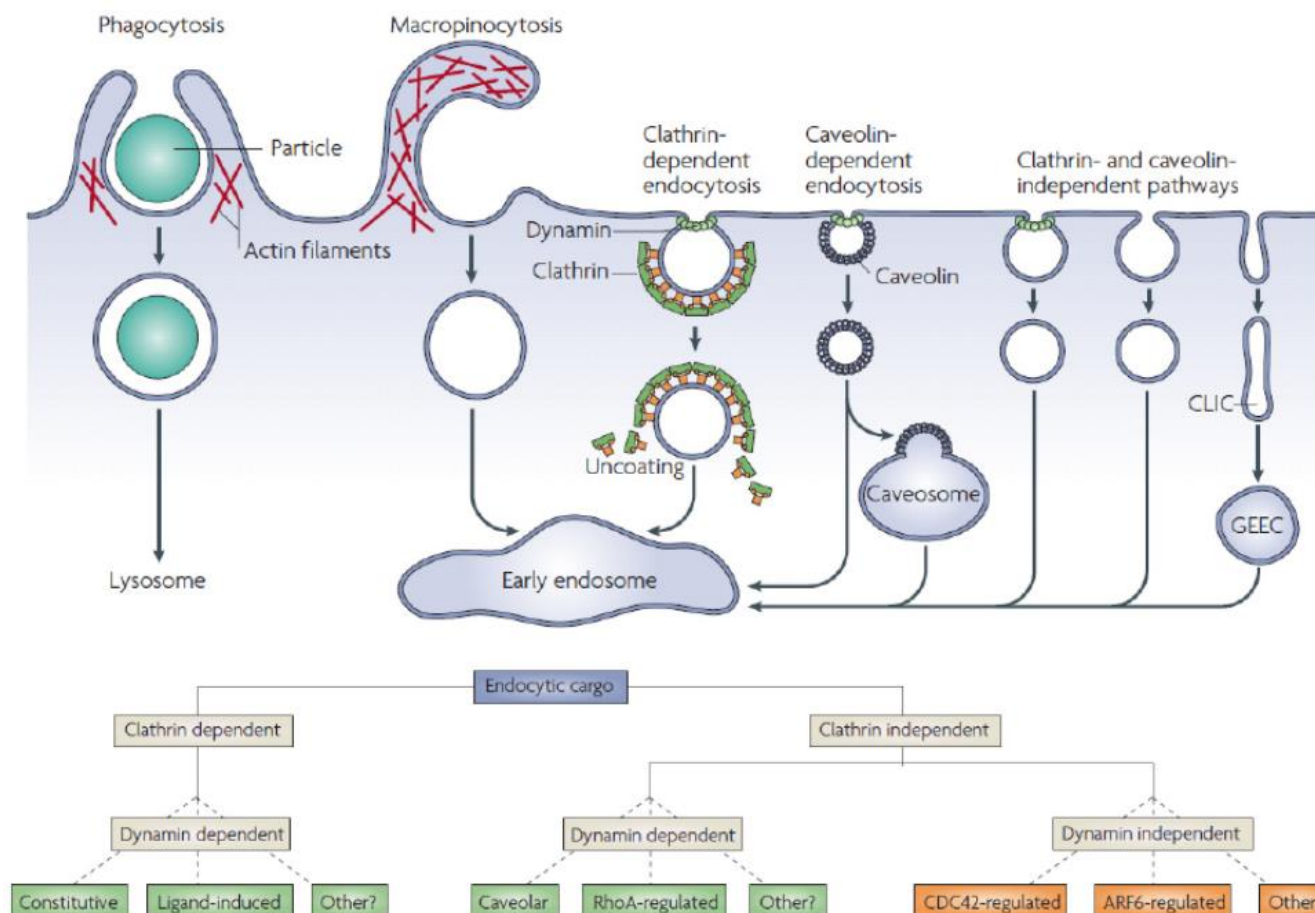
1.3.2 Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης

Η ενδοκυττάρωση ρυθμίζει πολλές βιολογικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στην πλασματική μεμβράνη, όπως είναι η είσοδος θρεπτικών συστατικών αλλά και παθογόνων μικροοργανισμών, η μεταγωγή σήματος από μεμβρανικούς υποδοχείς, αλλά και η διατήρηση της ομοιόστασης λιπιδίων και πρωτεϊνών. Για αυτόν τον λόγο η ενδοκυττάρωση δεν πραγματοποιείται με έναν και μοναδικό γενικευμένο τρόπο, αλλά υπάρχουν διαφορετικά μονοπάτια με εξειδικευμένη δράση, που λειτουργούν ταυτόχρονα (εικόνα 8). Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του 'φορτίου' (cargo) καθορίζουν σε μεγάλο

βαθμό ποιο μονοπάτι θα ενεργοποιηθεί για την εσωτερικοποίησή του. Για παράδειγμα η 'κατάποση' φορτίων μεγαλύτερων από 500nm, όπως ένα βακτήριο, τυπικά πραγματοποιείται από τις διεργασίες που ονομάζονται φαγοκυττάρωση (στερεά στοιχεία) και μακροπinoκυττάρωση (εξωκυττάριο υγρό) ¹⁷⁴.

Μικρότερα φορτία ακολουθούν άλλα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης που παίρνουν το όνομά τους από τη παρουσία ή μη της πρωτεΐνης κλαθρίνης. Η πιο καλά μελετημένη οδός εσωτερίκευσης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων είναι αυτή που εξαρτάται από την πρωτεΐνη κλαθρίνη, η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση (clathrin-dependent endocytosis). Τα υπόλοιπα μονοπάτια ανήκουν σε μια κατηγορία μη εξαρτώμενη από κλαθρίνη (CIE, clathrin independent endocytosis) και χαρακτηρίζονται από την παρουσία άλλων πρωτεϊνών όπως η καβεολίνη (caveolae pathway), η Arf1, Arf6 και Cdc42. Ο ρόλος τους δεν είναι ιδιαίτερα αποσαφηνισμένος. Οι οδοί ενδοκυττάρωσης που συμμετέχουν στη διαμετακίνηση αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους και σχετίζονται με τις στοχεύσεις της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα αναλυθούν περαιτέρω στις επόμενες ενότητες ^{175, 176, 177}.

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα φορτία εγκολπώνονται σε κυστίδια, CCVs (Clathrin coated vesicles), Caveosomes, CLIC (Clathrin and dynamin independent carrier) ή GEECs (Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartment) και μέσω κυστιδιακής διακίνησης μεταφέρονται στο πρώιμο ενδόσωμα (early endosome), τον πρώτο και καθοριστικό σταθμό 'διαλογής' τους. Από εκεί μπορούν να ακολουθήσουν διαφορετικούς δρόμους, όπως να μεταφερθούν στο λυσόσωμα για αποδόμηση ή να επιστρέψουν στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω των μονοπατιών της ανακύκλησης.



Εικόνα 8. Τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης. Τα στερεά μόρια μεγάλου μεγέθους εισέρχονται στο κύτταρο με φαγοκυττάρωση (στους κυτταρικούς τύπους που τη διαθέτουν), ενώ το εξωκυττάριο υγρό εισέρχεται με μακροπinoκυττάρωση. Οι δύο διαδικασίες εξαρτώνται από την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης. Τα υπόλοιπα μονοπάτια ενδοκυττάρωνουν το 'φορτίο' με τη βοήθεια μηχανισμών που εξαρτώνται ή όχι από την πρωτεΐνη κλαθρίνη και την GTPάση *Dynamin*. Τα περισσότερα φορτία καταλήγουν στο πρώιμο ενδόσωμα μέσω καλυμμένων κυστιδίων (coated vesicles) ή μέσω σωληνοειδών ενδιάμεσων διαμερισμάτων, γνωστά ως CLIC (*Clathrin and Dynamin independent carrier*) ή GEEC (*Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartment*). Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται μια προτεινόμενη ταξινόμηση των μηχανισμών ενδοκυττάρωσης¹⁷⁸

1.3.3 Ενδοκυτταρική Διακίνηση - Το πρώιμο ενδόσωμα

Αμέσως μετά την ενδοκυττάρωση τους, τα κυστίδια αποβάλλουν το περίβλημά τους και συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα (early endosomes), τα οποία είναι κυστίδια με σωληνοειδείς προεκβολές που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και δέχονται το φορτίο από την πλασματική μεμβράνη. Η σύντηξη των ενδοκυτταρικών κυστιδίων με τα ενδοσώματα επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεϊνών Rab, των τελεστών των πρωτεϊνών Rab και συμπληρωματικών ζευγών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών SNARE του κυστιδίου και των μεμβρανών-στόχων. Τα πρώιμα ενδοσώματα είναι ο πρώτος σταθμός στο μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης και χρησιμεύουν ως διαμέρισμα διαλογής (ονομάζονται και ενδοσώματα διαλογής, sorting endosomes). Από το πρώιμο ενδόσωμα τα μόρια που έχουν ενδοκυτταρωθεί μπορούν είτε να ανακυκλωθούν επιστρέφοντας στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, είτε να μεταφερθούν στα όψιμα ενδοσώματα (late endosomes) και λυσοσώματα για αποδόμηση. Τα όψιμα ενδοσώματα προκύπτουν από την ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων, μετά από στρατολόγηση πρωτεϊνών και αλλαγή στη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης τους, προκειμένου να συντηχθούν με κυστίδια μεταφοράς που φέρουν λυσοσωμικές υδρολάσες από τη συσκευή Golgi. Έτσι δημιουργούνται τα λυσοσώματα, όπου γίνεται η αποδόμηση του φορτίου.

Το πρώιμο ενδόσωμα είναι πλειομορφικό διαμέρισμα, με σωληνοειδείς προεκβολές και μεγαλύτερες κυστιδιακές περιοχές στις οποίες σχηματίζονται μεμβρανικές εγκολπώσεις. Έτσι σχηματίζονται μορφολογικά διακριτές περιοχές που πιθανότατα έχουν διαφορετική λειτουργία. Για παράδειγμα, οι υποδοχείς που μεταφέρονται στα ενδοσώματα ανακύκλωσης, συσσωρεύονται στις σωληνοειδείς προεκτάσεις των πρώιμων ενδοσωμάτων, ενώ οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποδόμηση, συσσωρεύονται στις μεμβρανικές εγκολπώσεις και τα πολυκυστιδιακά σωματίδια (MVB, multivesicular bodies) των πρώιμων ενδοσωμάτων.

Ένα σημαντικό γνώρισμα των πρώιμων ενδοσωμάτων είναι ότι διατηρούν όξινο εσωτερικό pH (περίπου 6,2) ως αποτέλεσμα της δράσης μιας μεμβρανικής αντλίας H^+ . Το pH μειώνεται από 6,2 σε 5,5 στον αυλό των πολυκυστιδιακών σωματίων, ενώ αντίθετα αυξάνεται σε 6,5 στα σωληνοειδή ενδοσώματα ανακύκλωσης. Το όξινο pH οδηγεί στην αποσύνδεση πολλών προσδετών που βρίσκονται στο διαμέρισμα του πρώιμου ενδοσώματος από τους υποδοχείς τους. Μετά την αποσύνδεση αυτή, οι υποδοχείς και οι προσδέτες τους μπορούν να μεταφερθούν σε διαφορετικούς ενδοκυτταρικούς προορισμούς. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), η οποία

αποσυνδέεται από τον υποδοχέα της στα πρώιμα ενδοσώματα. Ο υποδοχέας επιστρέφει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, η LDL μεταφέρεται στα λυσοσώματα, όπου αποδομείται απελευθερώνοντας χοληστερόλη.

Επομένως, το πρώιμο ενδόσωμα είναι ο βασικός και πρωταρχικός σταθμός που καθορίζει την τύχη των μορίων που εσωτερικεύονται μέσω των διαφορετικών οδών ενδοκυττάρωσης. Η διαλογή αυτή διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην πλασματική μεμβράνη, την ενδοκυτταρική διακίνησή τους και τον τερματισμό της σηματοδότησης. Στη συνέχεια θα δούμε ότι τα πρώιμα ενδοσώματα δρουν και ως πλατφόρμες σηματοδότησης, παρέχοντας στο κύτταρο τη δυνατότητα μεγαλύτερης και πιο εξειδικευμένης ρύθμισης της μεταγωγής μηνυμάτων στο χώρο και στο χρόνο^{179, 180}.

1.3.4 Οι πρωτεΐνες-ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής διακίνησης

Η πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση των πρώιμων ενδοσωμάτων αλλά και άλλων κυστιδίων έχει μελετηθεί εκτενώς με βιοχημικές μεθόδους και τεχνικές μικροσκοπίου. Στην ενότητα αυτή θα παρατεθεί ο ρόλος των λιπιδίων και πολλών πρωτεϊνών στην κυστιδιακή διακίνηση, εστιάζοντας στα πιο σημαντικά, αλλά και σε εκείνες τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται στα πειράματα της παρούσας εργασίας.

1.3.4.1 Φωσφοϊνοσίδια

Τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης (Phosphoinositides) παράγονται από τη φωσφορυλίωση του λιπιδίου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PtdIns), και εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης και των μεμβρανών των κυστιδίων διακίνησης¹⁸¹. Η βιολογική τους σημασία είναι πολύ μεγάλη, καθώς εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, ο κυτταρικός θάνατος, η κινητικότητα των κυττάρων, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η ενδοκυτταρική κυστιδιακή διακίνηση.

Η παραγωγή και η αποικοδόμηση των φωσφοϊνοσιδίων στην πλασματική μεμβράνη ρυθμίζει χωροχρονικά τη συσσώρευση ή την απελευθέρωση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν¹⁸². Η παραγωγή τους και η μετατροπή τους, από το ένα λιπίδιο στο άλλο, καθορίζεται από τη δράση κινασών και φωσφατασών (lipid-kinases/phosphatases). Στην εικόνα 9, φαίνεται η κατανομή τους στα διάφορα

[illegible]

Συγκεκριμένες δομικές περιοχές και μοτίβα που δεσμεύουν το PtdIns(3)P λιπίδιο είναι οι FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1), PX (Phox-homology), PH (Pleckstrin-homology), ENTH (Epsin N-terminal-homology) και άλλες. Μέσω των περιοχών αυτών πληθώρα πρωτεϊνών δεσμεύονται στο PtdIns(3)P λιπίδιο, μεταξύ των οποίων κινάσες, φωσφολιπάσες, πρωτεΐνες ικρίωματα (scaffold proteins), πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και πολλές άλλες ¹⁸⁷. Περισσότερες από 30 πρωτεΐνες στον άνθρωπο περιέχουν την FYVE περιοχή και η πλειοψηφία τους είναι ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής διακίνησης. Τέλος, το PtdIns(3,5)P₂ λιπίδιο εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των πολυκυστιδικών σωματιδίων και στο

όψιμο ενδόσωμα, ενώ το PtdIns(4)P λιπίδιο είναι κυρίαρχο στο δίκτυο trans-Golgi (TGN), με τις πρωτεΐνες που προσελκύει να παίζουν ρόλο στην κυστιδιακή διακίνηση από το TGN προς την κυτταρική μεμβράνη.

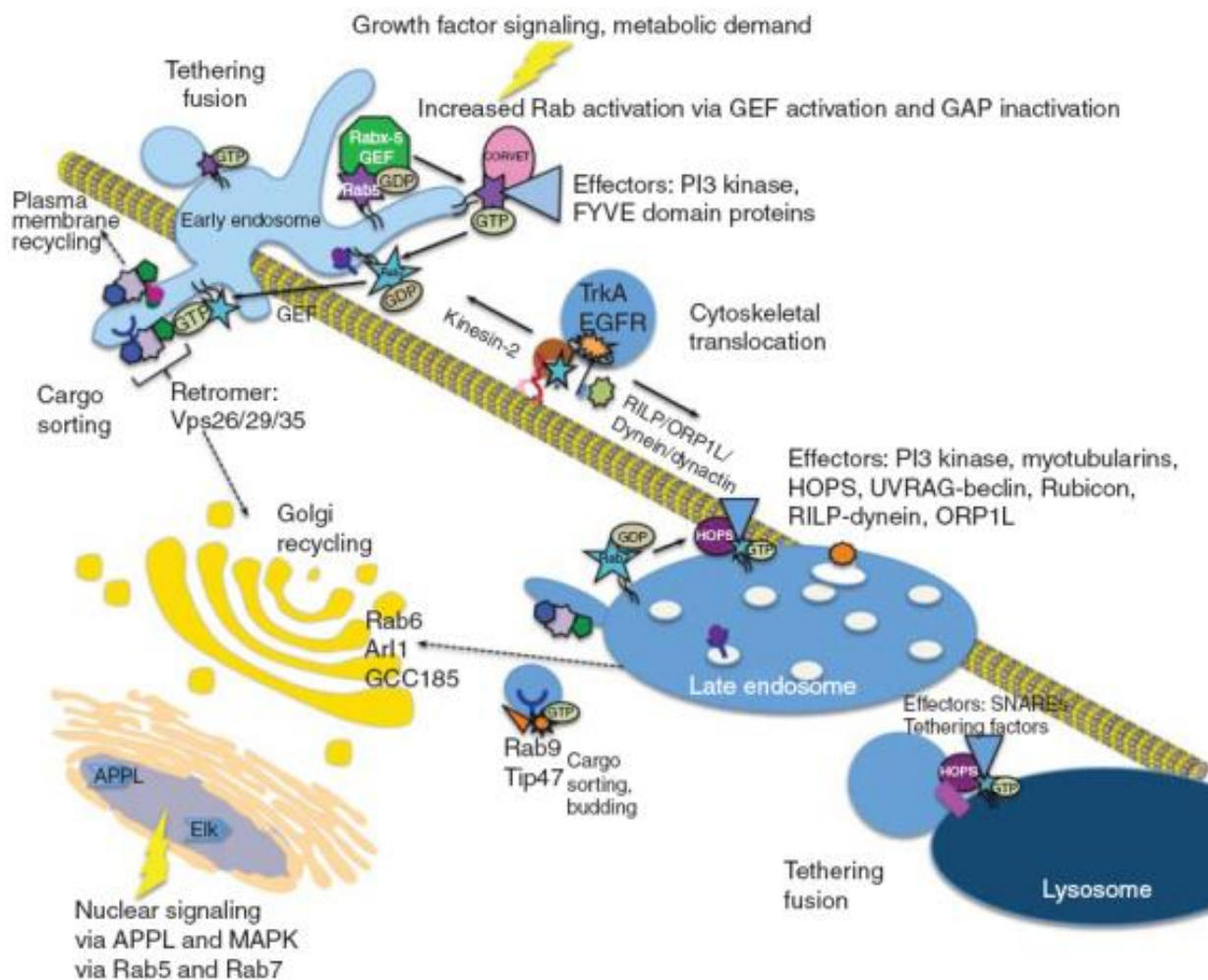
1.3.4.2 Οι Rab πρωτεΐνες

Μια από τις σπουδαιότερες κατηγορίες πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα κυστίδια διακίνησης είναι οι πρωτεΐνες Rab (Ras-associated binding), οι οποίες εναλλάσσονται μεταξύ, μιας GTP-προσδεδεμένης, ενεργού και μιας GDP-προσδεδεμένης, ανενεργού μορφής. Οι διάφορες πρωτεΐνες Rab έχουν διαφορετική κυστιδιακή κατανομή και συνήθως χρησιμοποιούνται ως πρωτεΐνες μάρτυρες των διαμερισμάτων που τις φέρουν ^{188, 189}. Η ανταλλαγή του GDP με το GTP καταλύεται από τις πρωτεΐνες GEFs (Guanine nucleotide exchange factors). Η υδρόλυση του GTP σε GDP διευκολύνεται από την εγγενή δραστικότητα GTPάσης των πρωτεϊνών Rab και καταλύεται από τις πρωτεΐνες GAPs (GTPase-activating proteins).

Στην ενεργή μορφή τους οι Rabs εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες, όπου αλληλεπιδρούν με πληθώρα πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων οι Rab τελεστές (effectors) ¹⁹⁰. Με τη βοήθεια των τελεστών τους, οι πρωτεΐνες Rab επιτελούν πολλαπλές λειτουργίες (εικόνα 10), καθορίζοντας τις διάφορες πτυχές της ενδοκυτταρικής μεμβρανικής διακίνησης (trafficking), όπως η κυστιδιακή εκβλάστηση (budding), η κινητικότητα (motility), η πρόσδεση (tethering) και η σύντηξη (fusion).

Πιο αναλυτικά, η διακίνηση από ένα μεμβρανικό διαμέρισμα σε ένα άλλο, πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια. Αρχικά, δημιουργείται το κυστίδιο από την μεμβράνη του οργανιδίου-δότη, στη συνέχεια μεταφέρεται το κυστίδιο προς το επιθυμητό διαμέρισμα, μέσω των διαδρομών που σχηματίζονται στους μικροσωληνίσκους, έπειτα προσδένεται το κυστίδιο στη μεμβράνη του οργανιδίου-δέκτη και τέλος γίνεται η σύντηξη των δύο μεμβρανών ¹⁹¹.

Αυτά τα στάδια υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση, ώστε τα κυστίδια και το φορτίο τους να παραδίδονται στο σωστό τελικό προορισμό. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι πρωτεΐνες Rab μαζί με τους τελεστές τους παρέχουν εξειδίκευση στις παραπάνω λειτουργίες. Η ύπαρξη πολλών πρωτεϊνών Rab στα κύτταρα των θηλαστικών αντανακλά και την πολυπλοκότητα των διαδικασιών της κυστιδιακής μεταφοράς.



Εικόνα 10. Οι Rab GTPάσες ρυθμίζουν γεγονότα σηματοδότησης και διακίνησης κυστιδίων. Οι Rab GTPάσες συμμετέχουν στη διαλογή του 'φορτίου', την ωρίμανση και σύντηξη των κυστιδίων, καθώς και τη μετακίνησή τους κατά μήκος του κυτταροσκελετού. Επίσης, οι Rab GTPάσες αποκωδικοποιούν εξωκυτάρια μηνύματα προκειμένου να παράσχουν συντονισμένες αποκρίσεις σε φυσιολογικές και μεταβολικές ανάγκες ¹⁹¹

Αυτά τα στάδια υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση, ώστε τα κυστίδια και το φορτίο τους να παραδίδονται στο σωστό τελικό προορισμό. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι πρωτεΐνες Rab μαζί με τους τελεστές τους παρέχουν εξειδίκευση στις παραπάνω λειτουργίες. Η ύπαρξη πολλών πρωτεϊνών Rab στα κύτταρα των θηλαστικών αντανακλά και την πολυπλοκότητα των διαδικασιών της κυστιδιακής μεταφοράς.

Για πολλά χρόνια, υπήρχε η άποψη ότι η κάθε Rab είναι ειδική για έναν τύπο κυστιδίου. Με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, φαίνεται ότι οι περισσότερες Rabs εντοπίζονται σε περισσότερους από ένα τύπο κυστιδίων, αλλά ίσως η καθεμία να έχει μία εξειδικευμένη λειτουργία. Η Rab5 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα CCPs (Clathrin coated pits) και το πρώιμο ενδόσωμα ¹⁸⁰, όμως στρατολογείται και στα νεοσυντιθέμενα μακροπινοσώματα. Ρυθμίζει τη μεταφορά του φορτίου από την πλασματική μεμβράνη στο πρώιμο ενδόσωμα, την παραγωγή του λιπιδίου PtdIns(3)P (192), την ομότυπη σύντηξη των ενδοσωμάτων ¹⁹³, καθώς και τη μεταφορά τους πάνω στις 'ράγες' των μικροσωληνίσκων ¹⁹⁴. Ταυτόχρονα, έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος από το πρώιμο ενδόσωμα στον πυρήνα ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Η Rab7 εντοπίζεται στο όψιμο ενδόσωμα και είναι σημαντική για την κυστιδιακή διακίνηση, μετά το σχηματισμό των πολυκυστιδιακών σωματίων (MVBs) (198, 199). Από την άλλη μεριά, οι Rab4 και Rab11 ρυθμίζουν τη μεταφορά των κυστιδίων από το πρώιμο ενδόσωμα προς την κυτταρική μεμβράνη, δηλαδή τα μονοπάτια ανακύκλησης (υποενότητα 1.3.2) ²⁰⁰.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι Rab GTPάσες δεσμεύονται αντιστρεπτά στις μεμβράνες, με την προσθήκη ομάδων γερανυλίου-γερανυλίου (geranyl-geranyl) σε ένα ή δύο κατάλοιπα κυστεΐνης του αμινοτελικού τους άκρου και αυτή η τροποποίηση είναι σημαντική για το ρόλο τους στη μεμβρανική διακίνηση (201). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες Rab μπορεί να κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου κυστιδίου, δημιουργώντας 'Rab περιοχές' με διαφορετική λειτουργία η κάθε μια ²⁰², ²⁰³.

1.3.4.3 Άλλες πρωτεΐνες ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής διακίνησης

Όπως είδαμε στην προηγούμενη ενότητα η πιο καλά χαρακτηρισμένη Rab είναι η Rab5. Η Rab5 ενεργοποιείται με τη δράση της Rabex-5, που δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (GEF), και διατηρείται ενεργή με τη βοήθεια μιας άλλης πρωτεΐνης τελεστή, της Rabaptin-5 (204, 205). Η Rab5-GTP προσελκύει στα πρώιμα ενδοσώματα κινάση της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PtdIns(3)P-kinase/VPS34/p150) ¹⁹². Όπως υποδεικνύει και το όνομά της, ο βασικός ρόλος της είναι η παραγωγή του λιπιδίου PtdIns(3)P. Το λιπίδιο αυτό αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που διαθέτουν το μοτίβο FYVE, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.3.4.1. Πρωτεΐνες με μοτίβο FYVE είναι οι πρωτεΐνες EEA1 (early endosome antigen 1) ⁴⁶, η Rabenosyn-5 ²⁰⁶ και οι SNXs (Sorting nexins) ²⁰⁷, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με το PtdIns(3)P λιπίδιο και με την ενεργή μορφή της Rab5.

Η EEA1 είναι τελεστής της Rab5 και η πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη-μάρτυρας των πρώιμων ενδοσωμάτων²⁰⁸. Η EEA1, σε συνεργασία με πρωτεΐνες της οικογένειας SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor), όπως οι syntaxin 6 και syntaxin 13²⁰⁹, είναι απαραίτητες για την ομότυπη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων *in vivo*^{210, 211}. Η Rabenosyn-5 είναι τελεστής της Rab5 και της Rab4, και φαίνεται να ενισχύει τη σύζευξη των πρώιμων ενδοσωμάτων με τα κυστίδια της γρήγορης οδού ανακύκλησης²¹², βοηθώντας και στη διαλογή του φορτίου.

Τέλος, οι πρωτεΐνες APPL1 και APPL2 (Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif) είναι δυο ακόμη τελεστές της πρωτεΐνης Rab5, οι οποίες εντοπίζονται σε έναν υποπληθυσμό Rab5-θετικών ενδοσωμάτων. Οι πρωτεΐνες αυτές, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος και όχι στην ενδοκυτταρική μεμβρανική διακίνηση. Μετά από επαγωγή με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) οι APPL μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου συμμετέχουν σε πρωτεϊνικά συμπλέγματα που σχετίζονται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης και την έκφραση γονιδίων. Οι APPLs θεωρούνται σημαντικές για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η σύνδεση τους με την Rab5 φαίνεται πως είναι σημαντική για τη μιτογένεση¹⁹⁷. Έχει επίσης προταθεί ότι οι πρωτεΐνες APPL ενδεχομένως να ρυθμίζουν ένα ανεξάρτητο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, χωρίς αυτό να στηρίζεται ακόμη σε ακλόνητες αποδείξεις.

Κλείνοντας, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι πολλές ακόμα πρωτεΐνες εντοπίζονται στα ενδοσώματα και τα υπόλοιπα κυστίδια μεταφοράς, όπως για παράδειγμα οι κινητήριες πρωτεΐνες. Δε θεωρείται σκόπιμο να αναλυθούν περαιτέρω στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Αναφέρονται αναλυτικά σε μια πολύ ενδιαφέρουσα και αξιόπιστη ανασκόπηση του Marco Jovic και των συνεργατών του¹⁸⁰.

1.3.5 Ενδοσώματα ανακύκλησης

Πολλοί από τους προσδέτες και οι υποδοχείς τους, αφού εισέλθουν στο κύτταρο, από κάποια οδό ενδοκυττάρωσης, μπορούν να επιστρέψουν στην πλασματική μεμβράνη μέσω των μονοπατιών ανακύκλησης. Τα ενδοσώματα ανακύκλησης σχηματίζουν ένα δυναμικό δίκτυο κυστιδίων, το οποίο πιθανότατα ρυθμίζεται από τις Rab4 και Rab11, οι οποίες έχουν διακριτή, αλλά αλληλο-επικαλυπτόμενη κατανομή.

Είναι γνωστό ότι η ανακύκληση ορισμένων υποδοχέων στη μεμβράνη, όπως ο υποδοχέας της τρानσφερίνης, παρουσιάζει διπλή κινητική και διακρίνεται στην αργή και τη γρήγορη. Η διαφορετική

κινητική αντανάκλα και την ύπαρξη δυο μονοπατιών προς την κυτταρική μεμβράνη. Θεωρείται πως η Rab4, που εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα, είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του φορτίου από το πρώιμο ενδόσωμα σε κυστίδια που επιστρέφουν γρήγορα στη μεμβράνη (fast recycling). Ο χρόνος της γρήγορης ανακύκλησης για τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR) υπολογίζεται στα 5 λεπτά.

Από την άλλη μεριά, η πρωτεΐνες EHD4 και Rab11 διαμεσολαβούν τη μεταφορά του φορτίου προς την κυτταρική μεμβράνη, διαμέσου του αργού μονοπατιού ανακύκλησης, που περιλαμβάνει την επικοινωνία με τη συσκευή Golgi. Το φορτίο μεταφέρεται από το πρώιμο ενδόσωμα στο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα ανακύκλησης (ERC, Endocytic recycling compartment) ²¹³, το οποίο έχει σωληνοειδή μορφολογία και εντοπίζεται κοντά στον πυρήνα. Η προέλευσή του ίσως να είναι οι σωληνοειδείς προεκτάσεις του πρώιμου ενδοσώματος ²¹⁴. Το αργό μονοπάτι ανακύκλησης διαρκεί 15-30 λεπτά.

1.3.6 Πολυκυστιδιακά σωματίδια - Όψιμα ενδοσώματα – Λυσοσώματα

Η εγκόλπωση της μεμβράνης των πρώιμων ενδοσωμάτων, η αποκοπή και η συσσώρευση κυστιδίων στο εσωτερικό του αυλού τους (ILV, Intraluminal vesicles), οδηγεί στη δημιουργία ενός ενδιάμεσου αλλά διακριτού τύπου ενδοσωμάτων που ονομάζονται πολυκυστιδιακά σωματίδια/ενδοσώματα (MVB/E, Multivesicular bodies/endosomes). Τα ενδοσώματα αυτά διαφέρουν σε πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύσταση από τα πρώιμα και τα όψιμα ενδοσώματα ¹⁸⁶. Στη μεμβράνη των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων συσσωρεύονται οι υποδοχείς που προορίζονται για αποικοδόμηση. Αυτό πραγματοποιείται από σύμπλοκα πρωτεϊνών με πρωταγωνιστές τα συμπλέγματα ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Στη συνέχεια, γίνεται σύντηξη της μεμβράνης των MVB με εκείνη των όψιμων ενδοσωμάτων και το φορτίο παραδίδεται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση.

Τα όψιμα ενδοσώματα (late endosomes) αποτελούν ένα δυναμικό δίκτυο κυστιδίων με πολύπλοκη οργάνωση. Το όψιμο ενδόσωμα περιέχει ενδοαυλικά κυστίδια, σωληνοειδείς προεκτάσεις και πολλές μεμβρανικές εγκολπώσεις. Την εξωτερική του μεμβράνη διακοσμούν οι πρωτεΐνες Lamp1, Rab7 και Rab9, ενώ στο εσωτερικό υπάρχει αυξημένη ποσότητα LBPA (Lisobiphosphatidic acid). Οι υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στα ενδοαυλικά κυστίδια των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων, παραδίδονται στα όψιμα ενδοσώματα και κατόπιν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι τα όψιμα ενδοσώματα δεν περιέχουν μόνο πρωτεΐνες που προορίζονται για αποδόμηση. Για

παράδειγμα, στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, οι πρωτεΐνες των όψιμων ενδοσωμάτων παίρνουν μέρος στην παρουσίαση των αντιγόνων στην επιφάνειά τους.

Τα λυσοσώματα και τα όψιμα ενδοσώματα ανταλλάζουν λιπιδιακό και πρωτεϊνικό υλικό συνεχώς και ο διαχωρισμός τους είναι πολύ δύσκολος ¹⁷⁹. Τα δύο αυτά διαμερίσματα περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα, έχουν παρόμοιο pH (~5,5) και στην εξωτερική τους μεμβράνη βρίσκονται παρόμοιες γλυκοπρωτεΐνες. Ωστόσο, στα λυσοσώματα δεν απαντώνται οι πρωτεΐνες των όψιμων ενδοσωμάτων Rab7 και Rab9. Αντίθετα, στα λυσοσώματα υπάρχει αφθονία σε λιπάσες και πρωτεάσες, κι έτσι πραγματοποιείται η αποικοδόμηση του φορτίου που καταλήγει σε αυτά ^{215, 216}.

1.3.7 Η κλαθρίνο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση

Η πρωτεΐνη κλαθρίνη ήταν μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ως βασικό συστατικό κυστιδιακών δομών, αρχικά στο κουνούπι *Aedes aegypti* ^{217, 218}. Πλέον είναι ο πιο μελετημένος μηχανισμός εσωτερίκευσης μορίων στο κύτταρο, που χρησιμοποιείται για την είσοδο θρεπτικών ουσιών, παθογόνων μικροοργανισμών, πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων. Περισσότεροι από 50 υποδοχείς αυξητικών παραγόντων χρησιμοποιούν την CDE για την είσοδο τους μέσα στο κύτταρο, μια διαδικασία που μπορεί να είναι συνεχής (constitutive) ή επαγόμενη (induced) από κάποιο ερέθισμα.

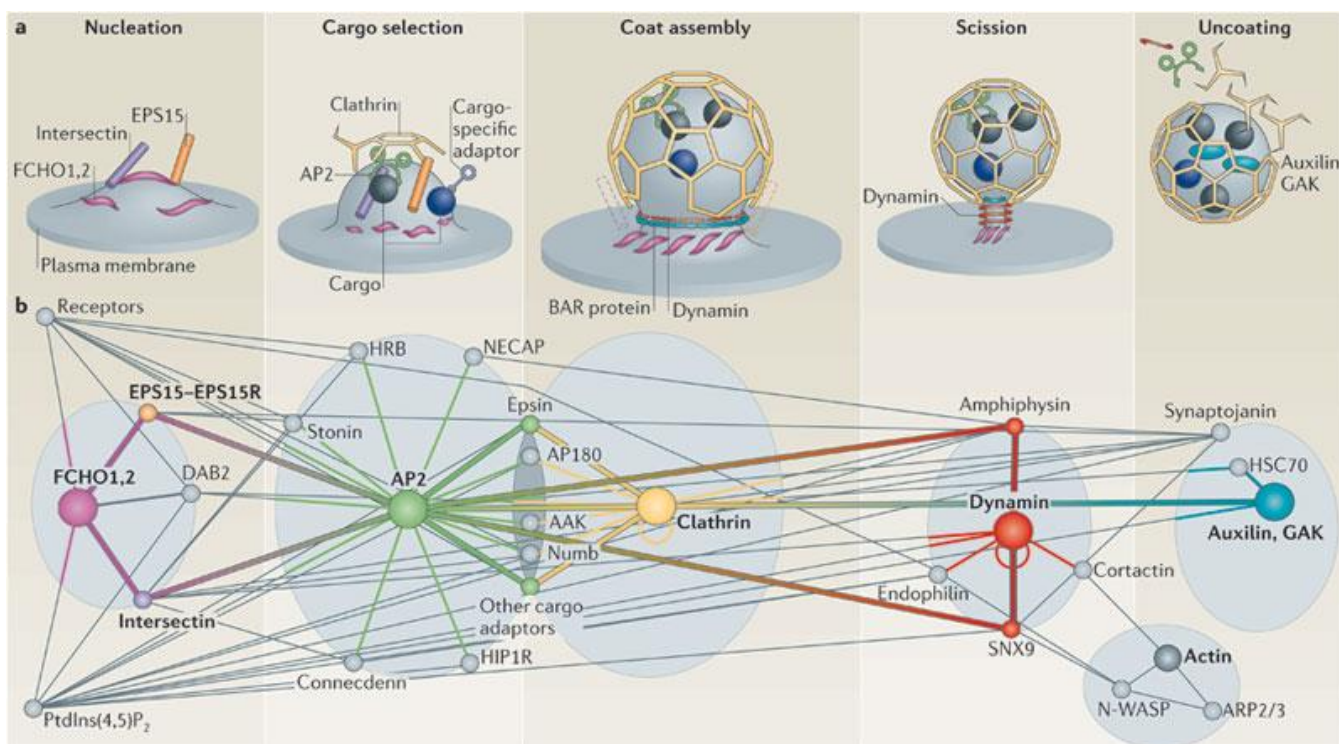
Μορφολογικές μελέτες δείχνουν ότι τα κυστίδια της κλαθρίνης έχουν διάμετρο 100-200 nm. Η κλαθρίνη σχηματίζεται ως ένα τριμερές από ετεροδιμερή, που αποτελούνται από μια βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα, σχηματίζοντας μια τρισκελή δομή. Τα τρισκελή μόρια της κλαθρίνης πολυμερίζονται και περικυκλώνουν τα κυστίδια ²¹⁹. Πρωτεΐνες-προσαρμοστές συνδέουν το φορτίο με την κλαθρίνη ²²⁰. Συνοπτικά, η διαδικασία της ενδοκυττάρωσης πραγματοποιείται με την αναγνώριση του φορτίου, την εγκόλπωση της πλασματικής μεμβράνης και τελικά την απόσχιση ενός κυστιδίου, επικαλυμμένου με κλαθρίνη (CCV, clathrin coated vesicle). Στη συνέχεια, αποβάλλεται το περίβλημα της κλαθρίνης και το κυστίδιο συντήκεται με τα πρώιμα ενδοσώματα. Η διαδικασία απεικονίζεται στην εικόνα 11. Για χρόνια υπήρχε η αντίληψη ότι το φορτίο επάγει το σχηματισμό των κυστιδίων. Σήμερα είναι γνωστό ότι οι επικαλυμμένες με κλαθρίνη μεμβράνες δημιουργούνται «αυθόρμητα» στη πλασματική μεμβράνη και σταθεροποιούνται μετά την πρόσδεση του φορτίου ²²¹, με τη βοήθεια των μοτίβων YXXF, DEXXXLLI και FXNPXY, καθώς και την πολυουβικιτίνωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, που ενισχύει την πρόσδεση

μεταξύ φορτίου και πρωτεϊνών-προσαρμοστών (adaptor) ²²². Η δημιουργία των κυστιδίων και η ρύθμιση της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης σχετίζονται με περίπου 150 πρωτεΐνες που έχουν ταυτοποιηθεί, χωρίς όμως η δράση τους να είναι γνωστή, με εξαίρεση πολύ λίγες από αυτές. Σε μία μελέτη του Merrifield και των συνεργατών του σε ζώντα κύτταρα, με τη χρήση της clathrin-GFP και μικροσκοπίας TIR-FM ²²³, αποκαλύφθηκε η ακολουθία δράσης ορισμένων πρωτεϊνών στο σχηματισμό ενός ώριμου κυστιδίου κλαθρίνης. Η εγκόλπωση της πλασματικής μεμβράνης (CCP, clathrin-coated pit, κλαθρινο-επικαλυμμένες κοιλότητες) διαμεσολαβείται από την πρόσδεση της πρωτεΐνης-φορτίου, τις πρωτεΐνες AP καθώς και άλλες βοηθητικές ²²¹. Στους νευρώνες οι APs καθοδηγούν τη δημιουργία του πολυγωνικού πλέγματος μέσω αλληλεπιδράσεων με το φωσφολιπίδιο $\text{PtdI}_{4,5}\text{P}_2$ and και τις πρωτεΐνες synaptotagmin I και κλαθρίνη. Αυτή η 'συναρμολόγηση' ενισχύεται περαιτέρω με τη δράση των epsin και AP180/CALM ²²⁴. Επιπλέον, η σταθεροποίηση του CCP απαιτεί την σύνδεση φορτίου-AP2-κλαθρίνης ²²⁵. Σε αυτό το στάδιο πρωτεΐνες που προσδένονται στην AP2, όπως οι endophilin και amphiphysin, στρατολογούνται και συνδράμουν στην πρόσδεση του φορτίου, στον πολυμερισμό της κλαθρίνης και την αναδίπλωση της μεμβράνης ^{226, 227}. Το ώριμο κυστίδιο της κλαθρίνης, ακόμη προσδεμένο στη πλασματική μεμβράνη, που περιέχει την πρωτεΐνη amphiphysin, προσελκύει την πρωτεΐνη Dynamin. Καθώς το κυστίδιο βαθαίνει προς το κυτταρόπλασμα η δυναμίνη πολυμερίζεται, σχηματίζοντας ένα δακτύλιο γύρω από το ανώτατο τμήμα του κυστιδίου. Η Dynamin με τη δράση της ως GTPάση, υδρολύει το GTP προκαλώντας εκτομή και απελευθέρωση του κυστιδίου στο κυτταρόπλασμα. Η τελική όψη του κυστιδίου είναι ένα ομοιόμορφο, συμμετρικό, πολυγωνικό πλέγμα, διαμέτρου 100-200nm ²²⁸.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρόλος των παραπάνω πρωτεϊνών δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος και δεν θα πρέπει να θεωρείται καθολικός για όλους τους RTKs (Receptor Tyrosine Kinases). Για παράδειγμα, η AP2 είναι απαραίτητη για τη συνεχόμενη ενδοκυττάρωση του υποδοχέα της τρανσφερίνης, όμως η συμμετοχή της στην ενδοκυττάρωση του EGFR είναι αμφισβητήσιμη. Δεδομένη είναι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων της οικογένειας TGF- β μέσω της κλαθρινο-εξαρτώμενης οδού, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός. Σε κάθε περίπτωση ένα σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (interactome) διαμεσολαβεί την εσωτερικοποίηση των φορτίων (εικόνα 11). Κομβικό ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες κλαθρίνη, AP2 και Dynamin.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση είναι η πιο καλά μελετημένη οδός που χρησιμοποιούν οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων. Εν τούτοις, τα φορτία

που ενδοκυτταρώνονται μέσω αυτής της οδού ποικίλουν. Αρκετά ιικά παθογόνα όπως οι ιοί Ebola, SARS, κορονοϊός και μερικοί ρετροϊοί εισέρχονται στο κύτταρο, μετά την πρόσδεση τους σε υποδοχείς που επάγουν και χρησιμοποιούν την οδό της κλαθρίνης (229). Η ενδοκυττάρωση του βακτηρίου *L. monocytogenes* σε κύτταρα HeLa αναστέλλεται με την αποσιώπηση των πρωτεϊνών CHC (clathrin heavy chain), dynamin, Eps15, αλλά όχι της AP2. Αυτό δείχνει ότι φορτία, ακόμη και 20 φορές μεγαλύτερα από το αναμενόμενο, μπορούν να αξιοποιήσουν το μηχανισμό ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης για να εισέλθουν σε κύτταρα που δεν πραγματοποιούν φαγοκυττάρωση, αναδεικνύοντας την ελαστικότητα (flexibility) που έχουν τα μονοπάτια της ενδοκυττάρωσης σε επίπεδο μεγέθους του φορτίου και όχι μόνο.



Εικόνα 11. Τα 5 βήματα της δημιουργίας και ενδοκυττάρωσης των επικαλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων. (α) Η 'πυρηνοποίηση' (nucleation), η διαλογή του φορτίου, η επικάλυψη του κυστιδίου, η απόσχιση και η αποβολή της επικάλυψης είναι η πορεία για την εσωτερικοποίηση του φορτίου. Κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες κλαθρίνη, AP2 και Dynamin. (β). Το σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν και ρυθμίζουν τη κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση²³⁰

1.3.8 Η ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη καβεολίνη

Ένα ακόμη σημαντικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης είναι αυτό της καβεολίνης. Τα καβεοσώματα (caveolae, 50-80nm) περιγράφηκαν αρχικά ως κυλινδρικές δομές (flask-shaped) από τον Palade το 1953 και λίγο αργότερα ταυτοποιήθηκε το βασικό συστατικό τους, η πρωτεΐνη καβεολίνη²³¹. Η καβεολίνη-1, μαζί με την καβεολίνη-2, συνθέτει τα καβεοσώματα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ενώ η καβεολίνη-3 στα μυϊκά κύτταρα²³². Η δράση των τριών πρωτεϊνών ενδεχομένως να διαφέρει, παρότι η μορφολογία των κυστιδίων που δημιουργούν είναι αρκετά συντηρημένη²³³.

Ο μηχανισμός δημιουργίας των καβεοσωμάτων έχει μελετηθεί αρκετά. Οι καβεολίνες 1 και 2 ολιγομερίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούν κυστίδια (οι υδρόφοβες περιοχές στο εσωτερικό και οι υδρόφιλες στο εξωτερικό) και ταυτόχρονα να επάγουν τη μετακίνηση και εγκόλπωση της μεμβράνης²³⁴. Η δημιουργία των καβεοσωμάτων εξαρτάται αποκλειστικά από την έκφραση της καβεολίνης, ανά κυτταρικό τύπο²³⁵. Η καβεολίνη προσδένεται άμεσα στη χοληστερόλη της μεμβράνης. Απώλεια χοληστερόλης οδηγεί στην εξαφάνιση των καβεοσωμάτων²³¹.

Το μονοπάτι της καβεολίνης χρησιμοποιείται από προσδέτες όπως η αλβουμίνη²³⁶, τοξίνες των βακτηρίων του τετάνου²³⁷ και της χολέρας²³⁸, αλλά και ιούς όπως ο poliovirus και ο SV40^{239, 240}. Για πολλές περιπτώσεις έχουν ταυτοποιηθεί υποδοχείς για συγκεκριμένα μόρια-φορτία, όμως το πώς τα φορτία μπορούν να συγκεντρώνονται στα καβεοσώματα δεν είναι γνωστό. Επίσης, δεν είναι κατανοητό εάν το μονοπάτι της καβεολίνης είναι συνεχώς ενεργό ή όχι, και εάν μπορεί να ενεργοποιηθεί υπό συγκεκριμένη επαγωγή.

Η καβεολίνη-1 ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά τη δράση των RTKs. Για παράδειγμα, οι υποδοχείς των EGF και NGF ρυθμίζονται αρνητικά, ενώ οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της ινσουλίνης θετικά. Η καβεολίνη αναστέλλει τη σηματοδότηση του EGF και την επαγόμενη από τον EGF μετανάστευση των κυττάρων. Αντίθετα, διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν την καβεολίνη-1, εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη λόγω αυξημένης αποικοδόμησης του υποδοχέα IR (insulin receptor). Η καβεολίνη-1 σταθεροποιεί τον IR στη μεμβράνη και περιορίζει τη συνεχή ενδοκυττάρωση, ανακύκλωση και αποικοδόμησή του. Επομένως, ο ρόλος και η σημασία της ενδοκυττάρωσης προσδέτη-υποδοχέα, μέσω της οδού που εξαρτάται από τη καβεολίνη δεν έχει αποσαφηνιστεί.

1.3.9 Τα υπόλοιπα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης

Υπάρχουν ακόμη αρκετά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης που παίρνουν το όνομά τους συνήθως από την απουσία σημαντικών πρωτεϊνών όπως η δυναμίνη, η κλαθρίνη και η καβεολίνη. Είναι εξαρτώμενα από τη χοληστερόλη και άλλα λιπίδια της μεμβράνης που σχηματίζουν λιπιδιακές σχεδίες (lipid rafts, raft-dependent endocytosis). Ένα τέτοιο μονοπάτι που ταυτοποιήθηκε πρόσφατα είναι το CLIC-GEEC (Clathrin Independent Carrier - GPI-AP-enriched early endosomal compartment). Επειδή τα στοιχεία για αυτές τις οδούς ενδοκυττάρωσης είναι αρκετά ελλιπή, δεν θα αναλυθούν περαιτέρω. Αρκετές πληροφορίες περιέχονται στις ανασκοπήσεις του Mayor^{178, 241}.

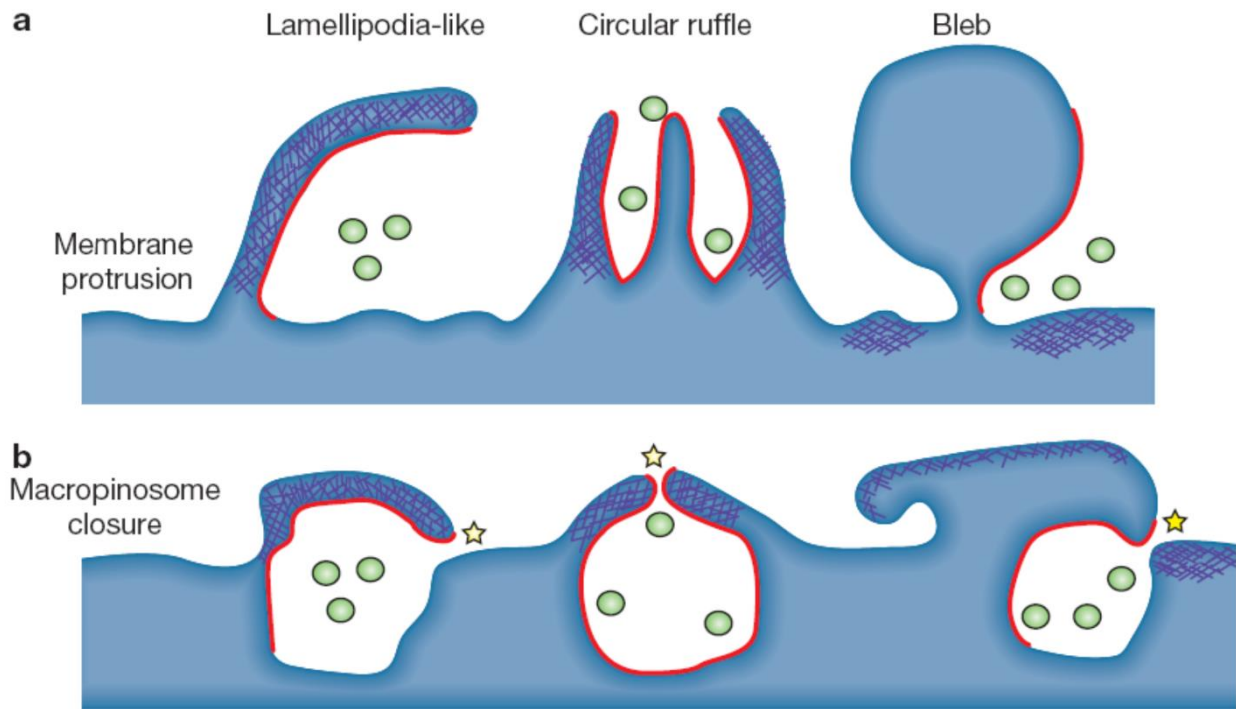
1.4 Μακροπινocyττάρωση

Η μακροπινocyττάρωση ορίζεται ως μια διαδικασία ενδοκυττάρωσης η οποία είναι παροδική· επάγεται από αυξητικούς παράγοντες και εξαρτάται από την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης, που ως αποτέλεσμα έχει την είσοδο εξωκυττάρου υγρού σε μεγάλα κυστίδια (χυμοτόπια, vacuoles). Πραγματοποιείται με αρκετά εκτεταμένη πτύχωση της μεμβράνης (membrane ruffling) προς την εξωκυττάρια πλευρά, μετά από ενεργοποίηση των ινιδίων της ακτίνης που συνδέονται με αυτή. Οι πτυχώσεις της μεμβράνης μπορούν να έχουν τη δομή μιας καμπυλωτής προέκτασης όπως τα lamellipodia, ατελούς κύκλου σε σχήμα τσέπης ή ακόμα και μιας μεμβρανικής προεξοχής σαν εξόγκωμα (bleb, εικόνα 12).

Αυτές οι δυναμικές προεξοχές προσφέρουν στη μεμβράνη την ενέργεια για το σχηματισμό των κυστιδίων, λίγα εκ των οποίων αποσχίζονται και εσωτερικοποιούνται στο κυτταρόπλασμα. Τα κυστίδια αυτά, που ονομάζονται μακροπινocσώματα, έχουν ετερογενές και ακαθόριστο σχήμα. Η διάμετρος τους κυμαίνεται από 0.5–10 μm , σαφώς μεγαλύτερα από τα κυστίδια της κλαθρίνης και της καβεολίνης²⁴². Εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες, βακτήρια, κυτταρικά υπολείμματα νέκρωσης ή απόπτωσης και ιοί μπορούν να επάγουν τη μακροπινocyττάρωση και να εισέλθουν στο κύτταρο μαζί με εξωκυττάριο υγρό. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την ενδοκυττάρωση στερεών σωμάτων στα κύτταρα που δεν διαθέτουν το μηχανισμό της φαγοκυττάρωσης^{243-248, 249, 250}.

1.4.1 Επαγωγή της μακροπινοκυττάρωσης

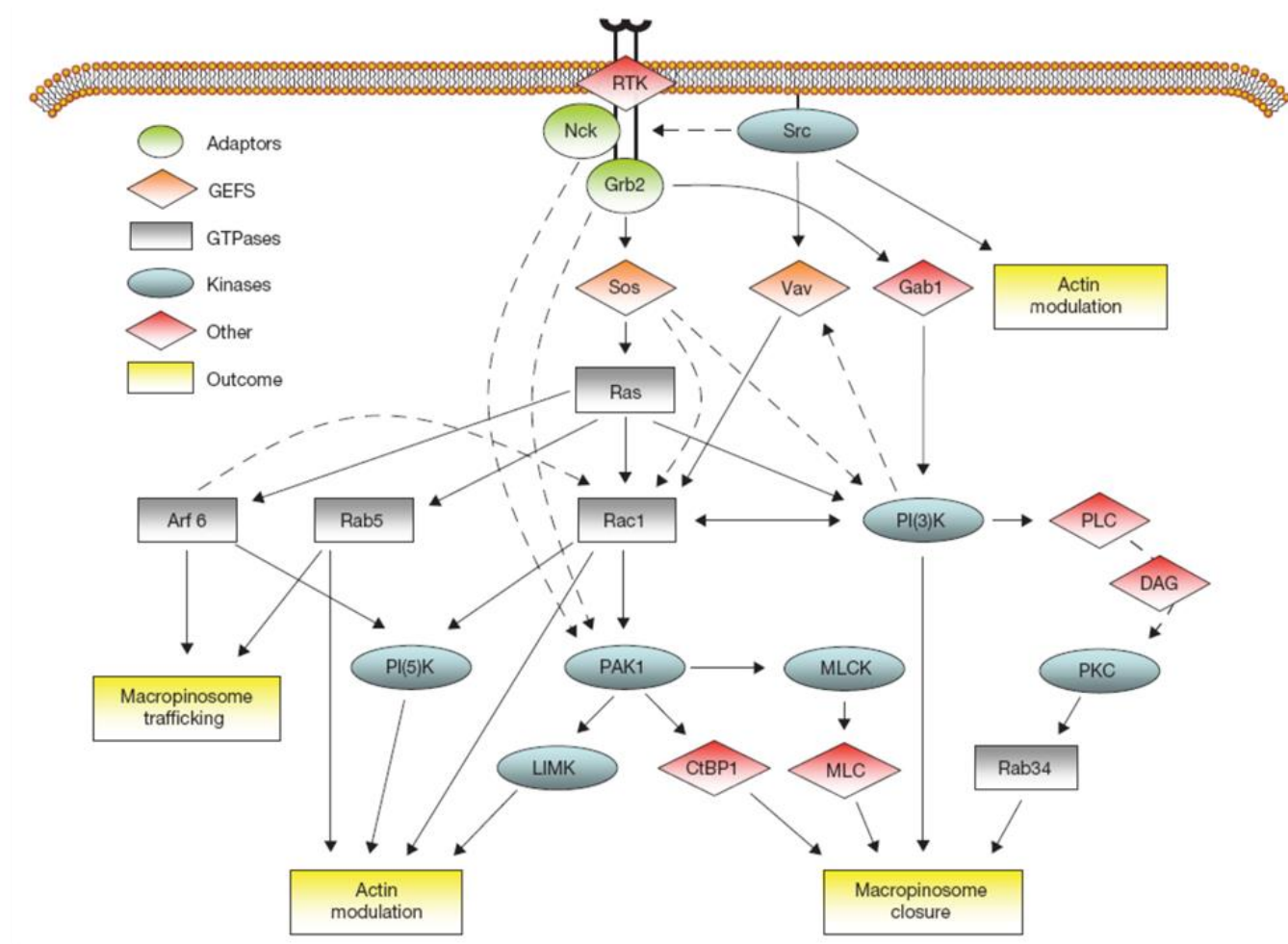
Οι κύριοι επαγωγείς της μακροπινοκυττάρωσης είναι αυξητικοί παράγοντες που προσδένονται σε υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs). Αυτοί με τη σειρά τους ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και την αναδίπλωση της μεμβράνης. Η μεταγωγή του σήματος και τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία παρουσιάζονται στην εικόνα 13 και θα αναλυθούν στη παρούσα ενότητα της εργασίας.



Εικόνα 12. Η δημιουργία των μακροπινοσωμάτων είναι εξαρτώμενη από την ακτίνη. (a) Οι πτυχώσεις της μεμβράνης προς τον εξωκυττάριο χώρο μπορούν να έχουν διαφορετική μορφολογία. (b) Τα μακροπινοσώματα σχηματίζονται όταν τα άκρα των πτυχώσεων ενώνονται με την πλασματική μεμβράνη και αποσχίζονται από αυτή ως αυτόνομα κυστίδια. Οι μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν την ακτίνη και οι κόκκινες τα τμήματα των πτυχώσεων που θα αποτελέσουν τη μεμβράνη του μακροπινοσώματος

Μικρές GTPάσες. Οι GTPάσες της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών Ras διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη μακροπινοκυττάρωση. Η ενεργοποίηση των Ras, από τους υποδοχείς RTKs, επάγει 3 παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια, με κομβικά μόρια τις Rac1, Rab5, Arf6 και τη κινάση PI3K

(phosphatidylinositol-3-kinase). Αυτές οι πρωτεΐνες δρουν συνεργιστικά με σκοπό την πτύχωση της μεμβράνης, το κλείσιμο των μακροπινωσμάτων και τη ενδοκυτταρική διακίνησή τους ^{251, 252}. Όταν ενεργοποιείται η Rac1, μια Rho GTPάση, δημιουργούνται οι 3 τύποι των πτυχώσεων της πλασματικής μεμβράνης (Εικ. 12) (253, 254), μέσω πρωτεϊνών-τελεστών του πολυμερισμού της ακτίνης, και της συστολής η οποία εξαρτάται από τη μυοσίνη.



Εικόνα 13. Η μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) ενεργοποιεί τη μακροπινωκυττάρωση. Το σύνθετο δίκτυο μορίων περιλαμβάνει GTPάσες, κινάσες, φωσφατάσες, φωσφολιπάσες, μυοσίνες και παράγοντες σύντηξης/απόσχισης μεμβρανών. Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζουν τη ενδοκυτταρική οδό της μακροπινωκυττάρωσης. Τα συνεχή βέλη συμβολίζουν την άμεση αλλοστερική αλληλεπίδραση, ή κατάλυση και τα διακεκομμένα βέλη τις αλληλεπιδράσεις που δρουν ως ενισχυτές στη μεταγωγή του σήματος

Επίσης, μια σημαντική GTPάση, η Rab5, γνωστή για το ρόλο της στα πρώιμα ενδοσώματα, ενεργοποιείται και στρατολογείται στις κυκλικές πτυχώσεις της μεμβράνης. Εκεί, μαζί με τον τελεστή RN-tre (Rab5 GAP/effector), αλληλεπιδρά με την F-ακτίνη προάγοντας την παράλληλη σύνδεση των ινιδίων της ακτίνης στις μεμβρανικές προεξοχές ²⁵¹.

Η πρωτεΐνη Rabankyrin-5, ένας ακόμη τελεστής της Rab5, σχετίζεται με τα νεοσχηματισμένα μακροπινোসώματα, και πιθανότατα στρατολογεί τη Rab5 σε αυτά ²⁵⁵. Η Rabankyrin-5 χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη μάρτυρας των μακροπινωσμάτων, παρότι εντοπίζεται και στα πρώιμα ενδοσώματα κατά τη σύντηξη των δύο κυστιδιακών διαμερισμάτων. Όπως θα αναλυθεί στην ενότητα των αποτελεσμάτων, η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει ενεργά στην ενδοκυττάρωση και σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α.

Η πρωτεΐνη Arf6, μία ARF GTPάση με πολλές λειτουργίες, εμπλέκεται στη μακροπινοκυττάρωση, καθώς επάγει την ανακύκληση της Rac1 στην πλασματική μεμβράνη ²⁵⁶⁻²⁶⁰. Η ενεργοποίηση της Arf6 από τις GEFs (Guanine Exchange Factors), EFA6 ή ARNO, ενδέχεται να πυροδοτεί τη μακροπινοκυττάρωση ανεξάρτητα από τις Ras ^{261, 262}. Οι λειτουργίες των τελεστών που ενεργοποιούνται από τις Ras και Arfs, αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό, υποδηλώνοντας συνεργιστική δράση κατά τη διάρκεια της επαγόμενης από τη Ras μακροπινοκυττάρωσης. Τέλος, η Arf6 επηρεάζει την ενδοκυτταρική διακίνηση των μακροπινωσμάτων ^{243, 263}.

Κινάσες. Η μακροπινοκυττάρωση βασίζεται στη δράση πολλών διαφορετικών κινασών ²⁶⁴. Μία από τις σημαντικότερες είναι η Pak1 (p21-activated kinase 1), κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται από τις Rac1 ή Cdc42. Η Pak1 ρυθμίζει την κινητικότητα και δυναμική του κυτταροσκελετού και απαιτείται σε όλα τα στάδια της μακροπινοκυττάρωσης ²⁶⁵⁻²⁶⁷, καθώς ενεργοποιεί τελεστές που χρειάζονται για τη δημιουργία των πτυχώσεων, των εξογκωμάτων και τελικά των μακροπινωσμάτων ²⁶⁸⁻²⁷⁰. Επιπρόσθετα, η Pak1 φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CtBP1/Bars (Carboxy-terminal-Binding Protein-1/Brefeldin A-ADP ribosylated substrate), ο οποίος είναι καθοριστικός για την ολοκλήρωση της εγκόλπωσης της μεμβράνης, το 'κλείσιμο' των μακροπινωσμάτων ²⁶⁵. Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) ενεργοποιείται από τους υποδοχείς RTKs ή την κινάση PI(3) και επάγει την αναδίπλωση της μεμβράνης ^{271, 272}, χωρίς να είναι ξεκάθαρος ο ρόλος της ²⁵⁴. Πολλές ακόμη κινάσες εμπλέκονται είτε στην ενίσχυση

της σηματοδότησης από τους αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους, είτε στην ίδια τη διαδικασία της μακροπινοκυττάρωσης.

Άλλοι παράγοντες. Ο διάυλος ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στη μακροπινοκυττάρωση. Τόσο ενεργά που αναστολείς του διαύλου, όπως το amiloride και το EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride), παρεμποδίζουν αποτελεσματικά τη μακροπινοκυττάρωση και χρησιμοποιούνται εκτενώς σε πειραματικά πρωτόκολλα. Οι αναστολείς αυτοί παρεμποδίζουν την άνοδο του pH στην ενδοκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και αναστέλλουν τη μεταγωγή του σήματος από τις πρωτεΐνες Rac1 και Cdc42 ^{273, 274}.

Επιπρόσθετα, πολύ σημαντικά σε αυτό το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, όπως και στα υπόλοιπα, είναι τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης. Τα φωσφοινοσίδια είναι βασικοί ρυθμιστές της ενδοκυττάρωσης και της ενδοκυτταρικής διακίνησης, γι' αυτό και παρουσιάστηκαν αναλυτικά στην ενότητα 1.3.4.1. Στη μακροπινοκυττάρωση τα επίπεδα του PI(4,5)P₂ είναι πολύ αυξημένα στις πτυχώσεις της μεμβράνης. Η κινάση PI4P5K καταλύει τη δημιουργία του PI(4,5)P₂ από το PI(4)P. Τόσο η Rac1 όσο και η ARF6 φωσφορυλιώνουν την κινάση PI(4)P(5)K. Το φωσφολιπίδιο PI(4,5)P₂ προσδένεται σε πρωτεΐνες που επάγουν τον πολυμερισμό της ακτίνης και την αναδιοργάνωση των ινιδίων, διαδικασίες αναγκαίες για την αναδίπλωση της μεμβράνης και το σχηματισμό των μακροπινωσμάτων. Ένα προτεινόμενο μοντέλο για τη συμμετοχή και τη σειρά δράσης που αφορά τις GTPάσες, τις κινάσες και τα φωσφοινοσίδια παρουσιάζεται στην εικόνα 14.

Με έρευνες που ξεκίνησαν στον *C.Elegans* ταυτοποιήθηκαν φωσφατάσες που κρίνονται απαραίτητες για την επιτυχή ολοκλήρωση της μακροπινοκυττάρωσης, μεταξύ των οποίων η φωσφατάση INPP4 (inositol polyphosphate 4-phosphatase) και οι πρωτεΐνες MTMRs (myotubularin-related proteins). Οι MTMR6 και MTMR9^{282, 283} είναι αναγκαίες για την επαγόμενη από τον EGF μακροπινοκυττάρωση στα κύτταρα A431, καθώς η αποικοδόμηση του λιπιδίου PI₃P σε PI, είναι καθοριστική για τη δημιουργία των μακροπινωσμάτων²⁸⁴. Εφόσον η MTMR6 είναι μία 3-φωσφατάση²⁸⁵, το λιπίδιο PI(3,4)P₂ πρέπει αρχικά να αποφωσφορυλιωθεί από μία 4-φωσφατάση, ώστε να προκύψει το υπόστρωμα της MTMR6, το PI(3)P. Αυτή η 4-φωσφατάση είναι η INPP4, και είναι το ίδιο απαραίτητη για τη μακροπινοκυττάρωση στα A431²⁸⁴. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι μετά την επαγωγή της διαδικασίας και την αναδίπλωση της μεμβράνης (ruffling), το 'κλείσιμο' των πτυχώσεων για το σχηματισμό των μακροπινωσμάτων, απαιτεί την σταδιακή αποικοδόμηση του PI_{3,4,5}P₃ σε PI από ειδικές φωσφατάσες.

Μετά την απόσχιση από την πλασματική μεμβράνη τα μακροπινωσώματα κινούνται 'βαθύτερα' προς το κυτταρόπλασμα. Είναι ευαίσθητα σε αλλαγές του κυτταροπλασματικού pH και υφίστανται οξείδωση προκειμένου να υποστούν ομο- ή ετεροτυπική σύζευξη^{273, 286}. Στα μακροφάγα η τύχη τους είναι παρόμοια με εκείνη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Η ωρίμανση τους περιλαμβάνει τη στρατολόγηση ή απομάκρυνση κλασικών πρωτεϊνών των πρώιμων και όψιμων ενδοσωμάτων πριν τη σύζευξη με τα λυσοσώματα²⁸⁷.

Στα καρκινικά κύτταρα A431, τα περισσότερα μακροπινωσώματα ανακυκλώνονται πίσω στην πλασματική μεμβράνη²⁷³. Παρόλα αυτά, τα μακροπινωσώματα προσελκύουν πρωτεΐνες των πρώιμων ενδοσωμάτων και συζεύγνυνται μαζί τους, απελευθερώνοντας το φορτίο τους στα πρώιμα ενδοσώματα^{288, 289}. Οι πρωτεΐνες SNX1 και SNX5 εντοπίζονται στα μακροπινωσώματα και θεωρούνται υπεύθυνες για την ωρίμανση και την ανακύκληση των μακροπινωσμάτων²⁹⁰⁻²⁹². Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι δεν υπάρχει μια γενική παραδοχή, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, για την τελική κατάληξη των μακροπινωσμάτων. Η ενδοκυτταρική διακίνησή τους θεωρείται ότι καθορίζεται από τον κυτταρικό τύπο και τον τρόπο που αρχικά επάγεται η μακροπινοκυττάρωση.

1.4.3 Η σύνδεση μεταξύ σηματοδότησης TGF-β/Ακτιβίνης Α και κυστιδιακής διακίνησης των υποδοχέων

Για πολλά χρόνια η ενδοκυττάρωση θεωρούνταν μια διαδικασία που μόνο σκοπό είχε την αποδόμηση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Αυτό αμφισβητήθηκε ολοένα και περισσότερο, ξεκινώντας από μία αρχική μελέτη του Di Guglielmo, στην οποία για πρώτη φορά εντοπίστηκαν υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs), μαζί με τους τελεστές τους, στο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα των πρώιμων ενδοσωμάτων^{293, 294}. Πλέον είναι τεκμηριωμένο ότι μεμβρανικές δομές, όπως τα πρώιμα ενδοσώματα, δρουν ως πλατφόρμες σηματοδότησης²⁹⁵ και ενδεχομένως να υπάρχει πληθυσμός ενδοσωμάτων σηματοδότησης τα οποία είναι εξειδικευμένα για αυτή τη λειτουργία¹⁹⁷. Επίσης, στο ίδιο πρώιμο ενδόσωμα υπάρχουν υποπεριοχές (sub domains) με διαφορετική σύσταση που επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες^{179, 189}, καθορίζοντας την ένταση και τη διάρκεια του σήματος, αλλά και τη σύντηξη με διαμερίσματα όπως τα ενδοσώματα ανακύκλησης ή τα λυσοσώματα. Επιπρόσθετα, η μεταφορά από τα πρώιμα στα όψιμα ενδοσώματα ελέγχεται από την πρωτεΐνη-φορτίο (cargo) και έτσι, ενεργοποιημένοι υποδοχείς μπορούν να μεταβάλλουν την κινητική αυτή ρυθμίζοντας τη διάρκεια του σήματος²⁹⁶.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης επηρεάζουν τη σηματοδότηση που επάγεται από διαφορετικούς προσδέτες, αλλά και αντίστροφα, σηματοδοτικά μονοπάτια επάγουν και ρυθμίζουν την ενδοκυττάρωση, καταδεικνύοντας ότι σηματοδότηση και ενδοκυττάρωση είναι διαδικασίες αλληλένδετες και αλληλορυθμιζόμενες^{297, 298}. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές οδοί ενδοκυττάρωσης, οι οποίες έχουν αναλυθεί προηγουμένως^{299, 197, 300, 177}. Γίνεται πλέον αντιληπτό, ότι η κατανόηση των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της θα μας επιτρέψει να κατανοήσουμε πώς ρυθμίζεται η σηματοδότηση αυτής της σημαντικής κυτοκίνης.

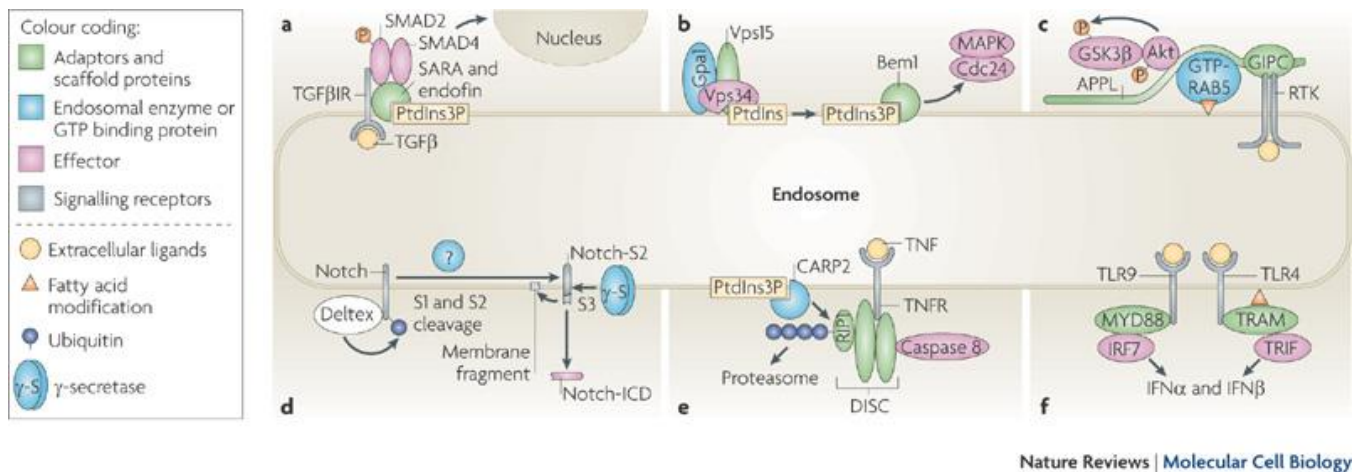
1.4.4 Είναι η ενδοκυττάρωση απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF-β σηματοδότηση; - Προηγούμενη Γνώση

Η παρουσία των πρωτεϊνών SARA, Hgs, και Endofin στα πρώιμα ενδοσώματα (εικόνα 15) εγείρει το ερώτημα εάν η ενδοκυττάρωση των ενεργοποιημένων υποδοχέων απαιτείται για τη σηματοδότηση από τον TGF-β, ή η σηματοδότηση προάγεται από τη μεμβράνη και μόνο. Το ερώτημα παραμένει αναπάντητο καθώς οι μελέτες παρουσιάζουν διφορούμενα αποτελέσματα, αντανakλώντας ίσως τις

διαφορές στις πειραματικές προσεγγίσεις. Οι υποδοχείς τύπου I, TβRI (ALK5) και τύπου II, TβRII υφίστανται συνεχή εσωτερικοποίηση, απουσία προσδέματος, μέσω της κλαθρινο-εξαρτώμενης οδού.^{301, 302}. Παρουσία προσδέματος δεν φαίνεται να επηρεάζεται ο ρυθμός της ενδοκυττάρωσης και της ανακύκλησης των υποδοχέων³⁰¹. Πολλές ερευνητικές ομάδες, με διαφορετικούς τρόπους, δείχνουν ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων του TGF-β είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος^{303, 304, 305}. Πιο πρόσφατα μια μελέτη από τον Chen και τους συνεργάτες του, έδειξε ότι αναστολείς της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης προκαλούν συσσώρευση του υποδοχέα TβR-I και της πρωτεΐνης SARA στην πλασματική μεμβράνη και ενίσχυση της σηματοδότησης από το TGF-β. Ο χημικός αναστολέας Dynasore, που παρεμποδίζει τη δράση της GTPάσης δυναμίνης, ήταν ο πιο ισχυρός ανάμεσα σε αυτούς που δοκιμάστηκαν³⁰⁶.

Πρόσθετες μελέτες έδειξαν ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων TGF-β, μέσω της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης στα θετικά για EEA1 και SARA ενδοσώματα, προάγει την σηματοδότηση. Μελέτες του εργαστηρίου μας δείχνουν ότι η υπερέκφραση της SARA στην οποία έχει αφαιρεθεί η FYVE περιοχή (που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων), έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης από τον TGF-β³⁰⁷. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ ενός θετικού ρόλου της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης. Αντίθετα, η ενδοκυττάρωση στα κυστίδια της καβεολίνης, όπου εντοπίζονται η SMAD7 και η Smurf2, ευνοεί την ουβικουϊτίνωση των υποδοχέων και την αποδόμησή τους. Επομένως, η μεταφορά των υποδοχέων στα πρώιμα ενδοσώματα, θετικά για τη SARA, προστατεύει τους υποδοχείς από την αποδόμηση³⁰⁸.

Φυσικά, υπάρχουν κι έρευνες με αντίθετα αποτελέσματα. Στη μελέτη του Mitchel και των συνεργατών του χρησιμοποιήθηκε η ένωση Nystatin, η οποία αναστέλλει το μονοπάτι της καβεολίνης, και δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στην ενδοκυττάρωση και την αποδόμηση των υποδοχέων. Επίσης, δεν υπήρξε συνεντοπισμός των υποδοχέων του TGF-β με τη καβεολίνη-1³⁰². Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται στη μελέτη των Lu και των συνεργατών του³⁰¹.



Εικόνα 15. Διάφορα σύμπλοκα σηματοδότησης που σχηματίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα.

Στο **a** διακρίνεται η στρατολόγηση των SMAD2 και SMAD4 στο πρώιμο ενδόσωμα από τις πρωτεΐνες SARA (SMAD anchor for receptor activation) και endofin, που ευνοεί τη φωσφορυλίωση της SMAD2 από τους υποδοχείς TGF-β που έχουν ενδοκυτταρωθεί³⁰⁹

Όσον αφορά την Ακτιβίνη Α υπάρχουν λίγες και αντικρουόμενες αναφορές. Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή του υποδοχέα ALK4, ο Alk4W477A, ο οποίος δεν υφίσταται ενδοκυττάρωση, όμως διατηρεί την ικανότητά του να μεταγεί τη σηματοδότηση. Παρουσία του προσδέτη η σηματοδότηση επάγεται κανονικά, χωρίς να απαιτείται ενδοκυττάρωση του ALK4³¹⁰. Σε μία πρόσφατη μελέτη του Hageman και των συνεργατών του, χρησιμοποιήθηκε κυρίως η συνεχώς ανενεργή μορφή της Rab5, με συμπέρασμα ότι η ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης και των υποδοχέων της δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος³¹¹. Αντίθετα, σε μια λεπτομερή μελέτη, η αναστολή της ενδοκυττάρωσης, με κυρίαρχα αρνητικές μορφές της δυναμίνης, μειώνει τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α σε κύτταρα Χενopus. Επίσης, η διάρκεια της σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α φαίνεται να εξαρτάται από το χρόνο που το σύμπλοκο Ακτιβίνης/υποδοχέων βρίσκεται στο μονοπάτι των πρώιμων ενδοσωμάτων/λυσosσωμάτων. Τέλος, στην ίδια έρευνα η ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης Α στα πρώιμα ενδοσώματα κρίνεται απαραίτητη και συμβαίνει ανοδικά της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης SMAD2

ΣΚΟΠΟΣ

Η Ακτιβίνη Α είναι μέλος της υπερικογενείας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF- β) και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεών της. Οι δραστηριότητές της εκτείνονται από την ενεργοποίηση της σύνθεσης και απέκκρισης της θυλακιοτρόπου ορμόνης, έως και τη ρύθμιση της απόπτωσης, της ίνωσης και της φλεγμονής. Επίσης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και κατά την ανάπτυξη, ως μορφογόνο, επηρεάζοντας τόσο τη διαφοροποίηση όσο και την κατάσταση πολυδυναμίας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, η ερευνητική μας ομάδα έχει αναδείξει το ρόλο της Ακτιβίνης Α ως αναστολέα της αγγειογένεσης, δείχνοντας ότι η ενίσχυση του *MYCN* ογκογονιδίου μειώνει την έκφραση της Ακτιβίνης Α σε νευροβλαστώματα. Η επανέκφρασή της, υπό διαφορετικό υποκινητή, στα ίδια κύτταρα με υψηλή έκφραση του *MYCN* ογκογονιδίου, δημιουργεί ξενομοσχευματικούς όγκους σε ποντίκια, οι οποίοι αυξάνονται με βραδύτητα λόγω έλλειψης αγγείων.

Είναι λοιπόν σαφές ότι η Ακτιβίνη Α έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από πλευράς βασικής έρευνας, ενώ παράλληλα μπορεί να αποτελέσει στόχο ιατρικών εφαρμογών. Στα πλαίσια αυτά, η λεπτομερής διερεύνηση του μηχανισμού μεταγωγής του σήματός της είναι επιβεβλημένη. Η βασική κυτταρική σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α μεταάγεται μέσω των υποδοχέων της, ActRIIA, ActRIIB και ALK4 και των δεύτερων μεταβιβαστών, SMAD2 και 3. Η ενδοκυττάρωση και η ενδοκυτταρική διακίνηση του συμπλέγματος Ακτιβίνης Α/υποδοχέων, ενδέχεται να έχουν σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης. Εν τούτοις, η κατανόηση του ρυθμιστικού τους ρόλου στην τελική έκβαση της μεταγωγής του σήματος έχει πολλά κενά. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να καλύψει μερικά από αυτά τα κενά. Συγκεκριμένα, η διατριβή εστιάζει:

- Στην διαλεύκανση των οδών ενδοκυττάρωσης της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της, παρουσία ή απουσία προσδέματος.
- Στη διερεύνηση των επιπτώσεων συγκεκριμένων παρεμβάσεων στις οδούς ενδοκυττάρωσης της Ακτιβίνης Α σε σχέση με τη βιολογική της δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- Στη μελέτη των οδών ενδοκυττάρωσης της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα και η σύγκριση των ρυθμιστικών μηχανισμών μεταξύ πολυδύναμων και διαφοροποιημένων κυττάρων.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Αντισώματα και αυξητικοί παράγοντες

Η Ακτιβίνη Α (Activin A) που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια ευγενική προσφορά των Yuzuru Etoh (Ajinomoto Co., Japan) και Marko Hyvonen (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK). Ο ανθρώπινος αγγειακός αυξητικός παράγοντας VEGF165 καθώς και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας FGF2 ή Bfgf (Basic fibroblast growth factor) αγοράστηκαν από την εταιρεία ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Germany). Ο ανασυνδυασμένος αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1 (Transforming growth factor-β1, TGFβ1) είναι της εταιρείας Peprotech (New Jersey, USA). Οι μορφογενετικοί παράγοντες των οστών BMP-2 και BMP-4 αποκτήθηκαν από την εταιρεία Immunotools και Gibco αντίστοιχα.

Το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου α-EEA1 προσφέρθηκε από τον Marino Zerial (MPICBG, Dresden, Germany). Τα αντισώματα, α-Rab5a (Aviva systems biology), α-APPL2 (Abnova), α-caveolin-1 (Santa Cruz), α-EEA1 (Transduction Laboratories), α-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), α-HA (Roche), α-SMAD2/3 (Cell Signaling), α-p-SMAD2 (Cell Signaling), α-p-SMAD3 (Rockland), α-p-p-38, α-GFP (Roche) και α-actin (Chemicon), χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες ανοσοφθορισμού, ανοσοκατακρήμνισης ή ανοσοαποτύπωσης. Το 9E10 (α-myc) μονοκλωνικό αντίσωμα καθαρίστηκε από το αντίστοιχο υβρίδωμα (hybridoma) χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές.

Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης καθώς και τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθειανική φλουορεσκεΐνη (FITC), ισοθειανική ροδαμίνη (TRITC) ή με τις κυανίνες Cy3 και Cy5, που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες του ανοσοφθορισμού αγοράστηκαν από την εταιρεία Jackson-Dianova (GmbH, Hamburg, Germany). Τέλος ο σημασμένος πολυσακχαρίτης Dextran-TexasRed αγοράστηκε από την εταιρεία Molecular Probes.

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης πρωτεϊνών και μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs

Για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί πλασμιδιακοί φορείς. Για τον υποδοχέα της Ακτιβίνης τύπου I (ALK4) τα πλασμίδια pcDNA3-HA-ALK4wt, PCDNA3-ALK4-Myc (extracellularly tagged), Pcmv-ALK4-HA, Myc-ALK4, Flag-ALK4, Pcr2.1-ALK4 (dominant negative), Pcr2.1-ALK4 (constitutively active). Για τον υποδοχέα τύπου II (ActRIIB) τα πλασμίδια Prk5-ActRIIB-Myc, Prk5-ActRIIB-Flag. Για τα πειράματα μικροσκοπίας FRET έγινε διαμόλυνση με τους πλασμιδιακούς φορείς PeYFP-N1, PeYFP-N1-ALK4 wt, YFP-N1-p38, PeYFP-N1-EGFR, PeCFP-N1 και PeCFP-N1-BMPRII.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές Peyfp-N1-APPL1, Pegfp-N3-AP2β1, Pcmv-Rab5a, pcDNA3-HA-Rab4a, pcDNA3-HA-Rab7, Prk5-BMPRII-Flag. Οι κατασκευές των Pegfp-C3-rab4a, Pegfp-C3-Rab11, Pegfp-C3-hRab5a, Pegfp-C1-Rab7, Peyfp-C1-Rabankyrin-5 προσφέρθηκαν από τον Marino Zerial (MPI-CBG, Dresden, Germany), ενώ η κατασκευή pcDNA3-myc-Rabenosyn-5 προσφέρθηκε από τον Σάββα Χριστοφορίδη (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική σχολή, Ελλάδα).

Τα μικρά παρεμβαλλόμενα ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs) που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση των πειραμάτων προέρχονται από την εταιρείες Ambion, Applied Biosystems, Bionspring (caveolin-1), και απεικονίζονται στον πίνακα 2.1.2. Ως ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχου (Scrambled, Scr) χρησιμοποιήθηκε, σε κάθε πείραμα, ολιγονουκλεοτίδιο με τυχαία αλληλουχία που δεν είναι συμπληρωματικό με κανένα mRNA του κυττάρου.

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	siRNA ID
		siRNA1
CLTC	Clathrin Heavy Chain (CHC)	107566
CAV1	Caveolin-1	111339_A
ANKFY1	Rabankyrin-5	HSS122255
ACVR1b	ALK4	1331
ACVR2b	ActRIIB	5270555
CTBP1	CtBP1	HSS102437

Πίνακας 2.1.2. Μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs)

2.1.3 Χημικές ουσίες-αναστολείς

Η χημική ουσία EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride) αγοράστηκε από την εταιρία Sigma, και χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της μακροπinoκυττάρωσης. Η EIPA είναι ειδικός αναστολέας της αντλίας ανταλλαγής Na^+/H^+ , γεγονός που οδηγεί στη μείωση του Ph στην ενδοκυττάρια πλευρά της μεμβράνης, με συνέπεια να αναστέλλεται η σηματοδότηση από τις πρωτεΐνες Rac1 και Cdc42. Για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιήθηκε η κυτοχαλασίνη D (Cytochalasin D, Sigma), ένας διαπερατός αναστολέας του πολυμερισμού της ακτίνης. Η κυτοχαλασίνη D είναι μέλος της οικογένειας των μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες, κυρίως του γένους *helminthosporium*. Θεωρείται ότι προσδένεται στην F-ακτίνη αποτρέποντας τη δημιουργία των ινιδίων της. Έτσι παρεμποδίζονται οι κινήσεις της μεμβράνης που συμβαίνουν κατά τη μακροπinoκυττάρωση. Η χημική ένωση LY294002 (Sigma) είναι ένας φαρμακευτικός αναστολέας που παρεμποδίζει αντιστρεπτά τη δράση των κινασών PI3 (PI3Ks). Με βάση τη βιβλιογραφία, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που παρατηρείται κατά τη μακροπinoκυττάρωση, απαιτεί τη φωσφορυλίωση καθοδικών πρωτεϊνών από τις κινάσες PI3^{277, 280, 313}.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.2.1 Καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

A. Κύτταρα HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Τα HUVEC είναι ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα που απομονώνονται από τη φλέβα του ομφάλιου λώρου νεογνού. Το πρωτόκολλο απομόνωσής τους περιγράφεται παρακάτω, στην ενότητα 2.2.2. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm, τα οποία προηγουμένως επωάζονται, για 30 λεπτά στους 37 °C, με 5ml κολλαγόνο αρουαίου τύπου I, συγκέντρωσης 50μg/ml (Sigma). Ακολουθεί πλύση του τρυβλίου με 10ml διαλύματος φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS), και επίστρωση των κυττάρων. Η ανάπτυξη των κυττάρων HUVEC γίνεται σε θρεπτικό υλικό M199 (Life Technologies) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 0,08mg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 0,05U/ml ηπαρίνη, 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη. Όλο το θρεπτικό υλικό φιλτράρεται για κατακράτηση τυχών αδιάλυτων σωματιδίων. Για τις ανάγκες των πειραμάτων της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2-5 από την στιγμή της απομόνωσης.

Β. Κύτταρα HEK 293T (Human Embryonic Kidney). Είναι μετασχηματισμένα επιθηλιακά εμβρυικά κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο νεφρό. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Life Technologies), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη.

Γ. Κύτταρα HEK293A. Αυτή η κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των αδενοϊών. Καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FCS, 1% NEA (Non Essential Aminoacids) και 4,8gr/L D-γλυκόζης.

Δ. Κύτταρα HeLa. Αθανατοποιημένα καρκινικά κύτταρα από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1951 από την ασθενή Henrietta Lacks, από την οποία προέρχεται και το όνομά τους. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Life technologies), με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 2mM γλουταμίνη.

Ε. Κύτταρα A431. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από το δέρμα 85άχρονης καρκινοπαθούς. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Life technologies) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, 10% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη.

Ε. Βλαστικές σειρές. Η καλλιέργεια των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (hESCs) και των ανθρώπινων επαναπρογραμματισμένων βλαστικών κυττάρων (hiPSCs) γίνεται στο θρεπτικό μέσο mTeSRTM1 (Stem Cell Technologies). Πρόκειται για ένα πλήρως χημικώς καθορισμένο μέσο, απαλλαγμένο από ξеноβιοτικούς παράγοντες και ορό ζώων. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από διαφοροποίηση των hESCs και hiPSCs καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό Pericytic Medium (PM, ScienCell). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από λιπώδη ιστό (MSCs) καλλιεργούνται στο μέσο ADSC (Lonza). Τέλος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προερχόμενα από διαφοροποίηση των hESCs και hiPSCs, καλλιεργούνται στο πλήρες θρεπτικό υλικό των HUVEC (2.2.1 A).

Όλα τα μέσα καλλιέργειας των κυττάρων, εκτός των βλαστικών, αγοράστηκαν από την εταιρεία Life Technologies. Το εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) απομονώθηκε από εγκέφαλο βοός και ήταν ελεύθερο από ενδοτοξίνες. Ο χειρισμός τους πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37 °C, ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ και συνθήκες υγρασίας.

2.2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη φλέβα ομφάλιων λώρων νεογνών

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) απομονώνονται από τη φλέβα ομφάλιων λώρων νεογνών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Jaffe και τους συνεργάτες του ³¹⁴. Μέχρι την επεξεργασία τους, οι ομφάλιοι λώροι διατηρούνται σε διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS), και στο πάγο. Αρχικά, οι λώροι πλένονται εξωτερικά με PBS. Στη συνέχεια εντοπίζεται η φλέβα του λώρου με ψηλάφηση και διανοίγεται, και από τις δύο πλευρές. Τοποθετούνται βαλβίδες τριών σημείων (three way stop cocks, πεταλούδες), οι οποίες δένονται με χειρουργικό νήμα. Ακολουθούν πλύσεις του λώρου εντός της φλέβας με PBS, μέχρις ότου απομακρυνθεί το αίμα και το διάλυμα να εξέρχεται καθαρό. Με τη βοήθεια μια σύριγγας η φλέβα διαποτίζεται από τη μία πλευρά με τον μέγιστο όγκο διαλύματος κολλαγενάσης σε PBS (0,1%, Collagenase type IA, Sigma), ενώ στη συνέχεια οι λώροι επωάζονται στους 37 °C για 12 λεπτά (εντός βάζου με προθερμασμένο PBS). Μετά από 12 λεπτά, το διάλυμα αυτό συλλέγεται μαζί με τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί, εφαρμόζοντας 2 σύριγγες στα δύο άκρα του λώρου. Η μία περιέχει θρεπτικό υλικό M199 5% FBS, που απενεργοποιεί το ένζυμο κολλαγενάση, ενώ η άλλη είναι κενή. Ασκώντας πίεση το θρεπτικό μεταφέρεται κατά μήκος του λώρου, από τη μία πλευρά στην άλλη, συμπαρασύροντας τα αποκολλημένα κύτταρα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές και το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1700rpm και σε θερμοκρασία 24 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, κατάλληλο για τα κύτταρα HUVEC, και επιστρώνονται σε τρυβλία των 10 cm. Τα τρυβλία υφίσταται προηγουμένως επεξεργασία με 4ml κολλαγόνο αρουραίου τύπου I (συγκέντρωσης 50μg/ml), επωάζονται για 30 λεπτά σε κλίβανο (37 °C, 5% CO₂), και πλένονται δύο φορές με 10ml PBS.

2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με DNA και siRNA

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν διάφορες κυτταρικές σειρές και για τη διαμόλυνση τους με πλασμιδιακά DNA αρκετά αντιδραστήρια του εμπορίου, με βάση τις προτεινόμενες οδηγίες του εκάστοτε κατασκευαστή. Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVEC) διαμολύνθηκαν με το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontex). Τα καρκινικά κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τα λιπίδια Effectene (Qiagen) και Lipofectamine (Invitrogen). Για τα κύτταρα HEK 293 χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Eugene 6 και X-tremeGene 9 της εταιρείας Roche. Σε κάθε περίπτωση, εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά, 4 ώρες μετά τη διαμόλυνση το θρεπτικό μέσο των κυττάρων αντικαθίσταται με νέο πλήρες θρεπτικό μέσο και ακολουθεί επώαση σε κλίβανο 37°C και 5% CO₂, για 24-48 ώρες.

Για τη διαμόλυνση των κυττάρων HUVEC με μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs) χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο RNAiMax (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Η αραίωση των αντιδραστηρίων έγινε στο χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό υλικό OptiMEM I (Invitrogen). Η τελική συγκέντρωση του κάθε siRNA ήταν 5, 20 ή 50nM (για κάθε siRNA χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση για την καλύτερη δυνατή αποσιώπηση). Εν συντομία, για ένα τρυβλίο των 12 φρεατίων, το siRNA και το λιπίδιο αραιώνονται σε 125μl OptiMEM έκαστο, αναμιγνύονται, επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και προστίθενται στο πηγάδι. Τα κύτταρα στο τρυβλίο καλλιεργούνται στο θρεπτικό μέσο OptiMEM. Μετά από 5 ώρες, το μίγμα διαμόλυνσης αντικαθίσταται με το πλήρες μέσο καλλιέργειας των κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες σε κλίβανο (37°C και 5% CO₂) και κατόπιν χρησιμοποιούνται στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες.

2.2.4 Κατασκευή Ανασυνδυσασμένων Αδενοϊών

Οι ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν τους υποδοχείς HA-ALK4 και FLAG-ActRIIB αγρίου τύπου κατασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των He και των συνεργατών του, που περιγράφεται αναλυτικά στην διαδικτυακή ιστοσελίδα www.coloncancer.org/adeasy.htm. Οι πλασμιδιακοί φορείς και τα στελέχη βακτηρίων για την δημιουργία των αδενοϊών, ήταν ευγενική προσφορά του Bert Vogelstein (John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD). Για την αναπαραγωγή των ανασυνδυσασμένων αδενοϊών, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά πακεταρίσματος HEK293A (packaging line), η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των παραγόμενων αδενοϊών προμηθεύοντας τους με τα προϊόντα των γονιδίων που τους λείπουν, E1 και E3. Η τιτλοποίηση των ανασυνδυσασμένων

αδενοϊών έγινε με την δοκιμασία των ιϊκών πλακών (plaque assay). Κύτταρα HEK293A καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 φρεατίων (5×10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο) μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 80-90%. Την επόμενη μέρα, μολύνθηκαν με 5μl από διαφορετικές αραιώσεις του ιού. Μετά από 4 ώρες, τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με 4ml άγαρ επικάλυψης, που περιέχει 20mM HEPES, 12.5mM $MgCl_2$, 1% αγαρόζη (Gibco), σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Η καταμέτρηση των πλακών (μεμονωμένες εστίες λύσης των κυττάρων) πραγματοποιήθηκε μετά από 9 μέρες. Από τον αριθμό των ιϊκών πλακών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά φρεατία συνδυαστικά με τις διαφορετικές αραιώσεις του ιού, υπολογίστηκε ο ιϊκός τίτλος (ιοσωμάτια/μl).

2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέγονται με διάλυμα φωσφορικών (PBS), που περιέχει SDS 1% και 100μM αναστολείς των φωσφατασών PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride). Στη συνέχεια τα κύτταρα υφίστανται λύση με την εφαρμογή υπερήχων (Branson Digital Sonifier), βρασμό στους 100 °C για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13200rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο, ενώ ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τα εμπορικό αντιδραστήριο BCA protein assay kit (περιγράφεται σε ξεχωριστή ενότητα 2.3.2).

Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (8%, 10%, 12% ή 15%) και μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Scheicher and Schell). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) περιέχει 3mg/ml Tris-Base, 14,5mg/ml Glycine και 0,1% SDS, ενώ το διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) περιέχει 3mg/ml Tris-Base, 14,5mg/ml Glycine, 20% μεθανόλη και 0,1% SDS. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι πρωτεΐνες μεταφέρονται επιτυχώς, η μεμβράνη υφίσταται χρώση με διάλυμα 0,1% Ponceau S για 1 λεπτό (προσδένεται αντιστρεπτά στις αμινομάδες των πρωτεϊνών) και αποχρωματίζεται μετά από πλύσεις με διπλά απεσταγμένο νερό.

Εν συνεχεία, οι μεμβράνες επωάζονται με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα πλύσεων (Western buffer: 10mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1% Tween-20, και 150 mM NaCl) για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων, για 30 λεπτά υπό ανάδευση. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα για 1 ώρα σε

θερμοκρασία δωματίου ή για 12 ώρες στους 4 °C, αραιωμένο σε 5% άπαχο γάλα ή σε 2% ζελατίνης σε διάλυμα πλύσεων, με βάση πάντα τις προτεινόμενες οδηγίες της εταιρείας.

Έπειτα γίνονται 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το διάλυμα πλύσεων (Western buffer), και επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα, τα οποία είναι συζευγμένα με τη ραφανδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP), διαλυμένα σε 5% άπαχο γάλα, για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ακόμη 3 δεκάλεπτες πλύσεις πραγματοποιείται η εμφάνιση του σήματος σε φωτογραφικό φίλμ (Fujifilm), με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρείας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) ή της εταιρείας Pierce, σε σκοτεινό θάλαμο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων με την χρήση αντισωμάτων έναντι της α-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Quantity One.

2.3.2 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στα κυτταρικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντιδραστήριο BCA Protein Assay kit της εταιρείας Pierce, το οποίο βασίζεται στο βικινχρωμικό οξύ (BCA, Bicinchrionic acid). Ο χημικός μηχανισμός της μεθόδου στηρίζεται στην αντίδραση Biuret, σύμφωνα με την οποία ενώσεις που περιέχουν δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς (όπως οι πρωτεΐνες) σε αλκαλικές συνθήκες δημιουργούν σύμπλοκα με ιόντα Cu^{+2} . Σε αυτό περιβάλλον τα ιόντα Cu^{+2} ανάγονται σε Cu^{+1} . Τα ανηγμένα κατιόντα χαλκού αντιδρούν με το βικινχρωμικό οξύ, με συνέπεια να παράγουν ένα έντονο μπλε-πράσινο χρώμα.

Το αντιδραστήριο αυτό είναι εφαρμόσιμο στις περιπτώσεις που τα εκχυλίσματα συλλέγονται παρουσία των απορρυπαντικών SDS ή TRITON-X 100. Αρχικά, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης (στη περίπτωση μας αλβουμίνη βοός), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, από 1μg έως 32μg. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδες, ενώ προστίθεται ίση ποσότητα από το διάλυμα λύσης. Σε όλες τις κυψελίδες (τυφλό δείγμα, πρότυπη καμπύλη, υπό εξέταση δείγματα), προστίθεται 1 ml από το μίγμα αντιδραστήριο A + αντιδραστήριο B (50:1), του εμπορικού BCA kit. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C και μέτρηση της απορρόφησης στα 562nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

2.3.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός και στατιστική ανάλυση του συνεντοπισμού

Κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και μετά το πέρας της όποιας πειραματικής διαδικασίας, έγινε πλύση των κυττάρων με διάλυμα φωσφορικών (PBS) και μονιμοποίηση με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (pfa) 3,7% για 15 λεπτά. Μετά από μία πλύση με PBS, ακολούθησε επώαση με 50mM NH_4Cl (σε PBS) για άλλα 15 λεπτά, προκειμένου να μειωθεί ο αυτοφθορισμός και να απενεργοποιηθεί η pfa. Έγινε μία πλύση με PBS και επώαση με Triton-X 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά, για να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης και ξανά πλύση με PBS. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση με ορό 10% (FCS) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, έγινε επώαση των κυττάρων με το πρωτογενές αντίσωμα σε 10% FBS για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, ακολούθησε πλύση δύο φορές με PBS (5 λεπτά, υπό ανάδευση) και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε 10% FBS για 1 ώρα. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με το αντιδραστήριο ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) και οι παρατηρήσεις των δειγμάτων έγιναν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 (Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών/IBE-ITE, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και το λογισμικό Las AF Lite. Τα ποσοστά του συνεντοπισμού (% αλληλοεπικάλυψη των κυστιδίων) υπολογίστηκαν με βάση το πρόγραμμα MotionTracking (<http://www.kalaimoscope.com/>) (Kalaidzidis Y, MPI-CBG, Dresden, Germany), ενώ η μέτρηση της έντασης του φθορισμού, υπολογίστηκε με το πρόγραμμα ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.3.4 Δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης in vivo (co-immunoprecipitation assay)

Ανάλογα με την εκάστοτε πειραματική διαδικασία ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα νεφρού, HEK 293 διαμολύνθηκαν με τις κατάλληλες κατασκευές DNA, με τα αντιδραστήρια FuGENE 6 ή X-tremeGene 9 (Roche). Με την πάροδο 24 ωρών, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με κρύο (4°C) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και λύθηκαν με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης που περιείχε: ddH₂O, 50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Triton X-100 (Fluka), 10% γλυκερόλη και αναστολείς των πρωτεασών (Roche). Στη συνέχεια, τα κυτταρικά εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13,200rpm και για 20 λεπτά στους 4°C. Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε καθαρά φιαλίδια, από τα οποία 5μl χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, ενώ ο υπόλοιπος όγκος επωάστηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A (Sigma-Aldrich) ή G (GE Healthcare), ανάλογα με τη

συγγένεια του ισότυπου του αντισώματος, στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 1000g για 2 λεπτά, από όπου συλλέχθηκε το υπερκείμενο (το ίζημα περιείχε τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A/G, και μόρια ή σύμπλοκα μορίων των κυττάρων που προσδέθηκαν μη ειδικά μαζί τους). Από το υπερκείμενο των δειγμάτων κρατήθηκαν 40μg ώστε να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών των οποίων μελετάται η ενδεχόμενη αλληλεπίδραση. Ο υπόλοιπος όγκος διαχωρίστηκε σε δύο δείγματα που περιείχαν ίσα ποσά πρωτεΐνης και επώαστηκαν (1 μg αντισώματος/IgG ανά 300 μg πρωτεΐνης) το ένα με το αντίσωμα, και το δεύτερο με ανοσοσφαιρίνη (IgG του παράχθηκε από το ίδιο είδος με το αντίσωμα), ως αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να αποκλείσουμε μη ειδική ανοσοκατακρήμνιση του αντιγόνου. Η επώαση έγινε στους 4°C ολονυχτίως και υπό ανάδευση, ανάλογα με την ισχύ της συγγένειας αντιγόνου-αντισώματος, ώστε να σχηματιστεί το σύμπλεγμα αντιγόνου-ειδικού αντισώματος. Ακολούθως, στο παραπάνω μίγμα αντιγόνου-αντισώματος προστέθηκαν τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A/G και ακολούθησε επώαση για 4 ώρες, στους 4°C. Κατόπιν, έγινε έκπλυση των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης, για 5 φορές με όγκο 1ml. Οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν με τη χρήση διαλύματος 2x SDS laemmli. Οι συν-ανοσο-κατακρημνιζόμενες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας σε κάθε πείραμα τα κατάλληλα αντισώματα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ

3.1.1 Εντόπιση των υποδοχέων ALK4 και ActRIIB, απουσία Ακτιβίνης Α, στα πρώιμα ενδοσώματα και ανακύκληση στην κυτταρική μεμβράνη – αποικοδόμηση του ActRIIB στα λυσοσώματα

Αρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ταυτοποιηθούν οι οδοί ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα τύπου II (ActRIIB) και του υποδοχέα τύπου I (ALK4) της Ακτιβίνης Α χωρίς την παρουσία προσδέματος. Για το σκοπό αυτό οι υποδοχείς της Ακτιβίνης συντήχθηκαν με διάφορους επιτόπους και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια-φορείς για την χρησιμοποίησή τους σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανοσοφθορισμού. Έτσι δημιουργήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές ALK4 - Myc, HA, Flag και ActRIIB - Myc, HA, Flag.

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω κατασκευές προχωρήσαμε αρχικά στη μελέτη του εντοπισμού και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς των υποδοχέων, απουσία προσδέματος, στα διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα με τη βοήθεια των εξής πρωτεϊνών-δεικτών για τις οποίες, είτε είχαμε διαθέσιμα τα κατάλληλα αντισώματα, είτε τα είχαμε σημάνει με διάφορους επιτόπους:

- AP2 και κλαθρίνη για την κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση
- Καβεολίνη-1 για τα καβεοσώματα
- Rab5 για το μονοπάτι των πρώιμων ενδοσωμάτων
- EEA1, Rabenosyn-5 για τα πρώιμα ενδοσώματα
- Rab7 για τα όψιμα ενδοσώματα
- Rabankyrin-5 για τα μακροπινοσώματα
- APPL1&2 για τα προσφάτως χαρακτηρισμένα APPL ενδοσώματα
- Rab4 and Rab11 για το μονοπάτι ανακύκλησης.

Η μελέτη της εντόπισης των υποδοχέων έγινε ύστερα από διπλή διαμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC με τις κατασκευές υποδοχέων και πρωτεϊνών-δεικτών, διπλό ανοσοφθορισμό, και παρατήρηση τους σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS (Τμήμα Βιολογικής χημείας, Ιατρική Σχολή). Στις περιπτώσεις που είχαμε αντισώματα για τις ενδογενείς πρωτεΐνες-δείκτες, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων μόνο με την κατασκευή του υποδοχέα και το κυτταρικό διαμέρισμα

εντόπισης χαρακτηρίστηκε με το αντίστοιχο αντίσωμα. Η ανάλυση και ποσοτικοποίηση των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Motion Tracking, σε συνεργασία με τον Γιάννη Καλαϊτζίδη (Ινστιτούτο Max Planck, Δρέσδη).

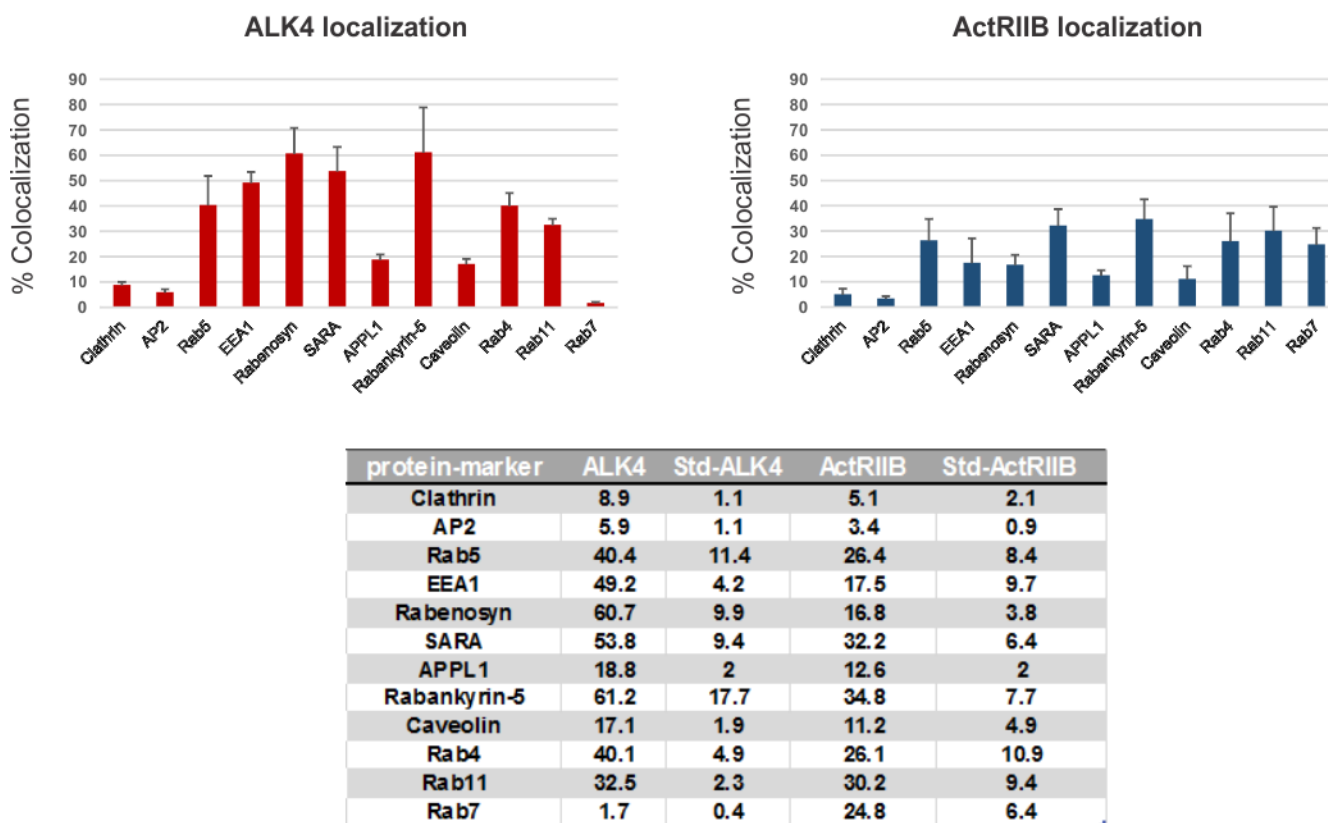
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας παρουσιάζονται στην εικόνα 3.1. Διαπιστώσαμε ότι οι υποδοχείς ALK4 και ActRIIB συνεντοπίζονται με τις πρωτεΐνες-δείκτες των πρώιμων ενδοσωμάτων σε υψηλά ποσοστά. Συγκεκριμένα με την EEA1 τα ποσοστά είναι $49,2 \pm 4,2\%$ και $17,5 \pm 9,6\%$ αντίστοιχα. Αυξημένο είναι επίσης το ποσοστό συνεντοπισμού με την πρωτεΐνη Rab5a, $40,4 \pm 11,4\%$ και $26,4 \pm 8,4\%$, με τη Rabenosyn-5, $60,7 \pm 9,9\%$ και $16,8 \pm 3,8\%$, καθώς επίσης με τη SARA, $53,8 \pm 9,4\%$ και $32,2 \pm 6,4\%$ αντίστοιχα, που όλες εντοπίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα. Εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι η Rabenosyn-5 εντοπίζεται και στο γρήγορο μονοπάτι της ανακύκλησης.

Αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό συνεντοπισμού των υποδοχέων με τη Rabankyrin-5, $61,2 \pm 17,7\%$ και $34,8 \pm 7,7\%$ αντίστοιχα, μια βασική πρωτεΐνη του μηχανισμού της μακροπinoκυττάρωσης, όπως είδαμε και στην εισαγωγή, που εντοπίζεται και στα πρώιμα ενδοσώματα. Και οι δύο υποδοχείς, ALK4 και ActRIIB φαίνεται να ακολουθούν το μονοπάτι της γρήγορης ανακύκλησης προς τη μεμβράνη, καθώς συνεντοπίζονται σε ποσοστό $40,1 \pm 4,9\%$ και $26,1 \pm 10,9\%$ αντιστοίχως, με την πρωτεΐνη Rab4a, η οποία βρίσκεται και στα πρώιμα ενδοσώματα. Επίσης, οι υποδοχείς ALK4 και ActRIIB φαίνεται πως χρησιμοποιούν και το αργό μονοπάτι της ανακύκλησης στη μεμβράνη, όπως προκύπτει από τα ποσοστά συνεντοπισμού με την πρωτεΐνη Rab11, $32,5 \pm 2,3\%$ και $30,2 \pm 9,4\%$ αντίστοιχα.

Οι υποδοχείς της Ακτιβίνης, ALK4 και ActRIIB παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά συνεντοπισμού με τις πρωτεΐνες κλαθρίνη ($8,9 \pm 1,1\%$ και $5,1 \pm 2,1\%$) και AP2 ($5,9 \pm 1,1\%$ και $3,4 \pm 0,9\%$), δύο πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν το κλαθρινο-εξαρτώμενο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, καθώς αποτελούν βασικές μονάδες των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων. Μικρός, αλλά στατιστικά σημαντικός είναι ο συνεντοπισμός των υποδοχέων, σε ποσοστά $17,1 \pm 1,9\%$ και $11,2 \pm 4,9\%$ αντίστοιχα, με κυστιδιακές δομές μικρής διαμέτρου, θετικές για την πρωτεΐνη Caveolin-1.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί μία βασική διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στους υποδοχείς της Ακτιβίνης Α. Ο υποδοχέας τύπου II, ActRIIB συνεντοπίζεται με τη πρωτεΐνη Rab7 σε ποσοστό $24,8 \pm 6,4\%$, που είναι δείκτης των όψιμων ενδοσωμάτων. Αντίθετα ο υποδοχέας τύπου I ALK4 δεν εμφανίζει στατιστικώς σημαντικό συνεντοπισμό με τη Rab7 ($1,7 \pm 0,4\%$). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ο ActRIIB

οδηγείται στα όψιμα ενδοσώματα και κατόπιν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, ενώ ο ALK4, φαίνεται πως χρησιμοποιεί άλλο μονοπάτι για την αποικοδόμησή του. Επίσης, μετά την ενδοκυττάρωσή τους, ίσως ο ALK4 να οδηγείται ξανά πίσω στη μεμβράνη μέσω των μονοπατιών ανακύκλησης, σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τον ActRIIB.



Εικόνα 3.1: Χαρακτηρισμός των οδών ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων της Ακτιβίνης Α, απουσία προσδέματος.

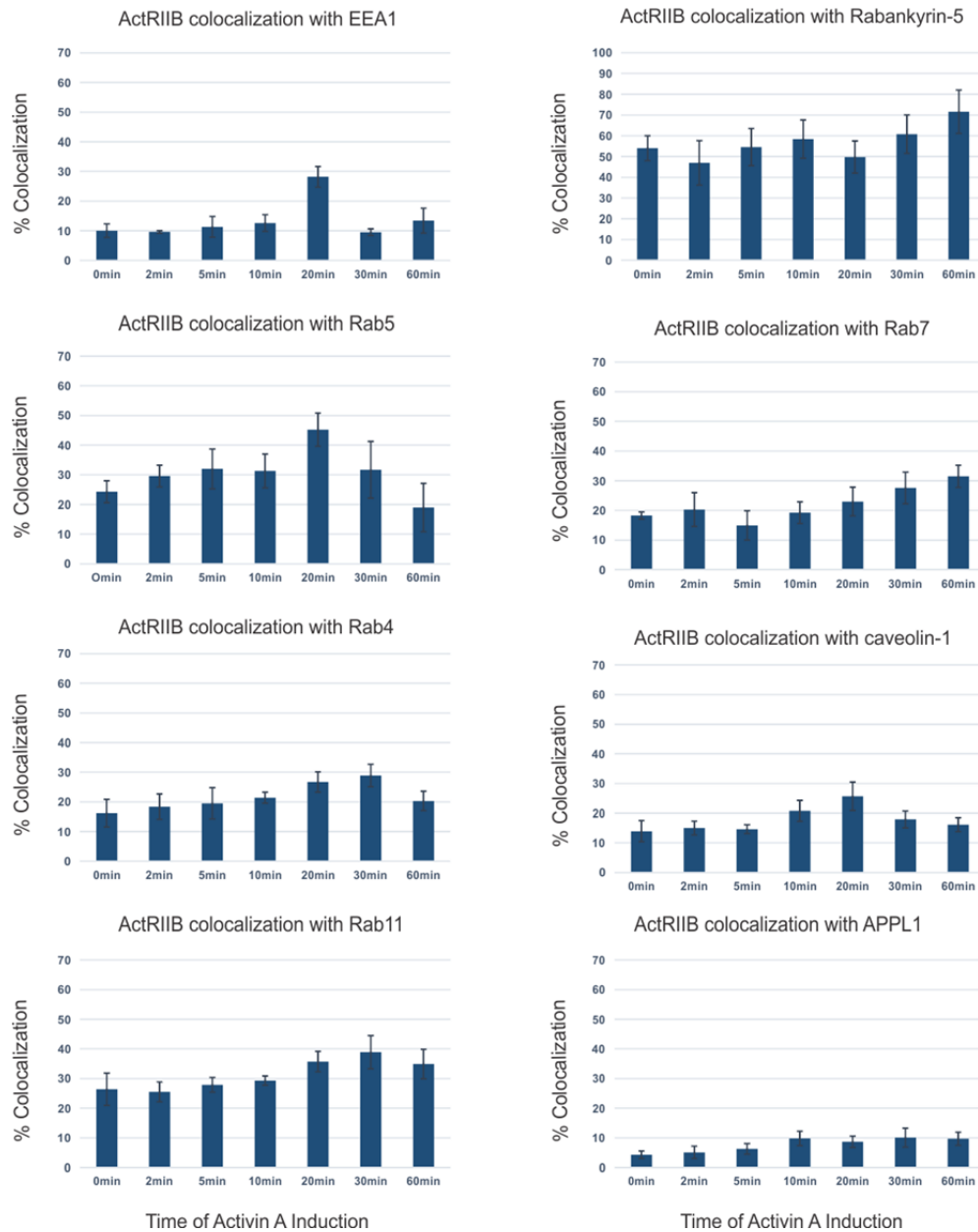
Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% και διαμολύνθηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν τον υποδοχέα ALK4-HA ή τον ActRIIB-Flag. Ταυτόχρονα έγινε διαμόλυνση με πλασμίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες-δείκτες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων, όπως οι GFP-AP2, GFP-Rab5a, Myc-Rabenosyn-5, YFP-Rabankyrin-5, GFP-Rab4a, GFP-Rab11 και GFP-Rab7. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν κι ακολούθησε έμμεσος ανασοφθορισμός για τους υπερεκφρασμένους υποδοχείς ALK4-HA ή ActRIIB-Flag και είτε για τις ενδογενείς πρωτεΐνες-δείκτες (Clathrin, EEA1, SARA, APPL1, Caveolin-1) είτε για τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες-δείκτες (YFP-Rabankyrin-5, GFP-Rab5a, GFP-Rab7, GFP-Rab4a και GFP-Rab11). Οι εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας αναλύθηκαν με το λογισμικό MotionTracking και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανομής των υποδοχέων στα διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα παρουσιάζονται στον πίνακα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

Συμπερασματικά λοιπόν, παρατηρούμε ότι οι δύο υποδοχείς εμφανίζουν έναν ευρύ εντοπισμό σε διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως προκύπτει από το συνεντοπισμό τους με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες-δείκτες. Με βάση τα πρώτα αποτελέσματα της εργασίας, θα μπορούσε κάποιος να καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι υποδοχείς, απουσία προσδέματος, ενδοκυτταρώνονται στα πρώιμα ενδοσώματα, κυρίως μέσω της μακροπινοκυττάρωσης. Από αυτό το κυτταρικό διαμέρισμα, που είναι ο πρώτος και σημαντικότερος σταθμός για τη μετέπειτα πορεία τους, οι υποδοχείς οδηγούνται ξανά στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των δύο μονοπατιών ανακύκλησης, ενώ ο υποδοχέας τύπου II, ο ActRIIB, μεταφέρεται και στα όψιμα ενδοσώματα-λυσosώματα για αποδόμηση.

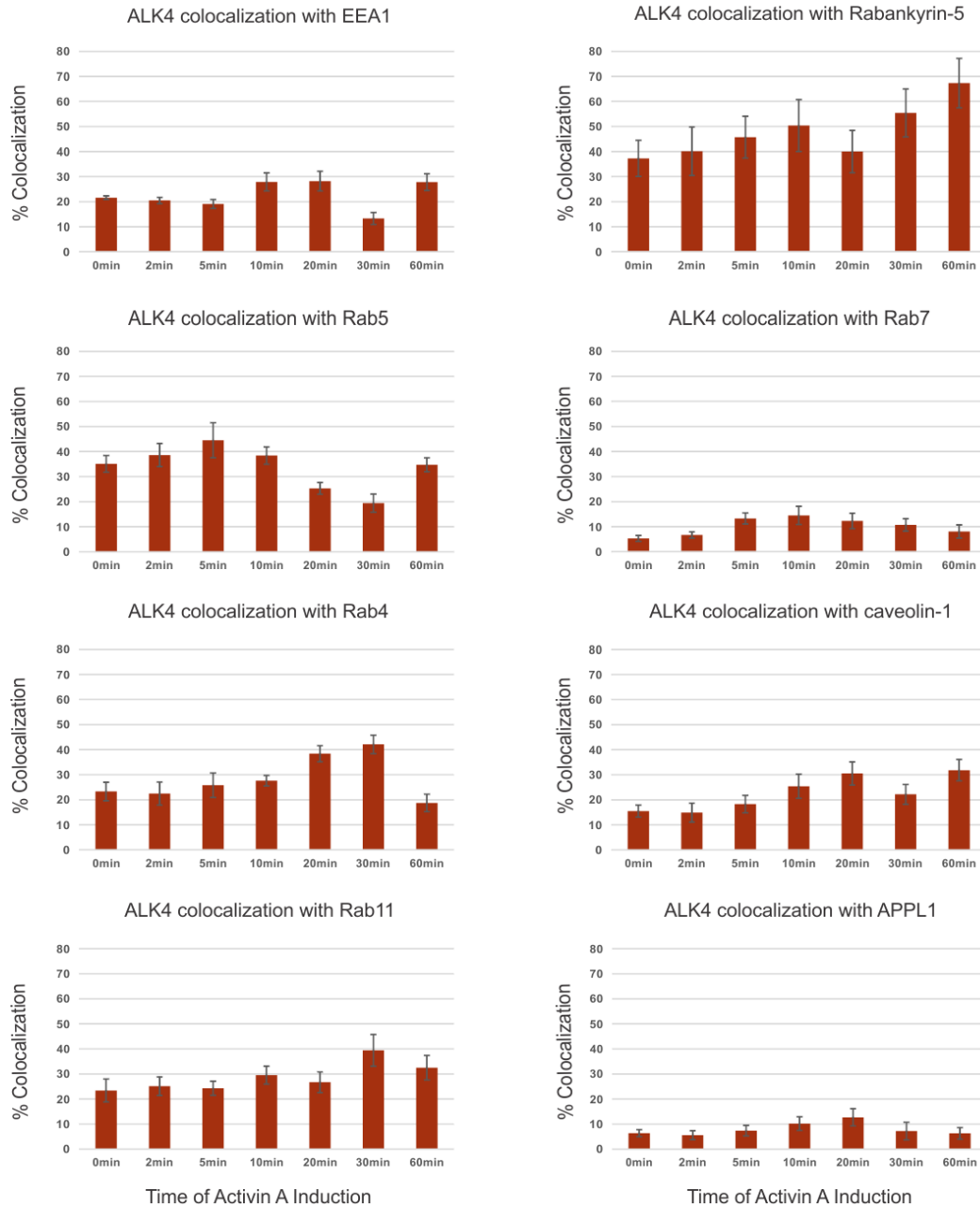
3.1.2 Η Ακτιβίνη Α οδηγεί τους ActRIIB και ALK4 υποδοχείς στα πρώιμα ενδοσώματα και κατόπιν στην κυτταρική μεμβράνη – Υψηλό ποσοστό συνεντόπισης με Rabankyrin-5, μία πρωτεΐνη-δείκτη της μακροπινοκυττάρωσης

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην εισαγωγή, παρουσία προσδέματος οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς μπορούν να χρησιμοποιήσουν διαφορετικά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης με αποτέλεσμα αυτό να έχει επίπτωση και στη μεταγωγή του σήματος. Παραδείγματος χάριν, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, όταν οι υποδοχείς του TGF- β ακολουθούν την εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση, οδηγούνται στα πρώιμα ενδοσώματα, από όπου μετάγουν καθοδικά σήματα. Αντίθετα, η ενδοκυττάρωση προς καβεοσώματα οδηγεί τους υποδοχείς στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση και αναστολή της μεταγωγής καθοδικών σημάτων. Τι ακριβώς συμβαίνει με τους υποδοχείς της Ακτιβίνης Α όταν ενεργοποιούνται από το πρόσδεμα; Το ερώτημα αυτό είναι σε γενικές γραμμές αναπάντητο.

Στόχος μας, λοιπόν, ήταν η μελέτη της κινητικής της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων ύστερα από επαγωγή με Ακτιβίνη Α. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές που αναφέρθηκαν προηγουμένως (αποτελέσματα 3.1.1) και ακολουθήθηκε παρόμοια πειραματική διαδικασία. Έγινε είτε διαμόλυνση κυττάρων HUVEC, με τις κατασκευές του υποδοχέα ActRIIB (ActRIIB-flag) και της κάθε πρωτεΐνης-δείκτη, είτε επιμόλυνση με τον αδενοϊό ALK4-HA και διαμόλυνση με τις κατασκευές των πρωτεϊνών-δεικτών. Για όσες πρωτεΐνες είχαμε αντισώματα, που αναγνωρίζουν τις ενδογενείς, έγινε μονή διαμόλυνση ή επιμόλυνση. Μετά από 24 ώρες, ακολούθησε επαγωγή με Ακτιβίνη Α για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα, 0, 2, 5, 10, 30 και 60 λεπτών. Έτσι λοιπόν, για κάθε συνδυασμό υποδοχέα-πρωτεΐνης είχαμε 7 καλυπτρίδες με κύτταρα HUVEC τα οποία, μετά την επαγωγή για διαφορετικούς χρόνους, μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία. Για κάθε μία συνθήκη αναλύθηκαν περίπου 15 φωτογραφίες για την ανίχνευση του συνεντοπισμού των υποδοχέων με τις πρωτεΐνες-δείκτες, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Motion Tracking. Συνολικά, για τους 2 υποδοχείς χρησιμοποιήθηκαν 8 πρωτεΐνες-δείκτες, συλέχθηκαν και αναλύθηκαν περίπου 1000 φωτογραφίες για να καταλήξουμε στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 3.2 και 3.3.



Εικόνα 3.2: Η κινητική του υποδοχέα της Ακτιβίνης, *ActRIIB*, παρουσία προσδέματος, με βάση τον συνεντοπισμό με πρωτεΐνες-δείκτες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% και διαμολύνθηκαν είτε μόνο με τον υποδοχέα *ActRIIB-Flag*, είτε ταυτόχρονα με τον υποδοχέα *ActRIIB-Flag* και τις πρωτεΐνες-δείκτες YFP-Rabankyrin-5 ή GFP-Rab5a ή GFP-Rab7 ή GFP-Rab4a ή GFP-Rab11. Μετά από 24 ώρες έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή με Ακτιβίνη Α (50ng/ml) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν κι ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον υπερεκφρασμένο υποδοχέα *ActRIIB-Flag* και είτε για τις ενδογενείς πρωτεΐνες-δείκτες, (EEA1, Caveolin-1, APPL1), είτε για τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες-δείκτες (YFP-Rabankyrin-5, GFP-Rab5a, GFP-Rab7, GFP-Rab4a and GFP-Rab11). Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας αναλύθηκαν με το λογισμικό Motion Tracking και παρουσιάζονται στα γραφήματα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.3: Η κινητική του υποδοχέα της Ακτιβίνης, ALK4, παρουσία προσδέματος, με βάση τον συνεντοπισμό με πρωτεΐνες-δείκτες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% και είτε επιμολύνθηκαν μόνο με αδενοϊό που εκφράζει τον υποδοχέα ALK4-HA, είτε ταυτόχρονα διαμολύνθηκαν με τις πρωτεΐνες-δείκτες YFP-Rabankyrin-5 ή GFP-Rab5a ή GFP-Rab7 ή GFP-Rab4a ή GFP-Rab11. Μετά από 24 ώρες έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή με Ακτιβίνη Α (50ng/ml) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν κι ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον υπερεκφρασμένο υποδοχέα ALK4-HA και είτε για τις ενδογενείς πρωτεΐνες-δείκτες, (EEA1, Caveolin-1, APPL1), είτε για τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες-δείκτες (YFP-Rabankyrin5, GFP-Rab5a, GFP-Rab7, GFP-Rab4a and GFP-Rab11). Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας αναλύθηκαν με το λογισμικό MotionTracking και παρουσιάζονται στα γραφήματα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρώντας τις εικόνες 3.2. και 3.3, όπου απεικονίζεται η κινητική των υποδοχέων ActRIIB και ALK4 αντίστοιχα, εξάγουμε ορισμένα αρχικά συμπεράσματα. Παρουσία Ακτιβίνης Α, τα ποσοστά συνεντοπισμού των υποδοχέων με κάθε πρωτεΐνη-δείκτη μεταβάλλονται στο χρόνο, που σημαίνει ότι όντως υπάρχει κινητική, και η σύνδεση προσδέματος-υποδοχέα επηρεάζει την κυστιδιακή μεταφορά και την εντόπιση των υποδοχέων στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι απόλυτες τιμές των ποσοστών δεν θα πρέπει να συγκρίνονται ανάμεσα σε διαφορετικές πρωτεΐνες-δείκτες, αλλά μόνο ανάμεσα στα διαφορετικά χρονικά σημεία για την ίδια πρωτεΐνη-δείκτη. Κι αυτό γιατί κάποιες πρωτεΐνες υπερεκφράζονται με πλασμίδια, ενώ άλλες σημαίνονται με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις ενδογενείς.

Για τον υποδοχέα ActRIIB παρατηρούμε ότι ο συνεντοπισμός με πρωτεΐνες δείκτες των πρώιμων ενδοσωμάτων όπως η EEA1, η Rab5a αλλά και η Rab4a, αυξάνεται 20 λεπτά μετά την επαγωγή με Ακτιβίνη Α. Αυτό σημαίνει ότι 20 λεπτά μετά την πρόσδεση προσδέματος-υποδοχέων, ο ActRIIB έχει μετακινηθεί προς τα πρώιμα ενδοσώματα. Μεταξύ 20 και 30 λεπτών έχει ξεκινήσει και η ανακύκληση του υποδοχέα στη μεμβράνη όπως προκύπτει από τον αυξημένο συνεντοπισμό με τη Rab4a (βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα και στα κυστίδια της γρήγορης ανακύκλησης) και τη Rab11, με την οποία συνεντοπίζεται σε υψηλό ποσοστό, ακόμη και 60 λεπτά μετά την επαγωγή. 20-30% συνεντοπισμός παρατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της επαγωγής με την πρωτεΐνη-δείκτη των όψιμων ενδοσωμάτων Rab7, που συνεπάγεται την αποικοδόμηση του υποδοχέα στα λυσοσώματα. Πολύ υψηλά ποσοστά συνεντοπισμού, που ξεπερνούν το 60% παρατηρούμε με την πρωτεΐνη Rabankyrin-5 που διατηρούνται υψηλά και αυξάνονται ακόμα και 60 λεπτά μετά την επαγωγή με την Ακτιβίνη Α. Μικρά, αλλά όχι αμελητέα είναι τα ποσοστά συνεντοπισμού με την καβεολίνη-1, με μέγιστο στα 20 λεπτά, ενώ πολύ μικρά είναι τα ποσοστά για την πρωτεΐνη APPL1, με τις διαφορές ανάμεσα στα χρονικά διαστήματα να μην είναι στατιστικώς σημαντικές.

Παρόμοιες είναι οι παρατηρήσεις για τον υποδοχέα ALK4, επομένως θα σταθούμε στις διαφορές. Μια μικρή διαφορά είναι η κινητική με την πρωτεΐνη Rab-5, με την οποία ο συνεντοπισμός αυξάνεται στα πρώτα 5 και 10 λεπτά μετά την επαγωγή, στη συνέχεια μειώνεται και αυξάνεται ξανά στο τέλος, δηλαδή στα 60 λεπτά. Σε αυτό το τελευταίο χρονικό σημείο της επαγωγής, τα 60 λεπτά, αυξημένος είναι ο συνεντοπισμός με τη Rab5a, την EEA1, τη Rabankyrin-5 και την καβεολίνη-1. Τέλος, πολύ μικρά είναι τα ποσοστά συνεντοπισμού με τη Rab7 που σημαίνει ότι ο ALK4 δεν οδηγείται στα λυσοσώματα για

αποικοδόμηση. Ενδεχομένως ο ALK4 να μεταφέρεται σε μεγαλύτερο βαθμό προς ανακύκλωση, και ίσως ακολουθεί ένα δεύτερο γύρο ενδοκυττάρωσης σε δεύτερο χρόνο (60 λεπτά).

3.1.3 Η σημασμένη Ακτιβίνη Α εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, υφίσταται ανακύκλωση και εμφανίζει υψηλή συνεντόπιση με δείκτες της μακροπινοκυττάρωσης

Με σκοπό τον χαρακτηρισμό της κινητικής του προσδέματος, χρησιμοποιήθηκε σημασμένη Ακτιβίνη Α συζευγμένη με τη φθορίζουσα χρωστική Alexa488, η οποία στις εικόνες αναγράφεται ως ActivinA-alexa488. Η σημασμένη Ακτιβίνη ήταν μια ευγενική προσφορά του Marko Hyvonen και μας δόθηκε σε 4 διαφορετικές «μορφές» με βάση τα μόρια φθορίζουσας χρωστικής AlexaFluor488 που προστέθηκαν στα διμερή της Ακτιβίνης (πίνακας 3.1.3). Προκειμένου να προχωρήσουμε στα πειράματα ενδοκυττάρωσης της σημασμένης Ακτιβίνης, έπρεπε προηγουμένως να πραγματοποιήσουμε μια σειρά πειραμάτων ελέγχου, ώστε να συγκρίνουμε τη σημασμένη με τη μη σημασμένη Ακτιβίνη ως προς τη σηματοδότηση και την ενδοκυττάρωσή της.

Αρχικά, ελέγχθηκε η μεταγραφική ικανότητα της σημασμένης Ακτιβίνης Α. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τη σταθερή κυτταρική σειρά A431/(CAGA)₁₂-Luc/Rep. Έγινε επαγωγή των κυττάρων για 16 ώρες με 50 και 100ng σημασμένης Ακτιβίνης Α, και ακολούθησε μέτρηση της λουσιφεράσης με το εμπορικό kit Dual-Luciferase Reporter Assay System, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (promega). Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα της εικόνας 3.4Α οι τέσσερις τύποι σημασμένης Ακτιβίνης μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή, ενώ η Ακτιβίνη μεσαίας/υψηλής σήμανσης (medium/high) παρουσιάζει παρόμοια μεταγραφική ικανότητα με τη μη σημασμένη Ακτιβίνη. Η Ακτιβίνη υψηλής και μεσαίας/υψηλής σήμανσης χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενδοκυττάρωσης. Η σημασμένη Ακτιβίνη ελέγχθηκε και για τη δυνατότητα επαγωγής της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SMAD2/3 σε κύτταρα HUVEC, σε σύγκριση με τη σημασμένη (3.4Β).

Παράλληλα θελήσαμε να αποδείξουμε ότι η ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α (ActivinA-alexa488) πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων της και δεν γίνεται μη ειδικά μέσω μιας μαζικής και γενικευμένης ενδοκυττάρωσης, λόγω της παρουσίας της στον εξωκυττάριο χώρο (fluid phase endocytosis) (315). Στο πείραμα της εικόνας 3.4C μελετήθηκε η ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α υπό την αποσιώπηση των υποδοχέων της, ActRIIB και ALK4, με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Απουσία του υποδοχέα τύπου I, ALK4 (Εικ. 3.4C c) η ποσότητα της σημασμένης Ακτιβίνης Α που

ενδοκυτταρώνεται μειώνεται σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικ. 3.4C a), ενώ η μείωση είναι σαφώς πιο έντονη όταν γίνεται αποσιώπηση του υποδοχέα τύπου II (ActRIIB) (Εικ. 3.4C b).

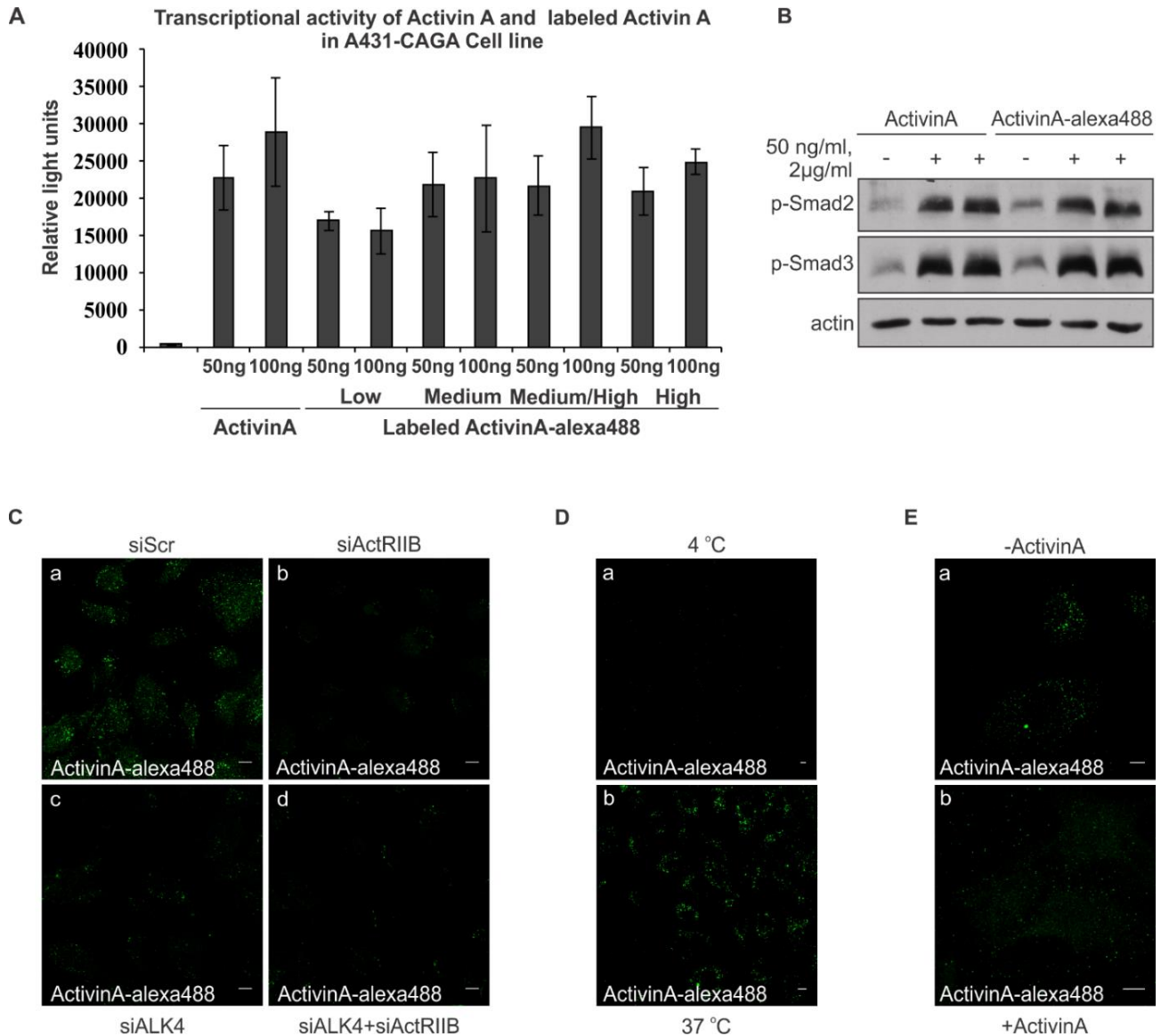
High labeled ActivinA-Alexa488	40% with 1 AlexaFluor488 per dimer 50% with 2 AlexaFluor488 per dimer 10% with 3 AlexaFluor488 per dimer
Medium/High labeled ActivinA-Alexa488	25% without label 45% with 1 AlexaFluor488 per dimer 25% with 2 AlexaFluor488 per dimer 5% with 3 AlexaFluor488 per dimer
Medium labeled ActivinA-Alexa488	45% without label 50% with 1 AlexaFluor488 per dimer 5% with 2 AlexaFluor488 per dimer
Low labeled ActivinA-Alexa488	85% without label 15% with 1 AlexaFluor488 per dimer

Πίνακας 3.1.3. Οι 4 τρόποι σήμανσης των διμερών της Ακτιβίνης Α με τη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor488

Αυτό είναι εν μέρει αναμενόμενο, καθώς η Ακτιβίνη Α προσδένεται στον υποδοχέα τύπου II, ο οποίος στη συνέχεια προσελκύει τον υποδοχέα τύπου I. Διπλή αποσιώπηση των υποδοχέων (ALK4 και ActRIIB ταυτόχρονα) αναστέλλει πλήρως την ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α (Εικ. 3.4C d). Στην εικόνα 3.4D παρατηρούμε ότι η ενδοκυττάρωση της ActivinA-alexa488 αναστέλλεται στους 4°C (a), αντίθετα με τους 37°C (b). Τέλος με πειράματα ανταγωνισμού, αποδεικνύεται ότι η ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α (Εικ. 3.4E a) παρεμποδίζεται με την προσθήκη μη σημασμένης Ακτιβίνης Α σε περίσσεια (b, competition assay). Συμπερασματικά, με τη σειρά αυτών των πειραμάτων αποδείξαμε ότι η σημασμένη Ακτιβίνη Α είναι πλήρως λειτουργική και η ενδοκυττάρωσή της διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς της, ALK4 και ActRIIB.

Επιστρέφοντας στον αρχικό μας στόχο, τη μελέτη της κινητικής της Ακτιβίνης Α, εκτός από τη χρήση αντισωμάτων για τις ενδογενείς πρωτεΐνες-δείκτες Rab5a, EEA1, Rabankyrin-5, caveolin-1, APPL2, και CD63, δημιουργήθηκαν οι κατασκευές Rab4-HA, Rab7-HA, Rab11-HA καθώς δεν υπήρχαν εμπορικά διαθέσιμα λειτουργικά αντισώματα. Επομένως, σε αυτά τα πειράματα έγινε διαμόλυνση των

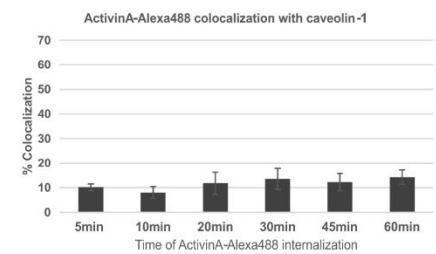
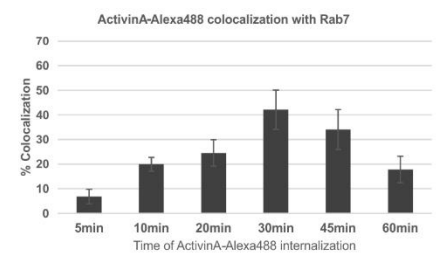
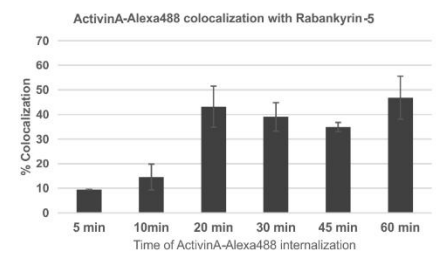
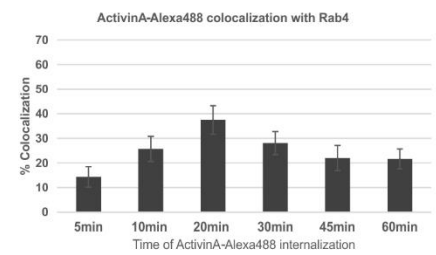
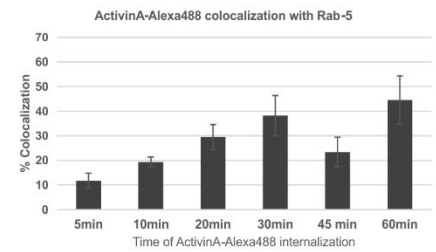
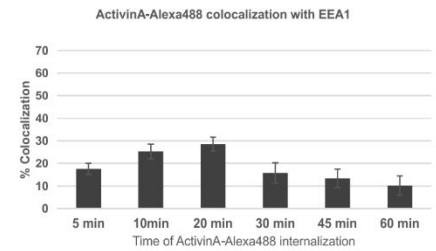
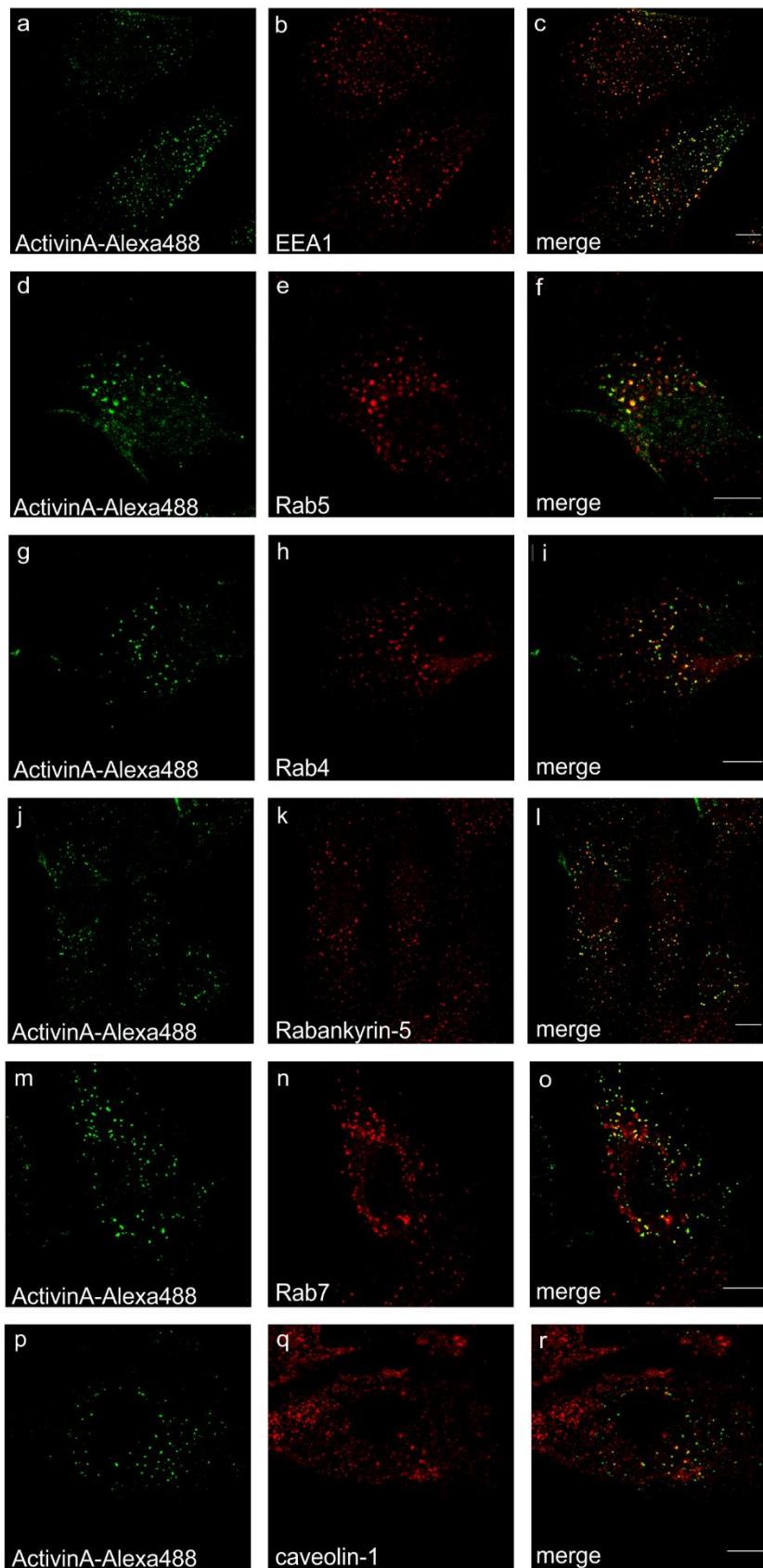
ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC μόνο για την έκφραση των πρωτεϊνών Rab4-HA, Rab7-HA και Rab11-HA. Ακολούθησε προσθήκη της σημασμένης Ακτιβίνης Α (ActivinA-alexa488) και ενδοκυττάρωσή της για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα, 0, 5, 10, 30, 45 και 60 λεπτών. Στη συνέχεια, έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων, κλασικός έμμεσος ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία. Χρησιμοποιήθηκαν 9 πρωτεΐνες-δείκτες, ελήφθησαν περίπου 500 φωτογραφίες με το συνεστιακό μικροσκόπιο LEICA SP5 (Ινστιτούτο Μοριακής βιολογίας & Βιοτεχνολογίας, IMBB-ITE), οι οποίες και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MotionTracking για τα ποσοστά του συνεντοπισμού της Ακτιβίνης Α με τις πρωτεΐνες-δείκτες των διάφορων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων.



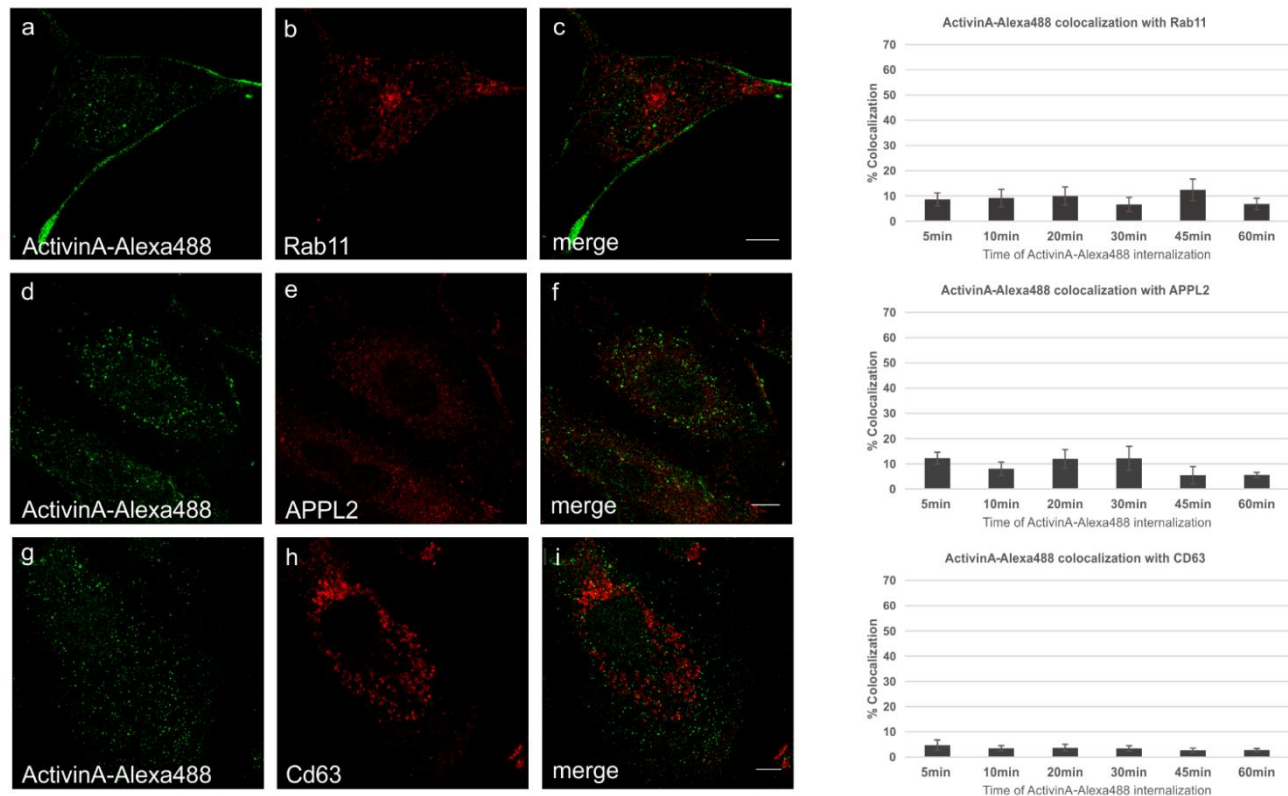
Εικόνα 3.4: Έλεγχος της μεταγωγής του σήματος και της ενδοκυττάρωσης της σημασμένης Ακτιβίνης Α. **A.** Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας της σημασμένης Ακτιβίνης σε κύτταρα A431/(CAGA)₁₂-Luc/Rep. Η επαγωγή με Ακτιβίνη έγινε με 50 και 100ng για 16 ώρες, η μέτρηση της λουσιφεράσης με το εμπορικό αντιδραστήριο Dual-Luciferase Reporter Assay System και η ομαλοποίηση με τη λουσιφεράση Renilla. **B.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν μέχρι πληρότητας 70% και υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες. Ακολούθησε επαγωγή με 50ng/ml και 2μg/ml Ακτιβίνης Α και σημασμένης Ακτιβίνης Α (ActivinA-alexa488) για 30 λεπτά. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, SMAD2/3 και ακτίνης. **C.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία IBIDI και διαμολύνθηκαν με siRNA-μάρτυρα (siScr) (a) ή με siActRIIB (b) ή με siALK4 (c), ή siALK4 και siActRIIB ταυτόχρονα (d) για 72 ώρες. Μετά από στέρηση ορού για 2 ώρες, προστέθηκε η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActA-Alexa488) για 45 λεπτά και ακολούθησε μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. **D.** Η ενδοκυττάρωση της ActivinA-alexa488 αναστέλλεται στους 4°C (a), αντίθετα με τους 37°C (b). **E.** Ταυτόχρονη προσθήκη μη σημασμένης Ακτιβίνης Α σε περίσσεια (10μg/ml, b) παρεμποδίζει την ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α (competition assay).

Με τα πειράματα αυτά, σκοπός μας ήταν να κατανοήσουμε για πόσο χρόνο η Ακτιβίνη Α παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, εάν και πότε ενδοκυτταρώνεται, σε ποια διαμερίσματα και κυστίδια μεταφοράς καταλήγει και αν ανακυκλείται στη μεμβράνη ή όχι. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.5. Παρατηρούμε ότι η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActivinA-alexa488) εμφανίζει υψηλά ποσοστά συνεντοπισμού με όλες τις πρωτεΐνες δείκτες των πρώιμων ενδοσωμάτων. Συγκεκριμένα, με την EEA1 το μέγιστο ποσοστό είναι $28,5 \pm 3,1\%$ στα 20 λεπτά, και τη με Rab-5a έχουμε μέγιστα ποσοστά στα 30 και 60 λεπτά, $38,1 \pm 8,2\%$ και $44,5 \pm 9,8\%$ αντίστοιχα. Ο συνεντοπισμός με τη Rab-4 κυμαίνεται μεταξύ $14,3 \pm 4,2\%$ και $37,5 \pm 5,8\%$, που σημαίνει ότι η Ακτιβίνη Α ανακυκλείται στη μεμβράνη μέσω του γρήγορου μονοπατιού ανακύκλησης, ενώ τα χαμηλά ποσοστά συνεντοπισμού με τη Rab-11 δείχνουν ότι δεν χρησιμοποιεί το αργό μονοπάτι ανακύκλησης. Μετά τα 20 λεπτά, όταν και ξεκινά η ενδοκυττάρωση, πολύ μεγάλα ποσοστά συνεντοπισμού σημειώνονται για τη Rabankyrin-5, που φτάνουν το $46,8 \pm 8,7\%$, και διατηρούνται υψηλά μέχρι και τα 60 λεπτά. Επίσης, η Ακτιβίνη Α οδηγείται στα λυσοσώματα και άρα στο πρωτεόσωμα για αποδόμηση, όπως προκύπτει από το συνεντοπισμό της με τη Rab-7, με μέγιστο ποσοστό $42,1 \pm 8\%$ στα 30 λεπτά. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι μετά από αυτό το χρονικό σημείο, δηλαδή στα 45 και 60 λεπτά, κύτταρα που υπερεκφράζουν σημαντικά τη Rab-7 έχουν ελάχιστη Ακτιβίνη Α, κάτι που υποδηλώνει ότι πιθανότατα έχει αποδομηθεί πλήρως. Αρκετά μικρός είναι ο συνεντοπισμός με την καβεολίνη-1, ενώ ελάχιστος και μη στατιστικά σημαντικός είναι ο συνεντοπισμός με τις πρωτεΐνες- δείκτες APPL2 και CD63.

A



B



Εικόνα 3.5: Η κινητική της Ακτιβίνης Α με βάση τον συνεντοπισμό με πρωτεΐνες-δείκτες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων. Α και Β. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% πριν τη διαμόλυνση στις περιπτώσεις των Rab5α, Rab4α-HA, Rab11-HA και Rab7-HA. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActivinA-Alexa488) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα (5-60 λεπτά). Οι εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, μετά από έμμεσο ανοσοφθορισμό για τις ενδογενείς πρωτεΐνες δείκτες EEA1 (a-c), Rabankyrin-5 (j-l), caveolin-1 (p-r), APPL2 (B d-f) και Cd63 (B g-i) ή τις υπερεκφρασμένες Rab5α (d-f), Rab4α-HA (g-i) Rab11 (B a-c) και Rab7-HA (m-o), αναλύθηκαν με το λογισμικό MotionTracking Software. Τα ποσοστά συνεντοπισμού της ActivinA-Alexa488 με την κάθε πρωτεΐνη-δείκτη ξεχωριστά, παρουσιάζονται στα γραφήματα δεξιά. Ράβδος κλίμακας, 10μΜ. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

3.2 ΠΑΡΕΜΒΟΛΕΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ

3.2.1 Η αποσιώπηση της κλαθρίνης συνοδεύεται από μειωμένη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 και περιορισμένη μετακίνησή τους στον πυρήνα, μετά από χορήγηση Ακτιβίνης Α

Έχοντας μελετήσει τις οδούς ενδοκυττάρωσης τόσο της Ακτιβίνης Α όσο και των υποδοχέων της, ο επόμενος στόχος μας ήταν να μελετήσουμε τη σημασία κάθε κεντρικού μονοπατιού ενδοκυττάρωσης στη σηματοδότηση και την εσωτερικοποίηση της Ακτιβίνης Α. Για το σκοπό αυτό κάναμε παρεμβάσεις σε κάθε μονοπάτι ξεχωριστά, είτε με αποσιώπηση γονιδίων κεντρικών πρωτεϊνών, είτε με τη χρήση χημικών αναστολέων, προκειμένου να γίνει αντιληπτός ο ρόλος τους στην επαγόμενη από Ακτιβίνη Α σηματοδότηση και να επιβεβαιώσει τη σημασία/συμμετοχή της κάθε οδού στο τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α.

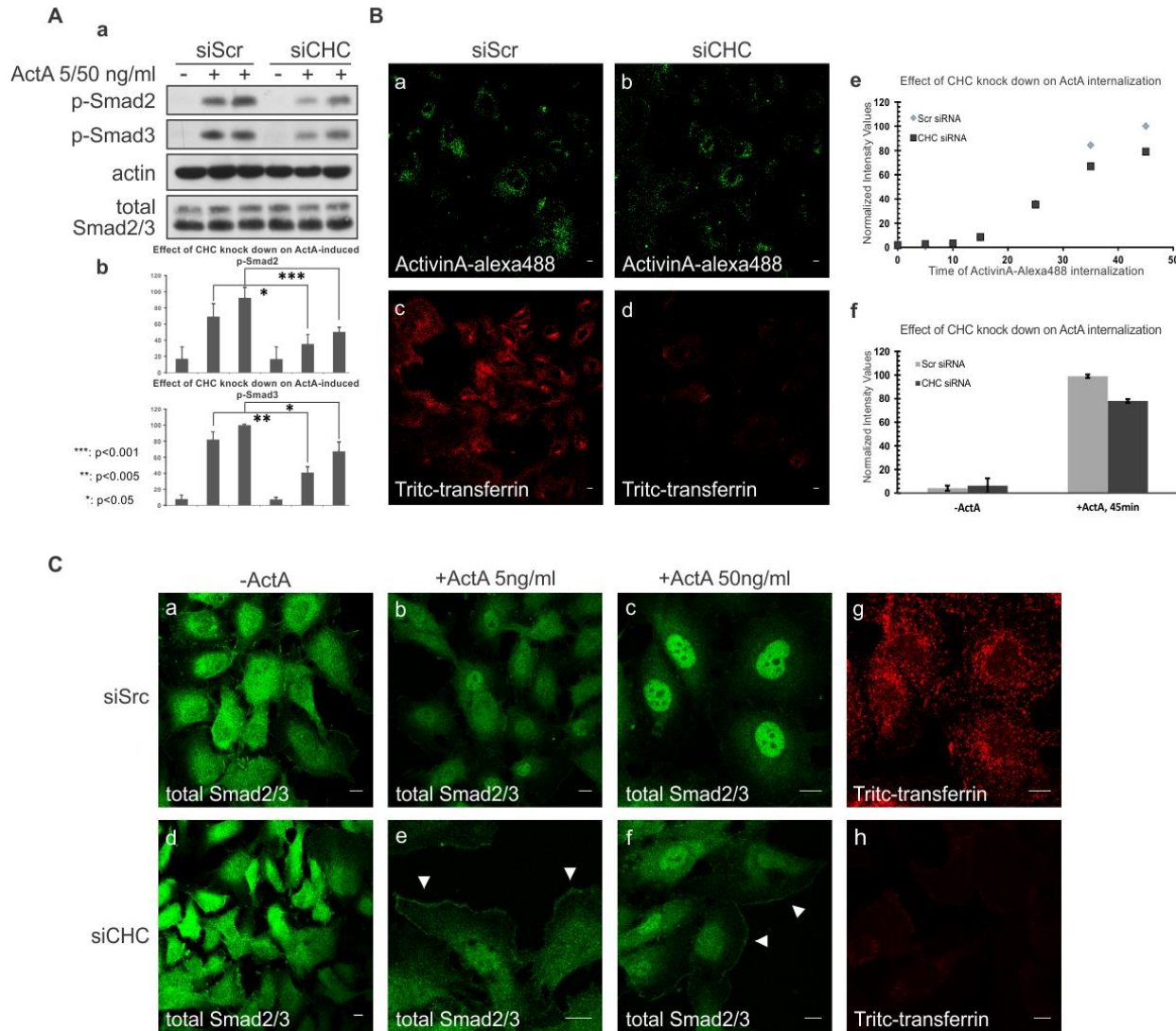
Όπως είδαμε και στην εισαγωγή, οι υποδοχείς του TGF-β που ενδοκυτταρώνονται από την κλαθρινο-εξαρτώμενη οδό, μεταφέρονται στα πρώιμα ενδοσώματα³⁰⁸, από όπου προάγουν τη σηματοδότηση. Η μελέτη του Runyan και των συνεργατών του, δείχνει ότι η εσωτερικοποίηση των υποδοχέων του TGF-β είναι απαραίτητη για τη μέγιστη δυνατή σηματοδότηση. Η αναστολή της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης, μειώνει τη φωσφορυλίωση της SMAD2 και κυρίως τη μετατόπισή της στον πυρήνα, αποτρέποντας την επαγόμενη από τον TGF-β μεταγραφή³¹⁶.

Βασικός μας στόχος ήταν να μελετήσουμε εάν η Ακτιβίνη Α και οι υποδοχείς της χρησιμοποιούν αυτό το βασικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, κι αν μέσω της κλαθρινο-εξαρτώμενης μεταφοράς επηρεάζεται η σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι της κλαθρίνης, και τα επίπεδα της επαγόμενης από Ακτιβίνη φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SMAD2/3 μελετήθηκαν με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western. Στην εικόνα 3.6Α παρατηρούμε ότι η αποσιώπηση της κλαθρίνης έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι οι υποδοχείς της Ακτιβίνης μετάγουν σήματα από το εσωτερικό των ενδοθηλιακών κυττάρων και συγκεκριμένα από τα πρώιμα ενδοσώματα.

Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε την εσωτερικοποίηση της σημασμένης Ακτιβίνης Α, υπό τη συνθήκη της αποσιώπησης της κλαθρίνης. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ibidi, τα οποία χρησιμοποιούνται για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRNA έναντι του mRNA της κλαθρίνης (siCHC). Μετά από καλλιέργεια 72 ωρών, υπέστησαν

στέρηση ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActivinA-Alexa488) ή η τρανσφερίνη (transferrin-tritc) για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Η τρανσφερίνη, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ενδοκυτταρώνεται με τον υποδοχέα της (TrfR) μέσω της κλαθρινο-εξαρτώμενης οδού. Έτσι, χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας για να εξακριβώσουμε την αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης, καθώς κύτταρα που δεν ενδοκυτταρώνουν την τρανσφερίνη, δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη κλαθρίνη. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρούμε τι συμβαίνει με τη σημασμένη Ακτιβίνη Α. Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα image j (B e,f) από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.6B, μετά από 45 λεπτά ενδοκυττάρωσης η ποσότητα της Ακτιβίνης Α, εντός των κυττάρων που δεν εκφράζουν την κλαθρίνη, είναι μειωμένη σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Στο πείραμα που αποτυπώνεται στην εικόνα 3.6C, τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRNA έναντι του mRNA της κλαθρίνης (siCHC). Μετά από 72 ώρες έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες, και επαγωγή με Ακτιβίνη Α (5 ή 50ng/ml) για 30 λεπτά. Στα 10 τελευταία λεπτά της επαγωγής προστέθηκε η τρανσφερίνη, προκειμένου να τεκμηριωθεί η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης. Τα κύτταρα στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν κι ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι των ολικών ενδογενών πρωτεϊνών SMAD2/3. Απουσία Ακτιβίνης Α, οι πρωτεΐνες SMAD2/3 εμφανίζουν διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό (3.6C a, d). Στα κύτταρα HUVEC που διαμολύνθηκαν με siRNA-μάρτυρα (siScr), παρουσία Ακτιβίνης Α, οι πρωτεΐνες SMAD2/3 φωσφορυλιώνονται και μετακινούνται στον πυρήνα (3.6C b, c). Φαίνεται ξεκάθαρα ότι αυτή η μετακίνηση είναι εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της Ακτιβίνης. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (50ng/ml) το σήμα είναι, ως επί το πλείστον, πυρηνικό (3.6C c). Αντίθετα, παρατηρούμε ότι στα κύτταρα HUVEC που έγινε αποσιώπηση της κλαθρίνης, η μετακίνηση των SMAD2/3 στον πυρήνα, είναι σαφώς μειωμένη, καθώς το πυρηνικό σήμα είναι λιγότερο. Ταυτόχρονα γίνεται έντονα διακριτός ο εντοπισμός των πρωτεϊνών SMAD2/3 στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (3.6C e,f, επισημαίνονται με τα λευκά βέλη). Είναι αρκετά πιθανό, απουσία κλαθρίνης, είτε οι υποδοχείς της Ακτιβίνης είτε οι SMAD2/3 να εγκλωβίζονται στη μεμβράνη, να μην μεταφέρονται στα πρώιμα ενδοσώματα από όπου μπορούν να μεταγουν σήματα, με αποτέλεσμα τόσο τη μειωμένη φωσφορυλίωση των καθοδικών πρωτεϊνών SMAD2/3, όσο και την περιορισμένη μετατόπιση στον πυρήνα, όπου οι SMAD2/3 δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες.



Εικόνα 3.6: Η επίδραση της αποσιώπησης της κλαθρίνης στην επαγόμενη από Ακτιβίνη Α σηματοδότηση.

A. Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRNA για τη βαριά αλυσίδα της κλαθρίνης (Clathrin Heavy Chain, siCHC) για 72 ώρες. Μετά από 2 ώρες στέρησης ορού έγινε επαγωγή των κυττάρων με Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά (ActA 5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western, με χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, SMAD2/3 και ακτίνης. Στην εικόνα παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από τα τέσσερα. **B.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τύπου IBIDI και διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siCHC. Μετά από 72 ώρες υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες και προστέθηκαν η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActivinA-Alexa488) ή η τρανσφερίνη (transferrin) για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (live imaging). Στις εικόνες διακρίνεται η ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α (a,b) και της τρανσφερίνης (c,d). Στα γραφήματα δεξιά (e,f) φαίνεται η ποσοτικοποίηση της έντασης της Ακτιβίνης Α μετά από ενδοκυττάρωση χρονικής διάρκειας 45 λεπτών. **C.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και διαμολύνθηκαν με siRNA-μάρτυρα (a-c, g) και siCHC (d-f, h). Μετά από 72 ώρες, έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή με Ακτιβίνη Α (5 ή 50ng/ml) για 30 λεπτά.

Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι των ενδογενών SMAD2/3. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης της κλαθρίνης πιστοποιείται με την ενδοκυττάρωση της τρανσφερίνης (g, h). Ράβδος κλίμακας, 10μM. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

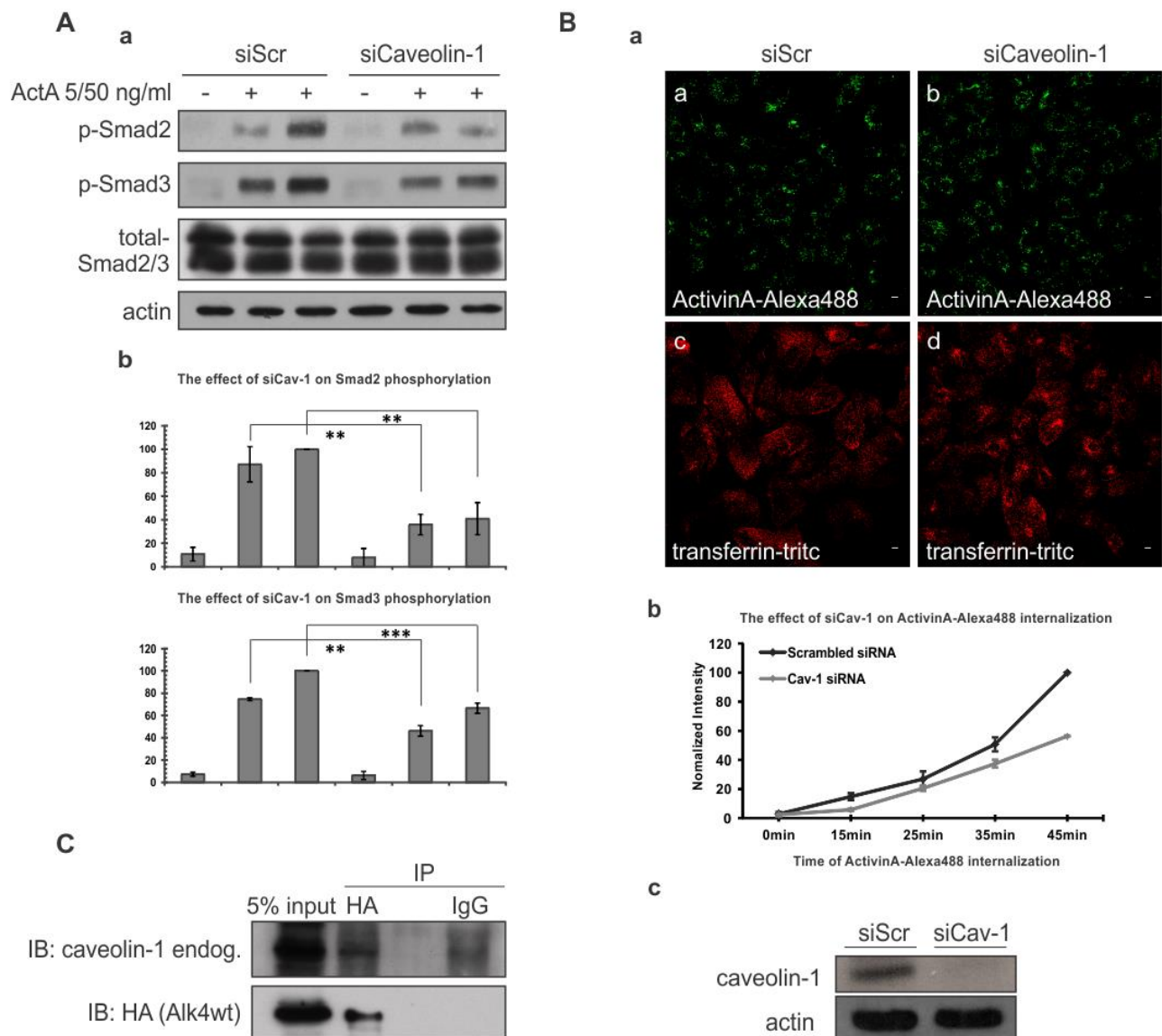
3.2.2 Ο Ρόλος της καβεολίνης -1 στη μεταγωγή του σήματος της Ακτιβίνης Α και την ενδοκυττάρωσή της

Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η καβεολίνη-1 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης μέσω των SMAD πρωτεϊνών. Η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποδοχέα ΤβRI, στην περιοχή CSD ³¹⁷. Στην ίδια έρευνα φαίνεται πως η φωσφορυλίωση της SMAD2, καθώς και η μετακίνησή της στον πυρήνα, δεν συμβαίνει όταν υπερεκφράζεται η καβεολίνη-1. Πράγματι, συγκριτική μελέτη στα ίδια κύτταρα απέδειξε ότι η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση προάγει τη σηματοδότηση, ενώ αντίθετα η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων ΤβR μέσω των καβεοσωμάτων οδηγεί στην αναστολή της σηματοδότησης ³⁰⁸.

Παρότι υπάρχουν αρκετά και πειστικά δεδομένα ότι η καβεολίνη είναι αρνητικός ρυθμιστής της επαγόμενης από τον TGF-β σηματοδότησης, τα στοιχεία για την επίδρασή της στη μεταγωγή του σήματος από την Ακτιβίνη Α είναι ελλιπή. Για το λόγο αυτό προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε το ρόλο της καβεολίνης-1 στη μεταγωγή του σήματος και την εσωτερικοποίηση της Ακτιβίνης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται στην εικόνα 3.7. Αρχικά, μελετήσαμε αν υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με τον υποδοχέα τύπου Ι της Ακτιβίνης, ALK4, όπως αντίστοιχα συμβαίνει με τον υποδοχέα ΤβRI. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης, μεταξύ των πρωτεϊνών ALK4-HA και GFP-caveolin-1. Κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή GFP-caveolin-1 και επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό ALK4-HA. Καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες στους 37°C και ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα α-HA ή με το μη ειδικό rat-IgG αντίσωμα (αρνητικός μάρτυρας), όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.7C, η πρωτεΐνη ALK4-HA συν-κατακρημνίζει την πρωτεΐνη caveolin-1, κάτι που σημαίνει ότι οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα.

Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα αποσιώπησης του γονιδίου της καβεολίνης-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, και μελέτη της επίδρασής της τόσο σε επίπεδο φωσφορυλίωσης των SMADs, όσο και στην ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western, με τη χρήση αντισώματος έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης (Εικ. 3.7B c). Όπως γίνεται αντιληπτό από την εικόνα 3.7A η φωσφορυλίωση των SMAD2/3 μειώνεται

αισθητά όταν δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη καβεολίνη-1, ενώ αντίστοιχα παρατηρείται ελαττωμένη ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α, της τάξεως του 30% (Εικ. 3.7B).



Εικόνα 3.7: Ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην σηματοδότηση και την ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης Α.

A. Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRNA για την καβεολίνη-1 (siCaveolin-1) για 72 ώρες. Στη συνέχεια, ακολούθησε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή με Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά (ActA 5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western, με χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3 και ακτίνης. Παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από τα τέσσερα (a). Στο κάτω μέρος του σχήματος τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν την ποσοτικοποίηση με βάση την ακτίνη (b). **B.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τύπου IBIDI και διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRNA για την καβεολίνη-1 (siCaveolin-1). Έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και

προσθήκη σημασμένης Ακτιβίνης A (a, b) ή σημασμένης τρανσφερίνης (c, d) για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (live imaging). Κάτω και δεξιά του σχήματος το γράφημα (b) δείχνει την ποσοτικοποίηση της έντασης της Ακτιβίνης A μετά από ενδοκυττάρωση χρονικής διάρκειας 45 λεπτών. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western με τη χρήση αντισώματος έναντι της ενδογενούς καθεολίνης-1 (c).

C. Κύτταρα HEK 293F επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό που εκφράζει τον ALK4-HA αγρίου τύπου και καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε το πρωτόκολλο της συν-ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα α-HA rat, όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. Έγινε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι της ενδογενούς καθεολίνης-1 και του επιτόπου HA. Ράβδος κλίμακας 10μM. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

3.2.3 Μακροπινוקυττάρωση: Η απρόσμενη οδός ενδοκυττάρωσης του συμπλέγματος της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της

Η μακροπινוקυττάρωση είναι μια διαδικασία ενδοκυττάρωσης υγρών, διαλυμένων ουσιών, προσδετών και υποδοχέων που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, η μακροπινוקυττάρωση δεν πραγματοποιείται συνεχώς και αδιαλείπτως, αλλά επάγεται και είναι ενεργή για περιορισμένο χρόνο. Αυξητικοί παράγοντες, προσδέτες των ιντεγκρινών, αλλά και η φωσφατυδιλοσερίνη των μεμβρανών μπορούν να δράσουν ως επαγωγείς της μακροπινוקυττάρωσης

³¹⁸.

Ακόμη και πρόσφατα, η μακροπινוקυττάρωση δεν είχε συνδεθεί με σηματοδοτικά μονοπάτια και θεωρούνταν μια γενικευμένη διαδικασία ενδοκυττάρωσης απαραίτητων συστατικών. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η μακροπινוקυττάρωση επάγεται μέσα από ένα σύνθετο δίκτυο σηματοδότησης, όπως είδαμε και στην εισαγωγή, ενώ παράλληλα τα μακροπινোসώματα είναι πιθανό να λειτουργούν ως πλατφόρμες σηματοδότησης. Έχει αποδειχθεί ότι αυξητικοί παράγοντες όπως ο PDGF (platelet-derived growth factor) ³¹⁹ και ο EGF (epidermal growth factor) ²⁷³ μπορούν να επάγουν τη μακροπινוקυττάρωση. Επίσης, έχειδειχθεί ότι οι μετασχηματισμένοι H-RasG12V ινοβλάστες παρουσιάζουν ενισχυμένη φωσφορυλίωση του υποδοχέα PDGFRβ, λόγω αυξημένης μακροπινוקυττάρωσης. Αυτή η αυξημένη ενεργοποίηση του PDGFRβ ενισχύεται περαιτέρω, όταν ενεργοποιείται και ο υποδοχέας EGFR, κάτι που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών κυταροκινών μπορεί να ρυθμίζεται μέσω της μακροπινוקυττάρωσης των ενεργοποιημένων υποδοχέων (320). Τέλος, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, η αναστολή της μακροπινוקυττάρωσης εμποδίζει τη μετατόπιση της ErbB3 στον πυρήνα μεταβάλλοντας τη σηματοδότηση ³²¹. Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι οι τελευταίες έρευνες αναδεικνύουν έναν καινούριο ρόλο για τη μακροπινוקυττάρωση και τη συνδέουν με τη ρύθμιση της σηματοδότησης, χωρίς όμως να έχουν αποσαφηνιστεί οι περισσότερες πτυχές της διαδικασίας.

Σκοπός μας στην παρούσα εργασία ήταν να μελετήσουμε τη μακροπινוקυττάρωση και την πιθανή συμβολή της στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της. Απουσία βιβλιογραφικών δεδομένων, αρχικά μελετήσαμε αν η Ακτιβίνη Α χρησιμοποιεί αυτή την οδό εσωτερικοποίησης. Με βάση τη κινητική της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων ActRIIB και ALK4 (αποτελέσματα 3.1), παρατηρήσαμε ότι ο συνεντοπισμός με την πρωτεΐνη Rabankyrin-5 ήταν απρόσμενα υψηλός, μια πρώτη

αλλά σημαντική ένδειξη ότι η οδός αυτή χρησιμοποιείται από τη Ακτιβίνη Α. Αυτό επιβεβαιώθηκε με τα επόμενα πειράματα. Στην εικόνα 3.8Α, με ένα πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας, παρατηρήσαμε ότι η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActivinA-Alexa488) συνεντοπίζεται στα μακροπινোসώματα με τη σημασμένη δεξτράνη υψηλού μοριακού βάρους (Dextran-TexasRed, 70KDa). Η εσωτερικοποίηση της Dextran-TexasRed γίνεται κυρίως μέσω μακροπινοκυττάρωσης, γι' αυτό αποτελεί την πιο κλασική μάρτυρα αυτών των κυστιδίων, και χρησιμοποιείται ευρέως.

Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, δεν υπάρχουν πρωτεΐνες-δείκτες που να χαρακτηρίζουν αποκλειστικά ένα είδος κυστιδίων. Κι αυτό γιατί τα κυστίδια αποσχίζονται από τη μεμβράνη (scission), συντήκονται με άλλα κυστίδια εντός του κυττάρου (fusion) και διαχωρίζονται ξανά (fission), κατά τη διάρκεια της κυστιδιακής μεταφοράς. Έτσι η Rabankyrin-5 για παράδειγμα, είναι μάρτυρας των μακροπινωσμάτων, αλλά μπορεί να βρίσκεται και στα πρώιμα ενδοσώματα, κατά τη σύντηξη των δύο τύπων κυστιδίων. Γι' αυτό το λόγο σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, τα μακροπινোসώματα ταυτοποιούνται κυρίως με βάση το μέγεθός τους σε σχέση με άλλα κυστίδια. Τα μακροπινোসώματα έχουν διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 0.2 έως 5.0 μm , είναι δηλαδή σαφώς μεγαλύτερα από τα επικαλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια (50-200nm) και τα επικαλυμμένα με καβεολίνη κυστίδια (50nm). Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ibidi μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% περίπου και στη συνέχεια προστέθηκε η σημασμένη Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς Rabankyrin-5, και συνεστιακή μικροσκοπία. Με τη βοήθεια του προγράμματος MotionTracking μετρήθηκε η διάμετρος των κυστιδίων που είναι θετικά για τη σημασμένη Ακτιβίνη Α (Εικόνα 3.8Β). Παρατηρούμε ότι η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 0,130 μm μέχρι και 1,5 μm , με τη πλειοψηφία τους να έχουν διάμετρο από 0,25 μm έως 0,4 μm . Συγκριτικά μετρήθηκε η διάμετρος των κυστιδίων θετικών για την τρανσφερίνη, η οποία εντοπίζεται στα επικαλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια. Τα κυστίδια αυτά έχουν στην πλειοψηφία τους διάμετρο μικρότερη από 200nm. Συμπερασματικά, ο πληθυσμός των κυστιδίων της Ακτιβίνης Α, αν παρουσιάζει ετερογένεια στο μέγεθος, χαρακτηρίζεται από μεμβρανικά κυστίδια μεγάλης διαμέτρου, αυτά που ονομάζουμε μακροπινোসώματα.

Επιπρόσθετα, εξετάσαμε εάν η μακροπινοκυττάρωση συμμετέχει στην ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α, μέσω αποσιώπησης της Rabankyrin-5. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ibidi και διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRabankyrin-5 για 72 ώρες. Έγινε

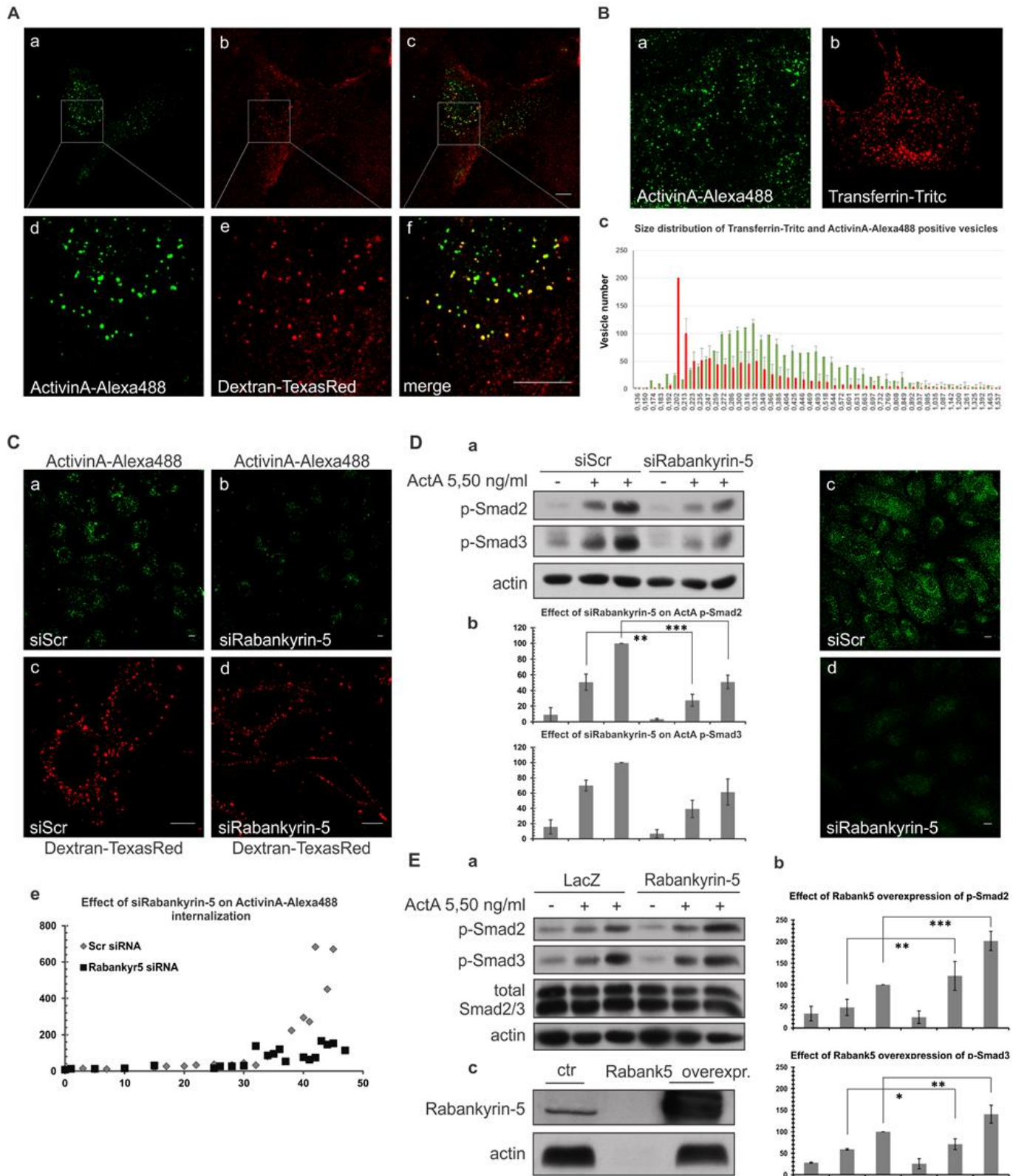
στέρηση ορού για 2 ώρες και προσθήκη της σημασμένης Ακτιβίνης Α (3.8C a, b) ή της σημασμένης Dextran-TexasRed (3.8C c, d), και ακολούθησε μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (live cell imaging). Με βάση την ποσοτικοποίηση της έντασης της σημασμένης Ακτιβίνης Α (3.8C e), διαπιστώνουμε ότι η αποσιώπηση της Rabankyrin-5 παρεμποδίζει σημαντικά την ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης Α. Παρατηρήσαμε επίσης ότι σε αρκετά κύτταρα, απουσία της Rabankyrin-5, πολλά κυστίδια θετικά είτε για Ακτιβίνη Α είτε για Dextran-TexasRed, εντοπίζονται στην περιφέρεια του κυττάρου, σχηματίζοντας δακτυλίους, και δεν μεταφέρονται στο εσωτερικό του. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί ενδεχομένως από το γεγονός ότι η Rabankyrin-5 αλληλεπιδρά με τη Rab-5 και επηρεάζει τη σύντηξη μεταξύ των μακροπινωσμάτων με τα πρώιμα ενδοσώματα, εμποδίζοντας τη σωστή μεταφορά και παράδοση της πρωτεΐνης-φορτίου στον επόμενο σταθμό της.

Επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε τη σημασία της μακροπινοκυττάρωσης στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α. Θελήσαμε δηλαδή να εξετάσουμε εάν το μονοπάτι αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνει επαγωγή της σηματοδότησης, ή εάν σχετίζεται με την ανακύκληση ή και την αποικοδόμηση των υποδοχέων. Για το σκοπό αυτό ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRNA έναντι του mRNA που εκφράζει τη Rabankyrin-5 (siRabankyrin-5) για 72 ώρες. Έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή με Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά ActA (5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western, με χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών φώσφο-SMAD2, φώσφο-SMAD3 και ακτίνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε αρκετές φορές και στην εικόνα 3.8D παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό. Η αποσιώπηση της Rabankyrin-5 οδηγεί σε στατικά πολύ σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών. Για να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης κάναμε έμμεσο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης αλλά και ανοσοαποτύπωση κατά western (Εικόνα 3.8D c, d).

Τέλος, η προηγούμενη παρατήρηση ότι η αποσιώπηση της Rabankyrin-5 μειώνει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SMAD2/3, οδήγησε στη λογική σκέψη ότι η υπερέκφραση της Rabankyrin-5 θα οδηγούσε στο αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή στην αύξηση της φωσφορυλίωσης. Αυτό επιβεβαιώθηκε με το πείραμα που απεικονίζεται στην εικόνα 3.8E. Κύτταρα HUVEC επιμολύνθηκαν με τους αδενοϊούς LacZ (αρνητικός μάρτυρας) και Rabankyrin-5 για 24h. Κατόπιν, έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή για 30 λεπτά με Ακτιβίνη Α (ActA 5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών φώσφο-

SMAD2, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Όπως αναμενόταν η υπερέκφραση της Rabankyrin-5 (Εικ. 3.8Ε c) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών (Εικ. 3.8Ε a, b).

Εικόνα 3.8: Ο ρόλος της πρωτεΐνης Rabankyrin-5 στη σηματοδότηση και ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης Α. Α. Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRabankyrin-5 για 72 ώρες. Έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή με Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά ActA (5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western, με χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3 και ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση από 4 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζεται στα γραφήματα. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης ελέγχθηκε μετά από έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα για την ενδογενή Rabankyrin-5 (a,b). **Β.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τύπου IBIDI και διαμολύνθηκαν είτε με siRNA-μάρτυρα (siScr) είτε με siRabankyrin-5 για 72 ώρες. Ακολούθησε στέρηση ορού για 2 ώρες και προσθήκη σημασμένης Ακτιβίνης Α (a, b) ή σημασμένης Dextran-TexasRed (c, d). Στο γράφημα παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση της έντασης της Ακτιβίνης Α, σε διάφορα χρονικά διαστήματα. **Γ.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία IBIDI μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70%. Προστέθηκε η σημασμένη Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς Rabankyrin-5 (a, b, c). Το μήκος των μεμβρανικών κυστιδίων, θετικών για την ActivinA-Alexa488 μετρήθηκε με το λογισμικό MotionTracking και παρουσιάζεται στο γράφημα δεξιά (d). **Δ.** Κύτταρα HUVEC επιμολύνθηκαν με τους αδενοϊούς LacZ (αρνητικός μάρτυρας) και Rabankyrin-5 για 24h. Μετά την υπερέκφρασή τους, έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες και επαγωγή για 30 λεπτά με Ακτιβίνη Α (ActA 5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση από 3 ανεξάρτητα πειράματα φαίνεται στο γράφημα. Ράβδος κλίμακας, 10μΜ. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

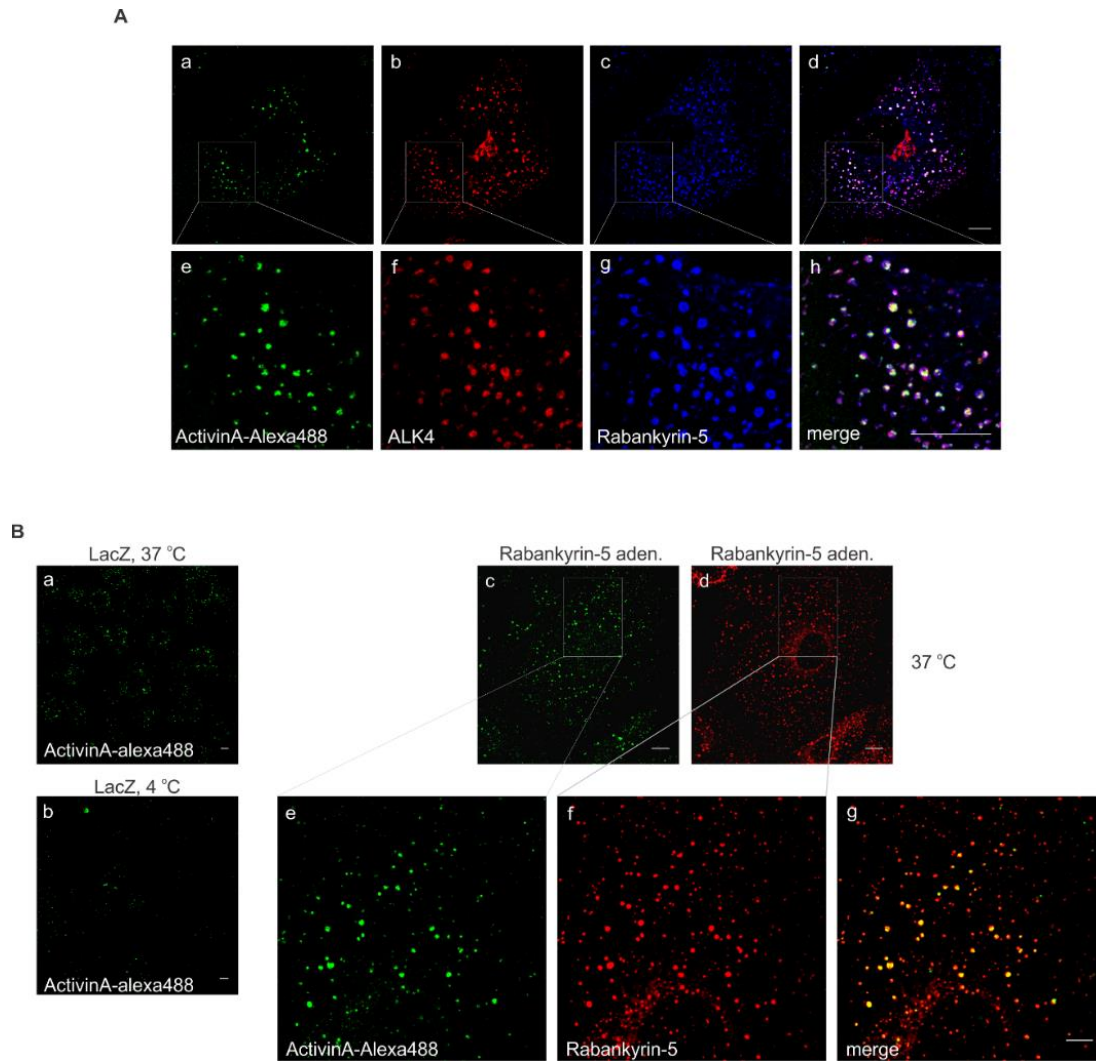


Παράλληλα με τα πειράματα της εικόνας 3.8, πραγματοποιήσαμε πειράματα ελέγχου ώστε να διαλευκάνουμε αν η μακροπινोκυττάρωση της Ακτιβίνης Α i) πραγματοποιείται ως σύμπλεγμα με τους υποδοχείς της και ii) εάν η Ακτιβίνη Α μπορεί να επάγει τη μακροπινοκυττάρωση.

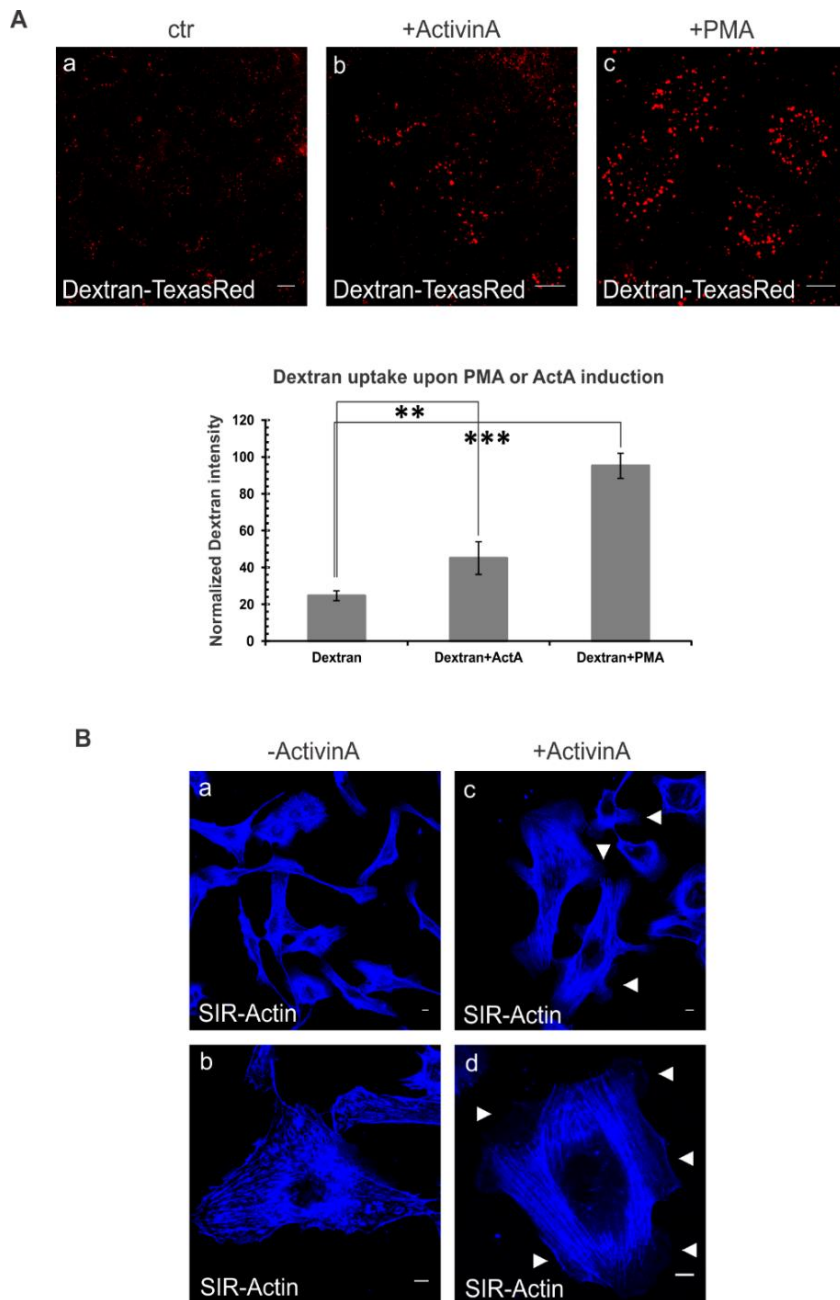
Για τον πρώτο στόχο πραγματοποιήσαμε δύο πειράματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.9. Στο πρώτο πείραμα (Εικ. 3.9Α) ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό ALK4-HA, έγινε προσθήκη της σημασμένης Ακτιβίνης Α και ακολούθησε έμμεσος διπλός ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι του ALK4 (α-HA rat) και της ενδογενούς Rabankyrin-5. Ο τριπλός συνεντοπισμός της Ακτιβίνης Α, του υποδοχέα ALK4 και της Rabankyrin-5 στα μακροπινοςώματα είναι παραπάνω από εμφανής και αποδεικνύει ότι τόσο η Ακτιβίνη Α όσο και οι υποδοχείς της χρησιμοποιούν την οδό της μακροπινοκυττάρωσης προκειμένου να εισέλθουν στο κύτταρο.

Επιπρόσθετα, στο πείραμα της εικόνας 3.9Β κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία libidi μέχρι πληρότητας 50% και επιμολύνθηκαν με τους αδενοϊούς LacZ (μάρτυρας, a, b) και Rabankyrin-5 (c, d). 24 ώρες μετά, τα κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες, μεταφέρθηκαν στον πάγο και επώαστηκαν με κρύο θρεπτικό υλικό, χωρίς ορό, για 15 λεπτά. Προστέθηκε η ActivinA-Alexa488 για 1 ώρα προκειμένου να προσδεθεί στους μεμβρανικούς υποδοχείς. Έπειτα αφαιρέθηκε και έγιναν 2 πλύσεις με κρύο διάλυμα φωσφορικών (PBS), ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της σημασμένης Ακτιβίνης. Για κάθε συνθήκη (επιμόλυνση με αδενοϊούς LacZ ή Rabankyrin-5) ένα τρυβλίο διατηρήθηκε στους 4°C με κρύο θρεπτικό υλικό, και ένα μεταφέρθηκε στους 37°C με προθερμασμένο θρεπτικό υλικό για 30 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η ενδοκυττάρωση. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS, μονιμοποίηση και έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς Rabankyrin-5. Και στις 2 περιπτώσεις η Ακτιβίνη Α ενδοκυτταρώνεται στους 37°C και όχι στους 4°C, αποδεικνύοντας ότι η εσωτερικοποίηση αυτή διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς της, ALK4 και ActRIIB. Επιπρόσθετα, ο συνεντοπισμός της ActivinA-Alexa488 με τη Rabankyrin-5, που διακρίνεται στις εικόνες 3.9B c και d, όπως και στη μεγέθυνσή τους (e, f, g), αναδεικνύει ότι η παρουσία της σημασμένης Ακτιβίνης Α στα μακροπινοςώματα, καθοδηγείται από τους υποδοχείς και δεν γίνεται τυχαία λόγω μαζικής ή τυχαίας ενδοκυττάρωσης.

Για την επίτευξη του δεύτερου στόχου, τη διερεύνηση επαγωγής της μακροπινοκυττάρωσης από την Ακτιβίνη, πραγματοποιήθηκαν δύο κλασικά πειράματα με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα. Στο πείραμα της εικόνας 3. 10Α γίνεται ενδοκυττάρωση της δεξτράνης (Dextran-TexasRed) απουσία και παρουσία



Εικόνα 3.9. Η ενδοκυττάρωση της *ActivinA-Alexa488* στα μεμβρανικά κυστίδια, θετικά για *Rabankyrin-5*, συμβαίνει ταυτόχρονα με τους υποδοχείς της *ALK4* και *ActRIIB*. **A.** Η σημασμένη Ακτιβίνη Α και ο υποδοχέας *ALK4* συνεντοπίζονται στα θετικά για *Rabankyrin-5* κυστίδια. Κύτταρα HUVEC επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό *ALK4-HA* για 24 ώρες. Μετά από στέρηση ορού για 2 ώρες, προστέθηκε η σημασμένη Ακτιβίνη Α (*ActivinA-Alexa488*), τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός, με αντισώματα έναντι του *ALK4* (α -HA rat) και της ενδογενούς *Rabankyrin-5*. Ο τριπλός συνεντοπισμός διακρίνεται στην εικόνα (a-d), όπως επίσης και στη μεγέθυνσή της (e-h). **B.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία IBIDI μέχρι πληρότητας 50% και επιμολύνθηκαν με τους αδενοϊούς *LacZ* (μάρτυρας, a, b) και *Rabankyrin-5* (c, d). 24 ώρες μετά, έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στον πάγο και επώαστηκαν με κρύο θρεπτικό υλικό, χωρίς ορό, για 15 λεπτά. Προστέθηκε η *ActivinA-Alexa488* για 1 ώρα. Η *ActivinA-Alexa488* αφαιρέθηκε και έγιναν 2 πλύσεις με κρύο διάλυμα φωσφορικών (PBS). Για κάθε συνθήκη ένα τρυβλίο διατηρήθηκε στους 4°C με κρύο θρεπτικό υλικό, και ένα μεταφέρθηκε στους 37°C με προθερμασμένο θρεπτικό υλικό για 30 λεπτά. Έγινε μία πλύση των κυττάρων με PBS, μονιμοποίηση και έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς *Rabankyrin-5*. Ο συνεντοπισμός της *ActivinA-Alexa488* με τη *Rabankyrin-5* διακρίνεται στις εικόνες c και d, όπως και στη μεγέθυνσή τους (e, f, g). Ράβδος κλίμακας, 10μM.



Εικόνα 3.10 Η Ακτιβίνη Α επάγει τη μακροπinoκυττάρωση. Α. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε 3 τρυβλία Ibidi μέχρι πληρότητας 60%. Προστέθηκαν 25μg/ml Dextran-TexasRed (a, κύτταρα-μάρτυρες), και μαζί με Ακτιβίνη Α 50ng/ml (b), ή με PMA 1μM για 15 λεπτά, σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό. Έγιναν 2 πλύσεις με διάλυμα φωσφορικών (PBS) και μονιμοποίηση των κυττάρων με rfa (3,6%). Εικόνες μικροσκοπίας αναλύθηκαν ως προς την ένταση του σήματος της Dextran-TexasRed με το λογισμικό ImageJ. Η ποσοτικοποίηση παρουσιάζεται στο διάγραμμα.

Β. Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Ibidi 4 φρεατίων μέχρι πληρότητας 40-50%. Έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες, στη διάρκεια της οποίας (1 ώρα) προστέθηκε το αντιδραστήριο SIR-actin (1μM) για 1 ώρα. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με διάλυμα φωσφορικών (PBS) και μικροσκοπία πραγματικού χρόνου για

40 λεπτά (37°C, CO₂ 5%). Από τα βίντεο, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες απουσία (a, b) και παρουσία (c, d) Ακτιβίνης Α. Με λευκά βέλη επισημαίνονται οι πτυχώσεις της μεμβράνης που δημιουργούνται παρουσία Ακτιβίνης Α. Ράβδος Κλίμακας, 10μM.

Ακτιβίνης Α ή PMA (phorbol myristate acetate). Είναι γνωστό ότι, το PMA επάγει τη μακροπinoκυττάρωση, έτσι το χρησιμοποιήσαμε ως θετικό μάρτυρα. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα

3.10 A, με βάση την ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος, τόσο το PMA όσο και η Ακτιβίνη A επάγουν την ενδοκυττάρωση του πολυσακχαρίτη Dextran-TexasRed. Στο πείραμα της εικόνας 3.10B έγινε χρώση των κυττάρων με το αντιδραστήριο SIR-actin, το οποίο προσδένεται στα ινίδια της ακτίνης. Ακολούθησε μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (βίντεο) απουσία και παρουσία Ακτιβίνης A. Είναι παραπάνω από εμφανές ότι η επαγωγή με Ακτιβίνη A προκαλεί μεγάλη κινητικότητα στα κύτταρα και κυρίως στην πλασματική μεμβράνη. Οι φωτογραφίες 3.10B είναι αντιπροσωπευτικές στατικές εικόνες (snapshots), ενώ με λευκά βέλη επισημαίνονται οι πτυχώσεις της μεμβράνης. Συμπερασματικά, με αυτή τη σειρά των πειραμάτων αποδείξαμε ότι η Ακτιβίνη A ανήκει στους αυξητικούς παράγοντες που επάγουν τη μακροπινοκυττάρωση (growth factor induced macropinocytosis).

3.2.4 Η αναστολή της μακροπινοκυττάρωσης συνδυάζεται με δραματική μείωση της σηματοδότησης της Ακτιβίνης A

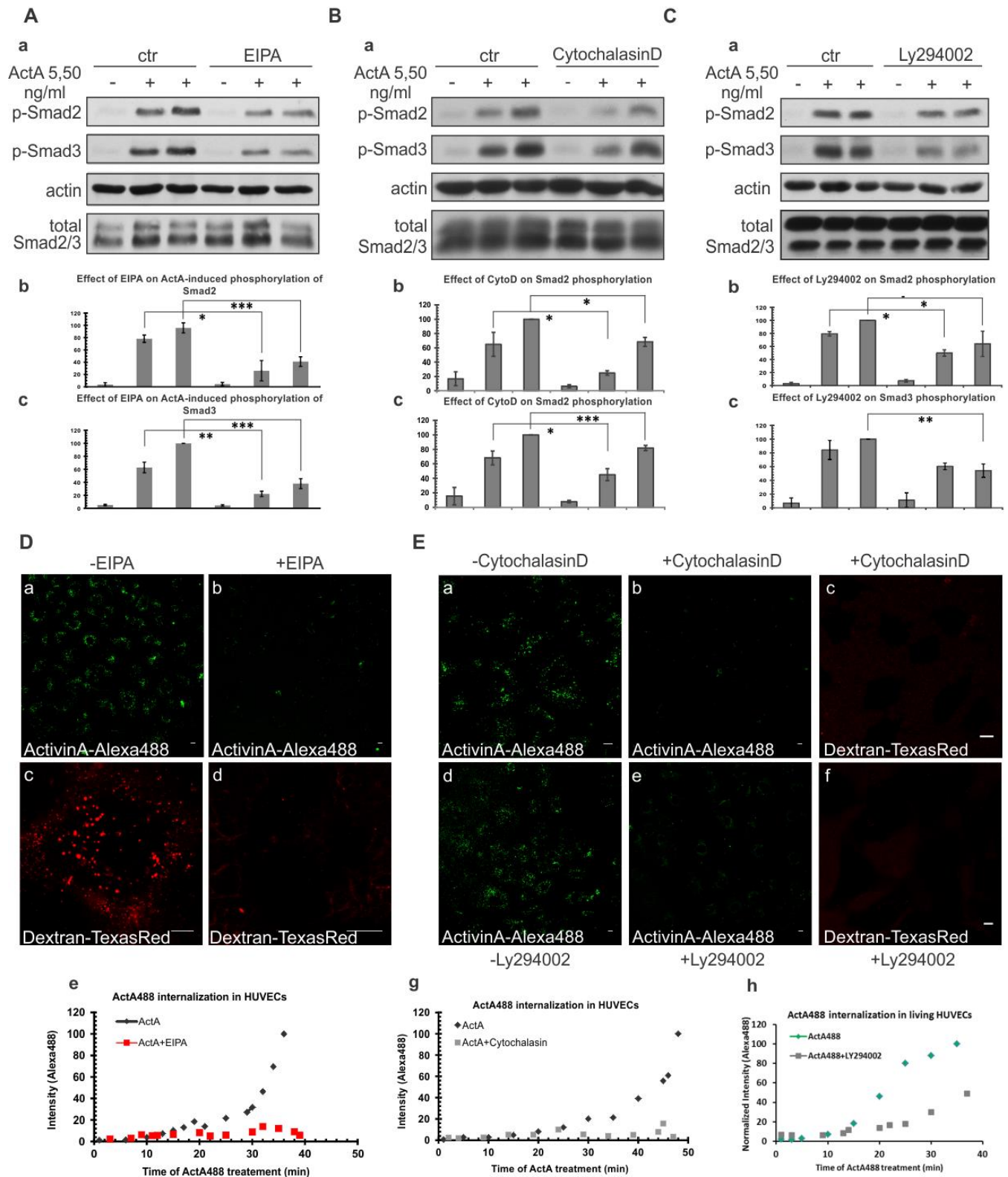
Όπως αναλύσαμε στην εισαγωγή, η μακροπινοκυττάρωση είναι μια διαδικασία που ρυθμίζεται από σηματοδοτικά μόρια, όπως η PI3 κινάση, και απαιτεί την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, γι' αυτό και εξαρτάται από την ακτίνη. Μετά τις παρεμβάσεις που κάναμε σε μόρια-κλειδιά της διαδικασίας, όπως η Rabankyrin-5, προχωρήσαμε με τη χρήση χημικών αναστολέων της μακροπινοκυττάρωσης, προκειμένου να αποδείξουμε με αδιαμφισβήτητο τρόπο ότι το μονοπάτι αυτό συμμετέχει στην ενδοκυττάρωση και τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης A, δεδομένου ότι πρόκειται για νέα γνώση που δεν έχει αναφερθεί ποτέ ξανά στη βιβλιογραφία.

Ο χημικός αναστολέας EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride) παρεμποδίζει τη δράση της αντλίας Na^+/H^+ , κάτι που συνεπάγεται μείωση του pH στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και αναστολή της σηματοδότησης από τη Rac1 και τη Cdc42³²². Ο αναστολέας Cytochalasin D καταστρέφει τα μικροϊνίδια της ακτίνης, παρεμποδίζοντας την κίνηση του κυτταροσκελετού και την πτύχωση της μεμβράνης (ruffling), που συντελούν στη δημιουργία των μακροπινωσμάτων. Η χημική ένωση LY294002 αναστέλει τις PI3 κινάσες (phosphoinositide 3-kinases). Για τους τρεις αναστολείς ακολουθήσαμε την εξής πειραματική διαδικασία: Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν μέχρι πληρότητας 70-80%, υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια έγινε προσθήκη των χημικών αναστολέων EIPA (100Μμ) ή CytochalasinD (10μg/ml) ή LY294002 (60Μμ) για 20 λεπτά, και επαγωγή με Ακτιβίνη A (ActA 5 ή 50ng/ml) για 30 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων προέκυψαν με βάση

τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western, με αντισώματα έναντι των ενδογενών φώσφο-SMAD2, φώσφο-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.11, Aa, Ba και Ca. Στα γραφήματα από κάτω παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση για τις φώσφο-SMAD2 (b) και φώσφο-SMAD3 (c), τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Όπως παρατηρούμε και οι τρεις αναστολές προκαλούν μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών, κάτι που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της αποσιώπησης της πρωτεΐνης Rabankyrin-5.

Τέλος, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία για τη μελέτη της ενδοκυττάρωσης της σημασμένης Ακτιβίνης A, μόνο που σε αυτή την περίπτωση έγινε μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Ως μάρτυρας της μακροπινोकυττάρωσης χρησιμοποιήθηκε ο σημασμένος πολυσακχαρίτης Dextran-TexasRed. Παρουσία των αναστολέων παρατηρείται δραματική μείωση της ποσότητας της Ακτιβίνης A που εισέρχεται στο κύτταρο. Οι φωτογραφίες στην εικόνα 3.11D και E, είναι ενδεικτικές. Η ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος της Ακτιβίνης A, παρουσιάζεται στα γραφήματα Df και E g,h.

Εικόνα 3.11. Η επίδραση των αναστολέων της μακροπινोकυττάρωσης στη σηματοδότηση και την ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης A. A, B και C: Σε κύτταρα HUVEC πληρότητας 70% έγινε στέρηση ορού για 2 ώρες. Ακολούθησε προσθήκη των χημικών αναστολέων EIPA (100Mμ) (A) ή CytochalasinD (10μg/ml) (B) ή LY294002 (60Mμ) (C) για 20 λεπτά και επαγωγή με Ακτιβίνη A (ActA 5 ή 50ng/ml) για 30 λεπτά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western, με αντισώματα έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Στα γραφήματα από κάτω παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση για τις p-SMAD2 (b) και p-SMAD3 (c), τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. **D και E:** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Ibidi, και υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη των αναστολέων EIPA (100Mμ) (D), ή CytochalasinD (10μg/ml) (E a,b,c) ή LY294002 (60Mμ) (E d, e, f). Προστέθηκαν είτε η σημασμένη Ακτιβίνη A (ActivinA-Alexa488) είτε η σημασμένη δεξτράνη (Dextran-TexasRed), παρουσία και απουσία του αναστολέα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες παρουσιάζονται, μετά από μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (live imaging). Τα γραφήματα f, g και h δείχνουν την ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος της ActivinA-Alexa488, που έχει ενδοκυτταρωθεί στη διάρκεια του χρόνου. Ράβδος κλίμακας, 10μM. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.



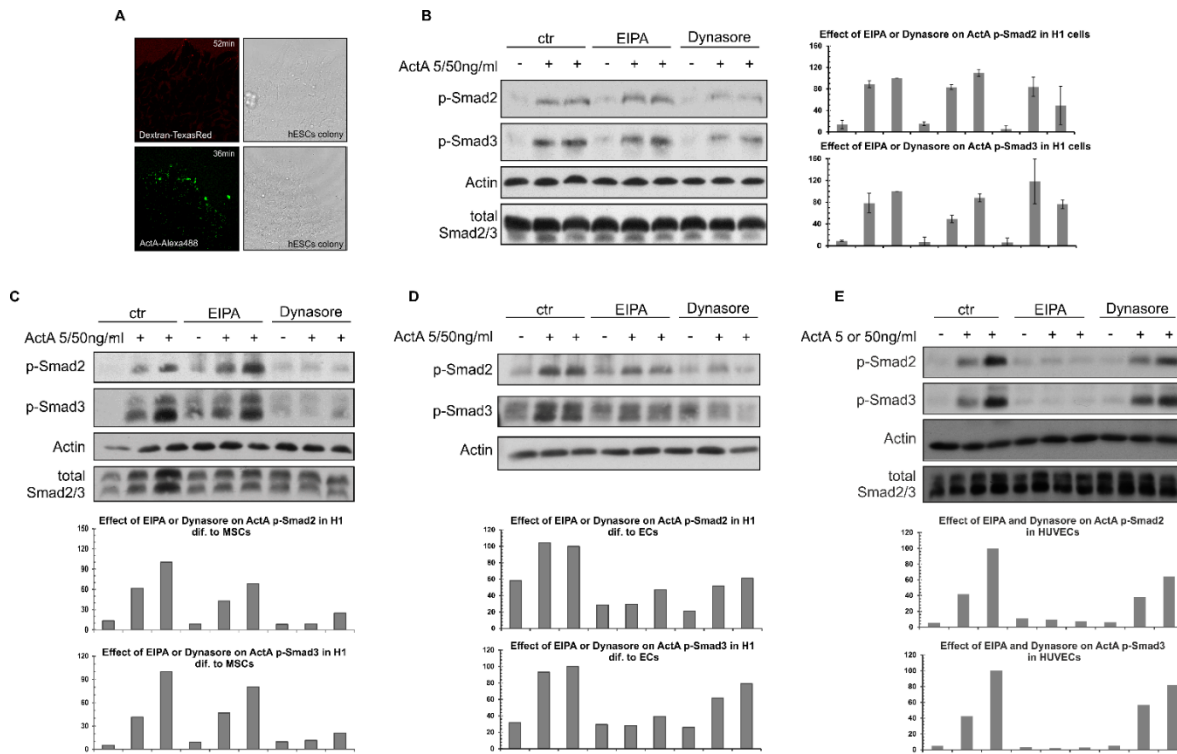
3.2.5 Ο περιορισμένος ρόλος της μακροπινוקυττάρωσης στη μεταγωγή του σήματος της Ακτιβίνης Α στα βλαστικά κύτταρα

Η μη αναμενόμενη χρησιμοποίηση της οδού της μακροπινוקυττάρωσης από την Ακτιβίνη Α δημιούργησε άμεσα αρκετά ερωτήματα. Ένα από τα βασικά ερωτήματα είχε σχέση με τον αναπτυξιακό ρόλο της Ακτιβίνης Α και της δρασικότητάς της στα βλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η χρησιμοποίηση της μακροπινוקυττάρωσης από την Ακτιβίνη Α, που περιγράφηκε στην διατριβή αυτή, τεκμηριώθηκε σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Δημιουργήθηκε, λοιπόν, το ερώτημα αν τα βλαστικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν τα κύτταρα-στόχους της σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α στην αναπτυξιακή της δράση, έχουν τη δυνατότητα να ενδοκυτταρώνουν με μακροπινוקυττάρωση ή αυτή η ιδιότητα είναι προϊόν διαφοροποίησης.

Για το σκοπό αυτό ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (hESCs, κλώνος H1) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ibidi, πριν την προσθήκη σημασμένης Ακτιβίνης Α (ActivinA-Alexa488) ή της σημασμένης δεξτράνης (Dextran-TexasRed) για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.12A, στην οποία απεικονίζεται μία αποικία βλαστικών κυττάρων, δεν εντοπίζονται κυστίδια με Dextran-TexasRed, ενώ και η Ακτιβίνη Α ενδοκυτταρώνεται σε μικρό βαθμό, μόνο στα όρια της αποικίας. Το επόμενο βήμα ήταν να χρησιμοποιήσουμε τους χημικούς αναστολείς EIPA και Dynasore που αναστέλλουν τη μακροπινוקυττάρωση και την κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση αντίστοιχα, και να εξετάσουμε εάν επηρεάζεται η επαγόμενη από την Ακτιβίνη Α σηματοδότηση. Βλαστικά κύτταρα H1 (Εικ. 3.12B), μεσεγχυματικά κύτταρα MSCs (Εικ. 3.12C) και διαφοροποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα ECs (Εικ. 3.12D) καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη των αναστολέων EIPA ή Dynasore και επαγωγή με Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών φώσφο-SMAD2, φώσφο-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Παρατηρούμε ότι στα κύτταρα που είναι πολυδύναμα (H1) ή ολιγοδύναμα (MSCs) ο αναστολέας EIPA δεν επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τη φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών. Αντίθετα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) η φωσφορυλίωση μειώνεται σημαντικά, κάτι που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα στα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC. Η αναστολή της κλαθρινο-εξαρτώμενης οδού

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

από τη χημική ένωση Dynasore προκαλεί στατιστικώς σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών τόσο στα βλαστικά και μεσεγχυματικά κύτταρα, όσο και στα διαφοροποιημένα.



Εικόνα 3.12: Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α σε ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (H1), μεσεγχυματικά βλαστικά MSCs και ενδοθηλιακά ECs με προέλευση τα βλαστικά H1. Α. Βλαστικά κύτταρα H1 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Ibidi, πριν τη προσθήκη σημασμένης Ακτιβίνης Α ή της σημασμένης δεξτράνης (Dextran-TexasRed) για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. **Β.** Βλαστικά κύτταρα H1 καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 8 ώρες. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη των αναστολέων EIPA ή Dynasore (100μM) και επαγωγή με Ακτιβίνη Α (ActA 5 ή 50ng/ml) για 30 λεπτά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. **Γ, Δ, Ε.** Βλαστικά κύτταρα H1 διαφοροποιήθηκαν σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα MSCs (C) ή σε ενδοθηλιακά κύτταρα ECs (D). Συγκριτικά στο (E) ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 70% και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 2 ώρες. Προστέθηκαν οι αναστολείς EIPA ή Dynasore (100μM) και ακολούθησε επαγωγή με Ακτιβίνη Α για 30 λεπτά. Έγινε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Στα γραφήματα από κάτω παρουσιάζεται η

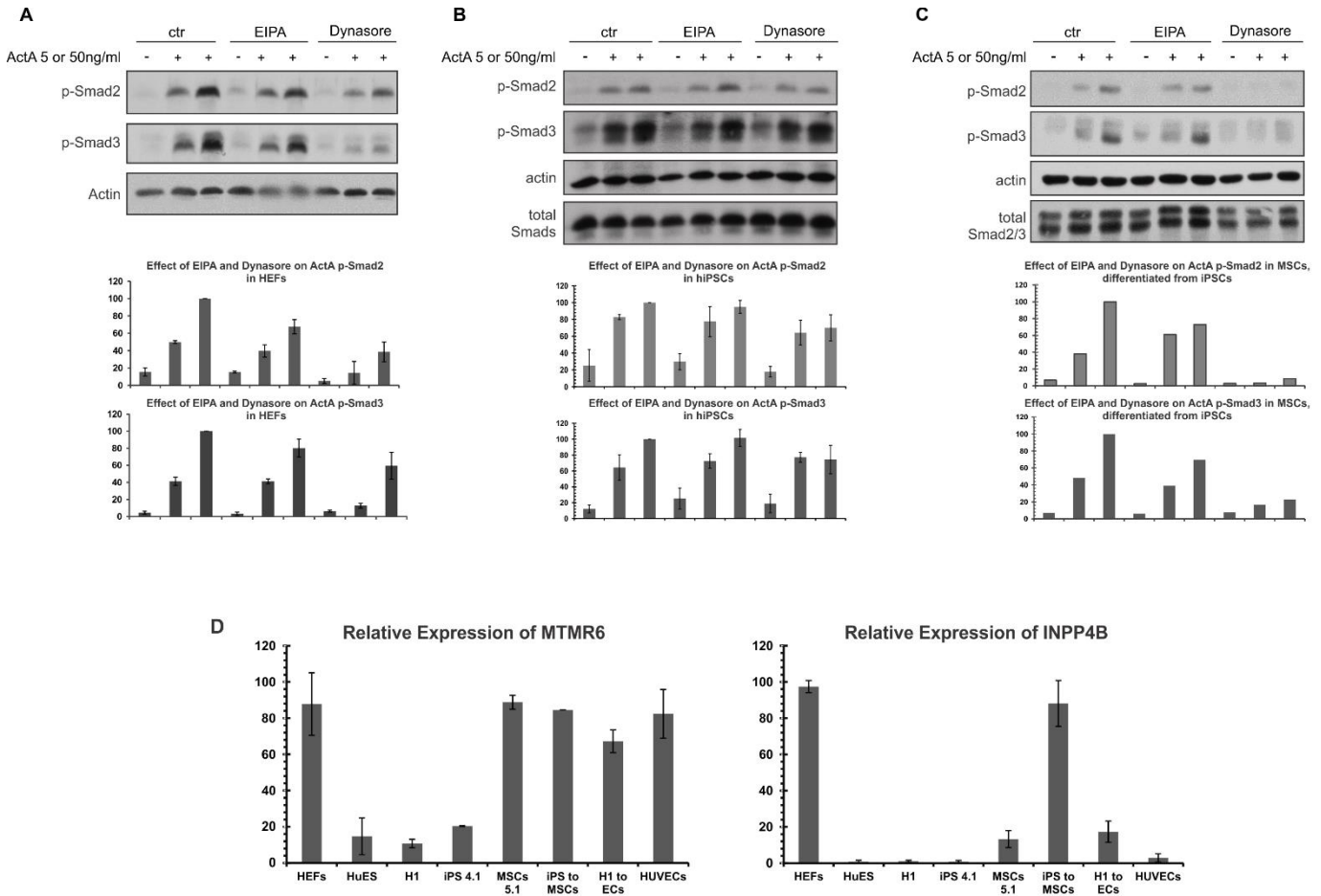
ποσοτικοποίηση για τις p-SMAD2 (b) και p-SMAD3 (c). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

Συμπερασματικά, τα πειράματα της εικόνας 3.12 αποτελούν μία πρώτη ένδειξη ότι η μακροπινοκυττάρωση είναι μια διαδικασία που είτε δεν πραγματοποιείται στα βλαστικά κύτταρα είτε δεν συμμετέχει στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α. Ενδεχομένως, η μακροπινοκυττάρωση να χρησιμοποιείται για τη χωροχρονική ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων μόνο στα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, που επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες. Έτσι λοιπόν, προσπαθήσαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τα ανθρώπινα επαναπρογραμματισμένα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (hiPSCs). Τα κύτταρα δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο μας, με αρχική προέλευση ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (HEFs). Επομένως, οι ινοβλάστες (HEFs), και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) είναι διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα ανθρώπινα επαναπρογραμματισμένα βλαστικά κύτταρα (hiPSCs) είναι πολυδύναμα και αντίστοιχα με τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα H1 (hESCs). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα προέρχονται από το μεσόδερμα και είναι ολιγοδύναμα βλαστικά κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και μυοκύτταρα. Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω κυτταρικές σειρές επαναλάβουμε τα πειράματα με τους χημικούς αναστολείς EIPA και Dynasore (Εικ. 3.13).

Έτσι λοιπόν, ινοβλάστες (HEFs), επαναπρογραμματισμένα βλαστικά (hiPSCs) και μεσεγχυματικά (MSCs) με προέλευση τα hiPSCs, καλλιεργήθηκαν μέχρι πληρότητας 70% και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού. Ακολούθως, έγινε προσθήκη των αναστολέων EIPA ή Dynasore και επαγωγή με Ακτιβίνη Α. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών φώσφο-SMAD2, φώσφο-SMAD3, ολικών-SMAD2/3 και ακτίνης. Παρατηρούμε ότι στα πολυδύναμα κύτταρα hiPSCs και στα ολιγοδύναμα MSCs η αναστολή της μακροπινοκυττάρωσης με τη χημική ένωση EIPA, δεν επηρεάζει σημαντικά την φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών. Αντίθετα, η χρήση του αναστολέα EIPA στα διαφοροποιημένα κύτταρα HEFs προκαλεί σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης. Η αναστολή των μονοπατιών που εξαρτώνται από την κλαθρίνη και την καβεολίνη με το χημικό αναστολέα Dynasore οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των SMADs. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με εκείνα της εικόνας 3.12, και ενισχύουν

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

τη διαπίστωση ότι η ρύθμιση της επαγόμενης από Ακτιβίνη Α σηματοδότησης πραγματοποιείται με διαφορετικό τρόπο στα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, σε σχέση με τα πολυδύναμα ή ολιγοδύναμα κύτταρα.



Εικόνα 3.13: Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης στην επαγόμενη από Ακτιβίνη σηματοδότηση σε κύτταρα HEFs, hiPSCs, και MSCs που προέρχονται από τα hiPSCs. HEFs (A), hiPSCs (B) και MSCs με προέλευση τα hiPSCs (C) καλλιεργήθηκαν μέχρι πληρότητας 70% και υπέστησαν στέρηση ορού. Έγινε προσθήκη των αναστολέων EIPA και Dynasore (100μM) για 20 λεπτά και επαγωγή με Ακτιβίνη Α (ActA 5 or 50ng/ml) για 30 λεπτά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των ενδογενών p-SMAD2, p-SMAD3, ολικών SMAD2/3 και ακτίνης. Στα γραφήματα από κάτω παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση για τις p-SMAD2 και p-SMAD3. E. Ολικό RNA απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές HEFs, HuES, H1, iPSCs, MSCs, MSCs διαφοροποιημένα από iPSCs, ECs διαφοροποιημένα από H1 και HUVECs και ποσοτικοποιήθηκε. Η έκφραση των γονιδίων *mtmr6* και *inpp4b* ελέγχθηκε με qRT-PCR. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις κυτταρικές σειρές HEFs, HuES, iPSCs, MSCs και MSCs διαφοροποιημένα από iPSCs, με ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες (microarray analysis), εντοπίσαμε 2 γονίδια με αρκετά διαφορετική έκφραση μεταξύ διαφοροποιημένων και βλαστικών σειρών. Τα γονίδια αυτά είναι τα *mtmr6* και *inpp4b*, τα οποία κωδικοποιούν τις ομώνυμες πρωτεΐνες, οι οποίες, όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή (ενότητα 1.4.2), θεωρούνται απαραίτητες για την ολοκλήρωση της μακροπinoκυττάρωσης. Οι MTMR6 και INPP4B είναι φωσφατάσες που συμμετέχουν στην ίδια σειρά αντιδράσεων αποφωσφορυλίωσης του PIP_3 σε PI, που είναι αναγκαία για το 'κλείσιμο' των πτυχώσεων της μεμβράνης και τη δημιουργία των μακροπinoσωμάτων. Προσθέτοντας όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την έκφραση των MTMR6 και INPP4 με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR). Με βάση τα αποτελέσματα της εικόνας 3.13D τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MTMR6 είναι χαμηλά στις βλαστικές σειρές H1, HuEs, και iPSCs, και αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση στα μεσεγχυματικά βλαστικά (MSCs) επίπεδα των διαφοροποιημένων κυττάρων HEFs, ECs και HUVEC. Αντίστοιχα αποτελέσματα με μεγαλύτερες αυξομειώσεις παρατηρούνται και για το γονίδιο INPP4, με βασική διαφορά ό,τι στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC η έκφραση είναι πολύ χαμηλή. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία πρώτη ένδειξη για την εύρεση μορίων, που είναι βασικοί ρυθμιστές της ενδοκυττάρωσης στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης. Περαιτέρω μελέτες θα αναδείξουν εάν οι δύο αυτές πρωτεΐνες, που δεν εκφράζονται στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, ευθύνονται είτε για την απουσία της μακροπinoκυττάρωσης, ως συνολική διαδικασία, είτε για τη μη εμπλοκή της μακροπinoκυττάρωσης στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα εν γένει.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Ακτιβίνη A, κατά το πρότυπο του TGF- β , μετάγει τα σήματα της μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Προσδένεται στους υποδοχείς τύπου II (ActRIIA και ActRIIB), οι οποίοι αυτοφωσφορυλιώνονται, στρατολογούν και φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς τύπου I (ALK4). Το σήμα μεταδίδεται περαιτέρω μέσω των πρωτεϊνών SMAD, που μετατοπίζονται στο πυρήνα και ελέγχουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Για τη κατανόηση της μεταγωγής σήματος από την Ακτιβίνη A, βασικός μας στόχος ήταν η διαλεύκανση των οδών ενδοκυττάρωσης της ακτιβίνης A και των υποδοχέων της που απαρτίζουν τον πυρήνα του πρωτεϊνικού συμπλέγματος σηματοδότησης και η διερεύνηση των επιπτώσεων συγκεκριμένων παρεμβάσεων στις οδούς ενδοκυττάρωσης σε σχέση με τη βιολογική της δράση. Έτσι, πρωταρχικό μας μέλημα ήταν να απαντήσουμε ποια μονοπάτια ενδοκυττάρωσης χρησιμοποιεί το σύμπλοκο Ακτιβίνη A-υποδοχείς και σε ποια ενδοκυτταρικά διαμερίσματα εντοπίζονται.

4.1 Ενδοκυττάρωση απουσία προσδέματος

Αρχικά, μελετήσαμε τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των υποδοχέων ALK4 και ActRIIB, απουσία Ακτιβίνης A, για να διαπιστώσουμε εάν οι υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται και διακινούνται σε διάφορα κυστιδιακά διαμερίσματα. Ελλείψει αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν τους ενδογενείς υποδοχείς, έγινε υπερέκφρασή τους με πλασμιδιακές κατασκευές. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες-δείκτες που είτε υπερεκφράστηκαν είτε αναγνωρίστηκαν με αντίσωμα έναντι της αντίστοιχης ενδογενούς πρωτεΐνης. Πειράματα ανοσοφθορισμού και εκτεταμένη στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων έδειξαν ότι οι υποδοχείς ALK4 και ActRIIB μεταφέρονται κυρίως στο πρώιμο ενδόσωμα, καθώς συνεντοπίζονται με τις πρωτεΐνες EEA1, Rab5a, Rabenosyn-5 και SARA. Αξιοσημείωτα είναι τα ποσοστά συνεντοπισμού με την πρωτεΐνη Rabankyrin-5, που όπως είδαμε εντοπίζεται κυρίως στα μακροπινোসώματα αλλά και τα πρώιμα ενδοσώματα. Αυτό το εύρημα έδωσε το έναυσμα για να μελετήσουμε αργότερα τη μακροπινοκυττάρωση, ως οδό ενδοκυττάρωσης που ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος από την ακτιβίνη. Και οι δύο υποδοχείς φαίνεται πως χρησιμοποιούν τόσο το γρήγορο όσο και το αργό μονοπάτι ανακύκλησης στη μεμβράνη, όπως προκύπτει από τα σημαντικά ποσοστά συνεντοπισμού με τις πρωτεΐνες Rab4 και Rab11. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί και μια βασική διαφορά ανάμεσα στους δύο υποδοχείς. Ο ActRIIB συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη-δείκτη των όψιμων ενδοσωμάτων Rab7, κάτι που δεν ισχύει για τον ALK4. Το γεγονός αυτό ίσως σημαίνει ότι αφενός ο

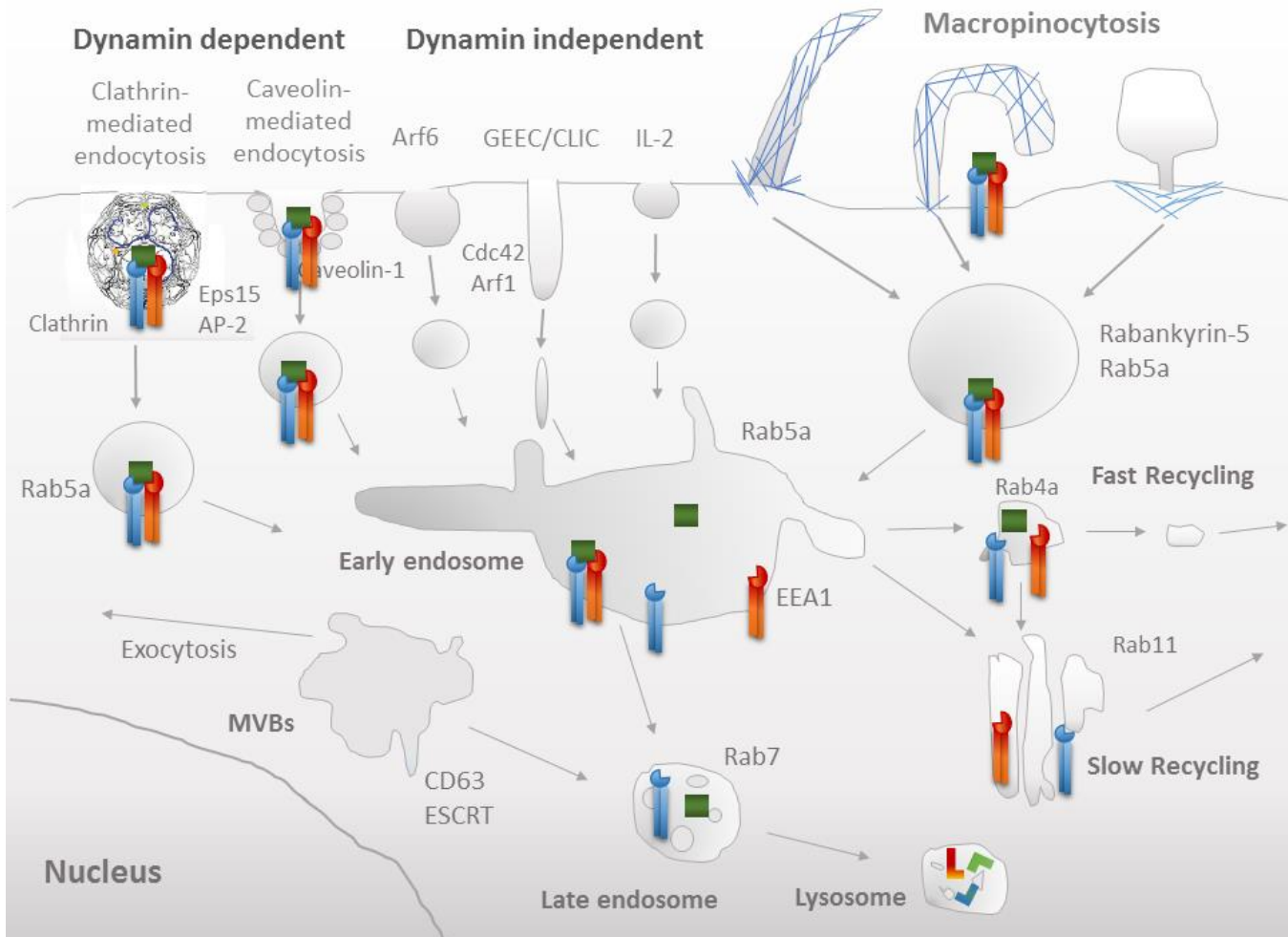
ActRIIB αποικοδομείται σε μεγαλύτερο βαθμό, αφετέρου ο ALK4 ανακυκλώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό και χρησιμοποιείται εκ νέου στη πλασματική μεμβράνη.

4.2 Ενδοκυττάρωση παρουσία προσδέματος

Το επόμενο βήμα ήταν να επαναλάβουμε τα πειράματα συνεντοπισμού, με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία, παρουσία του προσδέματος. Αυτό μάλιστα έγινε σε αυξανόμενα χρονικά διαστήματα επαγωγής (0, 2, 5, 10, 30 και 60 λεπτά), προκειμένου να μελετήσουμε όχι μόνο την ενδοκυτταρική εντόπιση, αλλά και την κινητική των υποδοχέων, παρουσία του προσδέτη τους. Έτσι λοιπόν αναλύσαμε πολύ περισσότερα δεδομένα τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στην ενότητα 3.1.2. Καταρχήν, παρατηρούμε ότι υπάρχει συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα στα ποσοστά συνεντοπισμού, απουσία προσδέτη· επομένως έχουμε μια επαναληψιμότητα σε επίπεδο στατιστικής ανάλυσης. Το σπουδαιότερο είναι ότι υπάρχει κινητική, δηλαδή η Ακτιβίνη προσδένεται στους υποδοχείς και καθορίζει την κυστιδιακή μεταφορά του συμπλόκου, η οποία μεταβάλλεται με τον χρόνο. Έτσι προκύπτουν συμπεράσματα για τη διακίνηση των υποδοχέων τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο. Για παράδειγμα, 20 λεπτά μετά την επαγωγή αυξάνεται ο συνεντοπισμός με τους δείκτες των πρώιμων ενδοσωμάτων EEA1 και Rab5. Επίσης, έχει ξεκινήσει η γρήγορη ανακύκληση των υποδοχέων στη μεμβράνη (Rab4), ενώ μεταξύ 30-60 λεπτών επαγωγής, αυξημένα ποσοστά παρατηρούνται με την πρωτεΐνη Rab11, η οποία εντοπίζεται στο γρήγορο μονοπάτι ανακύκλησης. Εντυπωσιακά είναι τα ποσοστά συνεντοπισμού με τη Rabankyrin-5, που ξεπερνούν ακόμη και το 60% και διατηρούνται υψηλά καθ' όλη τη διάρκεια της επαγωγής· μία ακόμη ένδειξη ότι Ακτιβίνη και υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται μέσω μακροπινοκυττάρωσης.

Τα προηγούμενα πειράματα κινητικής πραγματοποιήθηκαν κατόπιν υπερέκφρασης, γεγονός που δεν μας ικανοποιούσε πλήρως. Έτσι θελήσαμε να μελετήσουμε την κινητική της Ακτιβίνης Α, με τις λιγότερες δυνατές παρεμβάσεις. Χρησιμοποιήσαμε τη σημασμένη Ακτιβίνη Α με τη φθορίζουσα χρωστική AlexaFluor488. Αρχικά, επιβεβαιώσαμε τη μεταγραφική της ενεργότητα και έπειτα, με πειράματα ελέγχου, ότι η ενδοκυττάρωσή της γίνεται μέσω των υποδοχέων της και όχι κάποιου άλλου γενικευμένου μηχανισμού εσωτερικοποίησης ουσιών. Στη συνέχεια, η σημασμένη Ακτιβίνη προστέθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα και έγινε ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες-δείκτες και συνεστιακή μικροσκοπία. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η Ακτιβίνη ενδοκυτταρώνεται στα πρώιμα ενδοσώματα (EEA1, Rab5), κυρίως μέσω

μακροπινοκυττάρωσης (Rabankyrin-5). Χρησιμοποιεί το γρήγορο μονοπάτι ανακύκλησης στην πλασματική μεμβράνη (Rab4) και όχι το αργό (Rab11), ενώ μεταφέρεται στο λυσόσωμα-πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση (Rab7). Ένα πιθανό μοντέλο της ενδοκυττάρωσης του συμπλέγματος των πρωτεϊνών προσδέματος-υποδοχών απεικονίζεται στην εικόνα 4.1



Εικόνα 4.1. Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυττάρωσης και ενδοκυτταρικής διακίνησης της Ακτιβίνης και των υποδοχών της. Διακρίνονται οι πιθανές οδοί εσωτερικοποίησης και τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα εντοπισμού τους. Με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η Ακτιβίνη, μπλε ο ActRIIB και κόκκινο ο ALK4.

Εκτός από τους υποδοχείς του TGF- β που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, για τους υπόλοιπους υποδοχείς των μελών της οικογένειας και κυρίως για τους υποδοχείς των BMPs, τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι η Ακτιβίνη A είναι το πρόσδεμα του μεταλλαγμένου υποδοχέα τύπου I των BMPs, ALK2³²³, γεγονός που θεωρείται ως η αιτία της νόσου Προοδευτική

Οστεοποιητική Ινωδυσπλασία (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, FOP). Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι υποδοχείς τύπου I, BMPRI, ενδοκυττάρωνονται αποκλειστικά διαμέσου κλαθρινο-εξαρτώμενου μηχανισμού, σε αντιδιαστολή με τους υποδοχείς τύπου II, που χρησιμοποιούν και άλλες οδούς ενδοκυττάρωσης³²⁴. Πράγματι, δείχθηκε πολύ πρόσφατα στο σκώληκα *C. elegans*, ότι ο υποδοχέας τύπου I SMA-6 (ALK6) απαιτεί ενδοκυττάρωση διαμέσου κλαθρίνης για την εσωτερικοποίηση και την μεταγωγή του σήματός του. Στην ίδια μελέτη, ο υποδοχέας τύπου II των BMPs, DAF-4, εσωτερικοποιείται διαμέσου ενός μηχανισμού, ανεξάρτητου της κλαθρίνης και υφίσταται ανακύκληση, ρυθμιζόμενη από την ARF6³²⁵. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι τα ομόλογα των SMA6 και BMP υποδοχέων τύπου I, BMPRIA (ALK3) και ACVRIB (ALK4), έχουν βρεθεί να μειορρυθμίζονται σε SNX27- και VPS35-απεμπλουτισμένα κύτταρα, υποδεικνύοντας ρύθμιση εξαρτώμενη από το παλινδρομερές (Retromer)³²⁶.

4.3 Παρέμβαση στην κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων της κινητικής ακτιβίνης και υποδοχέων, προσπαθήσαμε να εστιάσουμε στα βασικότερα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα αυτά με βιβλιογραφικά δεδομένα. Όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, η πιο καλά μελετημένη οδός ενδοκυττάρωσης, που σχετίζεται με τη σηματοδότηση των RTKs (Receptor Tyrosine Kinases), είναι αυτή που εξαρτάται από την κλαθρίνη. Είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς της τρανσφερίνης (TfR), της LDL (LDLR) και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) επάγουν το μονοπάτι της κλαθρίνης (receptor mediated endocytosis). Αρχικά, μελετήσαμε εάν η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση επηρεάζει τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α. Για το λόγο αυτό, έγινε αποσιώπηση της κλαθρίνης στα κύτταρα HUVEC και έλεγχος της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SMAD2/3, οι οποίες αποτελούν τα κεντρικά μόρια μεταγωγής του σήματος καθοδικά των υποδοχέων. Παρατηρήσαμε ότι απουσία κλαθρίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και παρουσία Ακτιβίνης Α, η φωσφορυλίωση των SMAD2/3 περιορίζεται σημαντικά, σε ποσοστό περίπου 40%. Αντίθετα, η αποσιώπηση της κλαθρίνης δεν επηρέασε αισθητά την ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α. Καθώς το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο, μελετήσαμε εάν η αποσιώπηση της κλαθρίνης επηρεάζει την εντόπιση και τη διακίνηση των πρωτεϊνών. Πράγματι, όπως βλέπουμε στην εικόνα 3.6.C, η επαγωγή με ακτιβίνη στα κύτταρα-μάρτυρες έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των SMAD2/3 στον πυρήνα του κυττάρου, ανάλογα και με τη συγκέντρωση της Ακτιβίνης. Η αποσιώπηση της κλαθρίνης οδηγεί σε περιορισμένη μετατόπιση των SMAD2/3 στον

πυρήνα. Αυτό πιθανώς σημαίνει ότι απουσία κλαθρίνης είτε οι υποδοχείς της ακτιβίνης είτε οι SMAD2/3 'παγιδεύονται' στη μεμβράνη του κυττάρου, δεν ενδοκυτταρώνονται και η σηματοδότηση δεν προωθείται με τον ίδιο τρόπο, συμπέρασμα που προκύπτει και από τη μειωμένη φωσφορυλίωση των SMADs.

4.4 Παρέμβαση στην ενδοκυττάρωση μέσω καβεοσωμάτων

Αναφέρθηκε στην εισαγωγή ότι η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση, όπως επίσης και το μονοπάτι της καβεολίνης, απαιτούν για την εσωτερικοποίηση του φορτίου τη δράση της πρωτεΐνης δυναμίνης. Η δυναμίνη είναι μια GTPάση υπεύθυνη για την απόσχιση των κυστιδίων κλαθρίνης και καβεολίνης από τη μεμβράνη και την ολοκλήρωση της ενδοκυττάρωσης. Η δυναμίνη εντοπίζεται, εκτός από τη μεμβράνη, στη συσκευή Golgi και συμμετέχει σε πολλές διεργασίες, όπως η διαίρεση οργανιδίων και η κυτταροκίνηση. Η αποσιώπηση της δυναμίνης με RNAi, δεν ήταν ένα εργαλείο που μπορούσαμε να αξιοποιήσουμε. Αφενός γιατί η δυναμίνη δεν επιτελεί μία λειτουργία στο κύτταρο και αφετέρου, διαπιστώθηκε ότι η αποσιώπηση της δυναμίνης μειώνει τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα ALK4. Για το λόγο αυτό ακολουθήσαμε δύο προσεγγίσεις. Χρησιμοποιήσαμε το χημικό αναστολέα Dynasore, που παρεμποδίζει τη δράση της δυναμίνης και ταυτόχρονα ελέγξαμε τα 2 μονοπάτια, κλαθρίνης και καβεολίνης ξεχωριστά. Η χρήση του αναστολέα Dynasore μειώνει σημαντικά τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο και αφορούν την κλαθρίνη. Επίσης, η αποσιώπηση της καβεολίνης έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD2/3 αλλά και μια μικρή μείωση της ενδοκυττάρωσης της σημασμένης Ακτιβίνης Α. Επίσης, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αποδείξαμε ότι η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ALK4, όπως έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία για τον αντίστοιχο TGF-β υποδοχέα τύπου I, τον TβRI³¹⁷.

Παρατηρώντας ότι η αποσιώπηση κλαθρίνης και καβεολίνης μειώνει, αλλά δεν εξαλείφει, τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α, σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά συνεντοπισμού ακτιβίνης-υποδοχέων με την πρωτεΐνη Rabankyrin-5, στραφήκαμε στη μακροπινοκυττάρωση. Να επισημάνουμε ότι κατά τη διάρκεια της εργασίας, αλλά και σήμερα, λίγα δεδομένα συνδέουν τη μακροπινοκυττάρωση με τους υποδοχείς RTKs, ειδικά ως προς τη σηματοδότησή τους. Γνωρίζουμε ότι η μακροπινοκυττάρωση επάγεται από προσδέτες (growth factor induced), όπως οι EGF και PDGF^{273, 319}, όμως δεν είναι σαφές εάν οι προσδέτες αυτοί χρησιμοποιούν τη μακροπινοκυττάρωση, για την ενίσχυση της δικής τους

σηματοδότησης. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς τους φαίνεται να ενδοκυτταρώνονται μέσω κλαθρίνης ή και καβεολίνης. Δεν υπάρχουν στοιχεία για τα μέλη της οικογένειας του TGF- β και των υποδοχέων τους.

4.5 Παρέμβαση στη μακροπινוקυττάρωση

Προκειμένου να αποδείξουμε τη σύνδεση της Ακτιβίνης Α με τη μακροπινוקυττάρωση ακολουθήσαμε ποικίλες πειραματικές προσεγγίσεις. Αρχικά, δείξαμε ότι η σημασμένη Ακτιβίνη Α συνεντοπίζεται με τη Dextran-TexasRed στα μακροπινোসώματα. Με σκοπό να αποδείξουμε με αδιαμφισβήτητο τρόπο, ότι η Ακτιβίνη Α εντοπίζεται στα μακροπινোসώματα, μετρήσαμε τη διάμετρο των κυστιδίων που είναι θετικά για την Ακτιβίνη και τη συγκρίναμε με εκείνη των κυστιδίων που είναι θετικά για την τρανσφερίνη, με τη βοήθεια του λογισμικού MotionTracking. Είναι γνωστό ότι η τρανσφερίνη ενδοκυτταρώνεται μέσω της κλαθρινο-εξαρτώμενης οδού. Τα επικαλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια έχουν διάμετρο 0,1-0,2 μm , ενώ τα μακροπινোসώματα είναι σαφώς μεγαλύτερα και μπορούν να φτάσουν σε διάμετρο τα 5 μm . Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.8 (γράφημα Bc), η πλειονότητα των θετικών, για την Ακτιβίνη, κυστιδίων έχει διάμετρο μεγαλύτερη των 0,25 μm , ενώ η διάμετρος αυτή φτάνει μέχρι τα 1,5 μm . Αντίθετα, η πλειοψηφία των θετικών, για τη τρανσφερίνη, κυστιδίων έχουν διάμετρο περίπου 0,18 μm .

Για την περαιτέρω μελέτη της ενδοκυττάρωσης της Ακτιβίνης μέσω μακροπινוקυττάρωσης, προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε το ρόλο της πρωτεΐνης Rabankyrin-5, λαμβάνοντας υπόψιν τα υψηλά ποσοστά συνεντοπισμού που προέκυψαν στα πειράματα της κινητικής ακτιβίνης Α-υποδοχέων, ALK4 και ActRIIB. Συμπληρωματικά, πραγματοποιήθηκε τριπλός ανοσοφθορισμός και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι Ακτιβίνη Α, ALK4 και Rabankyrin-5 συνεντοπίζονται σε μεγάλα κυστίδια. Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης Rabankyrin-5 είχε ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση στην ενδοκυττάρωση της σημασμένης ακτιβίνης, όπως και της Dextran-TexasRed. Επιπλέον, απουσία Rabankyrin-5, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SMAD2/3. Εν αντιθέσει, όταν η Rabankyrin-5 υπερεκφράστηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η επαγόμενη από την ακτιβίνη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 αυξήθηκε. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν όχι μόνο ότι η Ακτιβίνη και οι υποδοχείς της ενδοκυτταρώνονται μέσω της μακροπινוקυττάρωσης, αλλά και ότι το μονοπάτι αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή της σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α.

4.6 Η Ακτιβίνη Α επάγει τη μακροπινοκυττάρωση

Επιπρόσθετα, ένα κριτήριο, που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία, ότι ένας αυξητικός παράγοντας συνδέεται με τη μακροπινοκυττάρωση, είναι αν έχει τη δυνατότητα να την επάγει, όπως παραδείγματος χάριν ο EGF²⁷³ και ο PDGF³¹⁹. Με πειράματα μικροσκοπίας που πραγματοποιήθηκαν, φαίνεται ότι η επαγωγή με Ακτιβίνη Α, αυξάνει στατιστικώς σημαντικά την ενδοκυττάρωση της δεξτράνης (Dextran-TexasRed), σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες και αντίστοιχα με την επαγωγή με PMA (θετικός μάρτυρας). Πολύ σημαντικά είναι τα δεδομένα που προκύπτουν από πειράματα μικροσκοπίας ζώντων ενδοθηλιακών κυττάρων, στα οποία σημάνθηκαν τα ινίδια της ακτίνης με το αντιδραστήριο SIR-Actin. Στις εικόνες πραγματικού χρόνου που ελήφθησαν, γίνεται σαφές ότι η Ακτιβίνη Α μεταβάλλει την κινητικότητα των κυττάρων, τη δυναμική της μεμβράνης και επάγει τη δημιουργία των πτυχώσεων (ruffling), που σχηματίζονται κατά τη μακροπινοκυττάρωση. Επίσης, παρουσία προσδέματος, παρατηρείται ξεκάθαρα η αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης.

Τα δεδομένα τα οποία αφορούν τη μακροπινοκυττάρωση δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και αποτέλεσαν ευχάριστη για εμάς έκπληξη, που όμως αντιμετωπίσαμε με επιφυλάξεις. Προκειμένου να βεβαιωθούμε, αλλά και να πείσουμε, για τα αποτελέσματά μας, προσπαθήσαμε να χρησιμοποιήσουμε όλα τα εργαλεία στα πλαίσια των δυνατοτήτων μας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε χημικούς αναστολείς της μακροπινοκυττάρωσης, όπως ο πλέον διαδεδομένος EIPA, που παρεμποδίζει τη δράση της αντλίας Na⁺/H⁺, ο αναστολέας cytochalazin D, που αποδιοργανώνει τα ινίδια της ακτίνης και ο LY294002, που αναστέλλει τις PI3 κινάσες. Και οι τρεις αναστολείς έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα, σε απολυτή συμφωνία με εκείνα της Rabankyrin-5. Προκαλούν μείωση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SMAD2/3 και περιορίζουν δραστικά την ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης Α.

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν τη μακροπινοκυττάρωση, χρησιμοποιούν καρκινικές σειρές όπως τα κύτταρα A431 (επιδερμικός καρκίνος), η οποία χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση του υποδοχέα του EGF, EGFR³²⁷⁻³²⁹. Γενικότερα, πολλές καρκινικές σειρές εμφανίζουν ενίσχυση στη σηματοδότηση των RTKs, λόγω σημειακών μεταλλάξεων και υπερέκφρασης αυξητικών παραγόντων (330). Επίσης, μέλη της υποοικογένειας των Ras GTPασών είναι μεταλλαγμένα στο 20% των νεοπλασιών. Έχει δειχθεί ότι οι ογκογόνες πρωτεΐνες H-Ras και K-Ras επάγουν τη μακροπινοκυττάρωση^{252, 263, 272}. Για το λόγο αυτό, οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν

HRasG12V μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές. Μια πολύ ενδιαφέρουσα ερευνα του 2013 δείχνει ότι διάφορα H-Ras μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα ενδοκυτταρώνουν εξωκυττάρια πρωτεΐνες μέσω μακροπινοκυττάρωσης, με σκοπό την αποδόμησή τους και την αξιοποίηση των αμινοξέων για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Έτσι, η μακροπινοκυττάρωση υποστηρίζει τις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες των καρκινικών κυττάρων ³³¹. Η μελέτη της Helberg και των συνεργατών της δείχνει ότι οι HRasG12V μετασχηματισμένοι ινοβλάστες αυξάνουν την ενδοκυττάρωση του PDGFRβ μέσω μακροπινοκυττάρωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη σηματοδότηση του PDGF και κατ' επέκταση τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ³²⁰. Αυτή η δημοσίευση του 2012 είναι ουσιαστικά η μοναδική που συνδέει άμεσα την μακροπινοκυττάρωση με τη σηματοδότηση των RTKs.

Με βάση αυτά τα δεδομένα, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας στη καρκινική σειρά A431. Για το λόγο αυτό επαναλάβουμε κάποια κεντρικά πειράματα, όπως την αποσιώπηση της κλαθρίνης, της καβεολίνης και της Rabankyrin-5, αλλά και τη χρήση των χημικών αναστολέων για να εξετάσουμε την επίδραση τους στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α. Τα αποτελέσματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με αυτά των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC.

4.7 Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα δεν ενδοκυτταρώνουν με μακροπινοκυττάρωση, η οποία φαίνεται να είναι προϊόν διαφοροποίησης

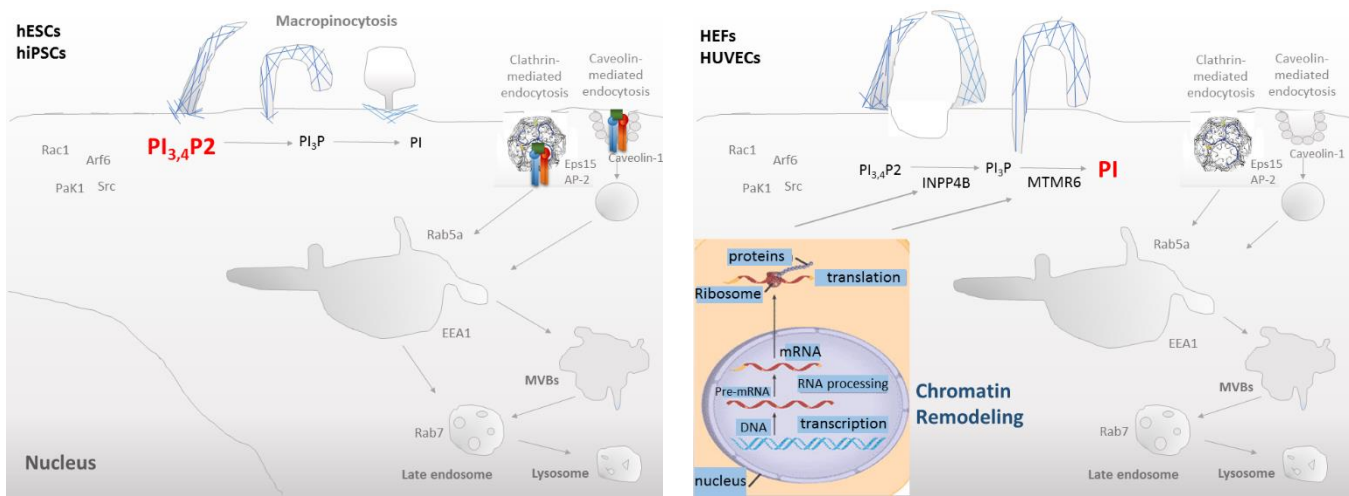
Η Ακτιβίνη Α είναι ένα σημαντικό μορφογόνο κατά την εμβρυογένεση. Σε συνεργασία με άλλους κεντρικούς ρυθμιστές, όπως ο TGF-β, οι BMPs, Wnt/β-κατενίνη, Notch κ.ά καθορίζει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, για τη δημιουργία των ιστών και των οργάνων του εμβρύου. Σε καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων *in vitro*, έχει δειχθεί ότι η Ακτιβίνη Α μπορεί είτε να διατηρεί την πολυδυναμία των κυττάρων είτε να επάγει τη διαφοροποίηση προς ενδόδερμα ή μεσόδερμα, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και την παρουσία άλλων παραγόντων. Για παράδειγμα, η ταυτόχρονη επαγωγή με Ακτιβίνη Α, FGF-2 και BMP-4 διαφοροποιεί ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα (hESCs) προς ενδόδερμα και τις κυτταρικές σειρές του παγκρέατος. Για τους παραπάνω λόγους ελέγξαμε τις οδούς ενδοκυττάρωσης της Ακτιβίνης σε ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (hESCs, human embryonic stem cells) και ανθρώπινα επαναπρογραμματισμένα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (hiPSCs, human induced pluripotent stem cells) που προέρχονται από ανθρώπινους ινοβλάστες (HEFs, human embryonic fibroblasts). Από τις δύο βλαστικές σειρές, hESCs και hiPSCs, έγινε διαφοροποίηση προς μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs). Τέλος, οι δύο βλαστικές σειρές, hESCs και hiPSCs, διαφοροποιήθηκαν προς

ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), προκειμένου να συγκριθούν με τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC. Παρότι η έρευνα δεν έχει ολοκληρωθεί, τα αρχικά ευρήματα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και κρίνονται άκρως υποσχόμενα.

Αρχικά, παρατηρήσαμε ότι στα εμβρυικά βλαστικά (hESCs) η σημασμένη Ακτιβίνη Α (ActivinA-alexa488) και η Dextran-TexasRed δεν ενδοκυτταρώνονται. Επίσης, ο χημικός αναστολέας EIPA, ο οποίος αναστέλλει τη μακροπινοκυττάρωση, δεν επηρεάζει τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α, τόσο στα hESCs όσο και στα hiPSCs, σε αντίθεση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα HUVEC, HEFs και ECs με προέλευση τα βλαστικά. Στα μεσεγχυματικά βλαστικά (MSCs), ο αναστολέας EIPA έχει μια μικρή επίδραση στην επαγόμενη από την Ακτιβίνη φωσφορυλίωση των SMAD2/3. Επομένως, η επίδραση του αναστολέα EIPA αυξάνεται όσο προχωράμε από τη μη διαφοροποιημένη στην τελικώς διαφοροποιημένη κατάσταση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως στα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα είτε η Ακτιβίνη Α δεν χρησιμοποιεί τη μακροπινοκυττάρωση για την ενίσχυση της σηματοδότησης είτε η μακροπινοκυττάρωση δεν υφίσταται ως διαδικασία.

Αντίθετα, ο χημικός αναστολέας Dynasore που αναστέλλει τα μονοπάτια της κλαθρίνης και της καβεολίνης, έχει επίδραση στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α, σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, διαφοροποιημένους και μη. Η επίδραση αυτή είναι μικρή στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, αλλά πολύ ισχυρή στα μεσεγχυματικά βλαστικά και τα διαφοροποιημένα κύτταρα, ενδεχομένως αναδεικνύοντας τον κλασικό ρόλο της κλαθρίνης στη σηματοδότηση των RTKs. Τέλος, η δημιουργία των ανθρώπινων επαναπογραμματοποιημένων βλαστικών κυττάρων (hiPSCs) *in vitro*, με προέλευση ανθρώπινους ινοβλάστες, δημιούργησε την ανάγκη ελέγχου των κυττάρων αυτών, ως προς τις ιδιότητές τους και την ομοιότητά τους με τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (hESCs), που προέρχονται από εμβρυϊκή βλαστοκύστη. Στα πλαίσια αυτού του ελέγχου πραγματοποιήθηκε ανάλυση μικροσυστοιχιών, εξετάζοντας την έκφραση γονιδίων στα κύτταρα HEFs, hESCs, hiPSCs και MSCs. Αναλύοντας τα αποτελέσματα, με κύριο ενδιαφέρον γονίδια που εμπλέκονται στη μακροπινοκυττάρωση, εντοπίσαμε 2 γονίδια με διαφορετική έκφραση ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν. Τα γονίδια κωδικοποιούν 2 φωσφατάσες, τις MTMR6 και INPP4B, που κρίνονται απαραίτητες για την ολοκλήρωση της μακροπινοκυττάρωσης. Στη συνέχεια, για επιβεβαίωση και εμπλουτισμό των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών, απομονώθηκε RNA και πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR), για τον έλεγχο της υπερέκφρασης

των παραπάνω γονιδίων. Τα δεδομένα που προέκυψαν είναι σε συμφωνία με εκείνα της ανάλυσης μικροσυστοιχιών και δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν εκφράζονται στις ολοδύναμες βλαστικές σειρές. Αντίθετα τα μεσεγχυματικά βλαστικά, τα ενδοθηλιακά βλαστικά και τα τελικώς διαφοροποιημένα HUVEC και HEFs εκφράζουν τη φωσφατάση MTMR6. Το ίδιο ισχύει για την INPP4B με εξαίρεση τα χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα HUVEC. Έτσι ολοκληρώνονται τα πειράματα που αφορούν την ενδοκυττάρωση και τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α. Άμεσος στόχος μας η συνέχιση των πειραμάτων σε όλες τις παραπάνω σειρές και η διαλεύκανση του ρόλου των φωσφατασών MTMR6 και INPP4B.



Εικόνα 4.2. Πιθανός μηχανισμός έναρξης της μακροπινοκυττάρωσης κατά τη διαφοροποίηση. Στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (αριστερά, hESCs και hiPSCs) οι φωσφατάσες MTMR6 και INPP4B δεν εκφράζονται, το λιπίδιο PI_{3,4}P₂ δεν αποφωσφορυλιώνεται κι έτσι είναι αδύνατο το κλείσιμο των μακροπινωσμάτων και η ολοκλήρωση της διαδικασίας. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα (δεξιά, HEFs και HUVECs), οι φωσφατάσες εκφράζονται, ο καταρράκτης των αποφωσφορυλίσεων πραγματοποιείται κανονικά και η μακροπινοκυττάρωση ολοκληρώνεται με επιτυχία.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής έχει επιτύχει σε μεγάλο βαθμό τους στόχους που τέθηκαν εξ αρχής. Αρχικά, ολοκληρώθηκε η κινητική της Ακτιβίνης Α και των υποδοχέων της, σε συνδυασμό με τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους στα διάφορα κυστιδιακά διαμερίσματα. Ακολούθησε η διερεύνηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών που συμμετέχουν τόσο στην ενδοκυττάρωση Ακτιβίνης-υποδοχέων, όσο και στην επαγόμενη από την Ακτιβίνη σηματοδότηση. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταγωγή του σήματος δεν πραγματοποιείται ή δεν γίνεται μόνο από

την πλασματική μεμβράνη, αλλά και από το πρώιμο ενδόσωμα, το οποίο λειτουργεί ως πλατφόρμα σηματοδότησης. Ιδιαίτερα σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της μακροπινोκυττάρωσης στη ρύθμιση της σηματοδότησης, με τα δεδομένα να αποτελούν νέα γνώση στο πεδίο της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. Επί του παρόντος, γίνεται προσπάθεια να επεκταθεί η μελέτη τόσο στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα, όσο και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, προκειμένου να πέσει περισσότερο φως στο ρόλο της Ακτιβίνης Α στη βιολογία της εμβρυογένεσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μέλη της υπερικογένειας του TGF- β συμμετέχουν στη ρύθμιση πολλών βιολογικών φαινομένων, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η αγγειογένεση. Η Ακτιβίνη A, μια κυτταροκίνη της υπερικογένειας, προσδένεται σε ετεροτετραμερή σύμπλοκα υποδοχέων κινάσης σερίνης/θρεονίνης και μετάγει τα σήματά της μέσω των SMAD2/3, προάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Η χωροχρονική οργάνωση της ενδοκυττάρωσης και διακίνησης του συμπλόκου προσδέματος-υποδοχέα είναι κρίσιμη στη μεταγωγή του σήματος. Η εσωτερικοποίηση του φορτίου πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών οδών ενδοκυττάρωσης. Η διαλογή του φορτίου στο πρώιμο ενδόσωμα, καθορίζει την ενίσχυση της σηματοδότησης, την ανακύκληση στη πλασματική μεμβράνη και την αποδόμηση του φορτίου.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διαλεύκανση των οδών ενδοκυττάρωσης που χρησιμοποιούνται από το σύμπλοκο Ακτιβίνης-υποδοχέων και η μελέτη της επίδρασης της μεμβρανικής διακίνησης στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης A. Τέλος, καθώς η Ακτιβίνη διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη βιολογία των ανθρώπινων εμβρυϊκών κυττάρων (hESCs), όπου οι μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης και σηματοδότησης παραμένουν άγνωστοι, επιδίωξή μας ήταν να επεκτείνουμε την έρευνά μας στα hESCs.

Αρχικά, βρήκαμε ότι τα μονοπάτια που εξαρτώνται από τη δυναμίνη, της κλαθρίνης και της καβεολίνης, επηρεάζουν στη σηματοδότηση της Ακτιβίνης A. Η αποσιώπηση τους μειώνει σημαντικά τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3, αλλά δεν επηρεάζει την ενδοκυττάρωση της σημασμένης Ακτιβίνης. Φαίνεται ότι η κύρια οδός εσωτερικοποίησης είναι η μακροπινοκυττάρωση. Η σημασμένη Ακτιβίνη συνεντοπίζεται με τη πρωτεΐνη Detran-TexasRed και τη Rabankyrin-5 σε μεγάλα κυστίδια ($>0.2\mu\text{m}$), που χαρακτηρίζονται ως μακροπινোসώματα. Η αποσιώπηση της Rabankyrin-5 μειώνει δραστικά τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 αλλά και την εσωτερικοποίηση του προσδέματος. Αντίθετο αποτέλεσμα έχει η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα της χρήσης αναστολέων της μακροπινοκυττάρωσης, όπως οι EIPA, Cytochalasin D και LY249002. Τέλος, η Ακτιβίνη A επάγει τη μακροπινοκυττάρωση καθώς αυξάνει την ενδοκυττάρωση της Dextran-TexasRed στα κύτταρα HUVEC, και προκαλεί την πτύχωση της μεμβράνης και την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε σειρές ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων δείχνουν ότι η σχέση ενδοκυττάρωσης σηματοδότησης είναι διαφορετική, συγκρινόμενη με τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Με ανάλυση μικροσυστοιχιών και qRT-PCR εντοπίστηκαν δύο φωσφατάσες με αρκετά διαφορετική έκφραση ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές πολυδύναμων, ολιγοδύναμων και διαφοροποιημένων κυττάρων. Οι φωσφατάσες αυτές είναι οι MTMR6 και INNP4B, που θεωρούνται απαραίτητες για την ολοκλήρωση της μακροπινocyττάρωσης.

Συμπερασματικά, η έρευνά μας προσφέρει νέα δεδομένα στη σχέση ενδοκυττάρωσης-σηματοδότησης της Ακτιβίνης Α, αναδεικνύοντας έναν νέο ρόλο της μακροπινocyττάρωσης. Η προσπάθειά μας να διευρύνουμε τα αποτελέσματα σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, βλαστικές και διαφοροποιημένες, συνεχίζεται ακόμη. Τα πρώιμα δεδομένα είναι πολύ ενδιαφέροντα, κι έτσι ελπίζουμε ότι θα ρίξουμε νέο φως στο πεδίο της Ακτιβίνης Α στο άμεσο μέλλον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)

Activin A receptors interacting proteins and their role in signal transduction and biological function.

Nikoleta Kostopoulou

TGF- β superfamily members regulate a wide range of biological processes, such as cell proliferation, differentiation, maintenance of pluripotency and angiogenesis. Activin A, a cytokine of TGF- β superfamily, binds to heterotetrameric complexes of type I and type II Ser/Thr kinase receptors and transduce signals through SMAD2 and SMAD3, promoting the transcription of target genes. In order to orchestrate diverse biological functions, signaling is tightly regulated, both spatially and temporally. The spatial organization and trafficking of ligand-receptor complexes is critical in signal transduction. Internalization of cargo proteins is carried out by various endocytic pathways, such as clathrin-dependent endocytosis, as well as clathrin-independent pathways. Sorting events initiated at early endosomes determine the fate of cargo, including signaling propagation, recycling to the plasma membrane or degradation.

The target of our research was to investigate which endocytic routes internalize the complex of Activin-Receptors and the impact of trafficking events on Activin A signaling. Finally, since Activin A plays a prominent role in biology of human embryonic stem cells (hESCs), where signaling and trafficking events of Activin A/receptor complexes are mainly unknown, the current effort is to apply our knowledge to hESCs.

Our first goal was to test which endocytic routes are utilized from Activin A-receptor complex on endothelial cells, and to address the role of known regulators of trafficking on Activin A signaling. We found that dynamin dependent routes, such as clathrin and caveolin dependent endocytosis, affect Activin A signaling. Knock down of clathrin and caveolin, significantly down regulated the phosphorylation of SMAD2/3, but it didn't change the internalization of ActivinA-Alexa488. It seems that the main endocytic route for Activin A is macropinocytosis. ActivinA-Alexa488 colocalises with Detran-TexasRed and Rabankyrin-5 on large vesicles, with size bigger than 0,2 μm , defined as macropinosomes. Knock down of Rabankyrin-5 decreases the phosphorylation of SMAD2/3 and the internalization of ligand. The opposite effect caused the overexpression of this protein. These results are in agreement

with those performed using known macropinocytosis inhibitors, such as EIPA, Cytochalasin D and LY249002. Also, Activin A induces macropinocytosis, since it upregulates Dextran-TexasRed uptake in HUVECs, and causes membrane ruffling and actin filaments reorganization.

Additionally, we tried to apply our knowledge on stem cell lineages, repeating some key experiments. The results show that the regulation of Activin A signaling through endocytosis differs between pluripotent, multipotent and differentiated cells. Macropinocytosis is either absent or is not affecting Activin A signaling on stem cells. Taking advantage of a microarray analysis performed for our lab, we detected two phosphatases with distinct expression levels between the cell lines used, which are absent in pluripotent cells. These phosphatases are MTMR6 and INNP4B, and considered to be indispensable for the closure of macropinosomes and the completion of this process. We confirmed these results with qRT-PCR, which showed that these proteins are expressed in multipotent (MSCs) and differentiated cells (HEFs, HUVECs).

Taking together our research provides new data regarding signaling and endocytosis events of Activin A-receptor complex, emerging a new role for macropinocytosis. The effort to expand our research on cell lines, with different state of differentiation, is still in progress. Precocious data are very interesting, so we hope to shed more light on Activin A research, in the immediate future.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A

ALK: Activin-like kinase

ActR: Activin Receptor

ATF2: Activating Transcription Factor 2

APPL: Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif

B

BMP: Bone Morphogenetic Proteins

BSA: Bovine Serum Albumin

BAMBI: BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

C

CCP: Clathrin-Coated Pit

CCV: Clathrin-Coated Vesicle

CDE: Clathrin-Dependent Endocytosis

CIE: Clathrin-Independent Endocytosis

CLIC: Clathrin and Dynamin Independent carriers

CDKs: Cyclin Dependent kinases

CBP: CREB binding protein

Co-IP: Co-immunoprecipitation

D

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

Dpp: Decapentaplegic protein

E

ECGS: Endothelial cell growth supplement

EEA1: Early Endosome Antigen-1

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ENDOFIN: Endosome-associated FYVE-domain protein

Eps15: EGFR-pathway substrate 15

ERC: Endocytic Recycling Compartment

EMT: Endothelial to Mesenchymal Transition

ERKs: Extracellular signal-Regulated Kinases

EHD4: EH-Domain Containing 4

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

F

FCS: Fetal Calf Serum

FYVE: Fab1, YOTB, Vac1, EEA1

FSH: Follicle-stimulating Hormone

G

GDF: Growth and Differentiation Factor

GAP: GTPase Activating Proteins

GEF: Guanine nucleotide Exchange Factors

GEEC: Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched Early Endosomal Compartments

GPI: Glycosyl Phosphatidylinositol

GS region: Glycine Serine region

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

H

HEK: Human Embryonic Kidney

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

hSCs: human Stem Cells

hiPSCs: human induced Pluripotent Stem Cells

HIF: Hypoxia Inducible Factor

I

IB: Immuno-Blot

ILV: Intra-Luminal Vesicles

IL: Interleukin

IP: Immuno-Precipitation

INPP4: Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase

IR: Insulin Receptor

J

JNKs: c-Jun N-terminal kinases

K**L**

LDL: Low density lipoprotein

LDLR: Low density lipoprotein receptor

LPS: Lipopolysaccharide

LAP: Latency-Associated Peptide

M

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

MH1/2 domain: Mad Homology 1/2 domain

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MVB: Multivesicular body
MTMRs: Myotubularin Related Proteins
MIS: Mullerian Inhibiting Substance
MMPs: Metalloproteinases

P

PBS: Phosphate buffer saline
PBS: Predicted biological score
PH domain: Pleckstrin-homology domain
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PKC: Protein Kinase C
PARP-1: Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1

Q

qRT-PCR: quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

R

Rab: Ras-associated binding
RTK: Receptor tyrosine kinase
Rb: Retinoblastoma protein

S

SARA: SMAD anchor for receptor activation
SBD: SMAD binding domain
SBE: SMAD Binding Element
SNAREs: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SNXs: Sorting nexins
SV40: Simian virus 40

T

TGF- β : Transforming Growth Factor β
T β R: Transforming growth factor β Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TGN: Trans-Golgi Network

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology*. 1990;6:597-641.
 2. Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;580:225-32.
 3. Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS letters*. 2006;580(12):2811-20.
 4. Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1782(4):197-228.
 5. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(11):807-21.
 6. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000;103(2):295-309.
 7. Janssens K, ten Dijke P, Ralston SH, Bergmann C, Van Hul W. Transforming growth factor-beta 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(9):7718-24.
 8. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*. 2001;29(2):117-29.
 9. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*. 1986;321(6072):779-82.
 10. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Schwall RH, Mason AJ, Nikolics K. Selective and indirect modulation of human multipotential and erythroid hematopoietic progenitor cell proliferation by recombinant human activin and inhibin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(23):9052-6.
 11. Thomsen G, Woolf T, Whitman M, Sokol S, Vaughan J, Vale W, et al. Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell*. 1990;63(3):485-93.
 12. Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vaughan J, Karr D, Fischer WH. Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature*. 1990;344(6269):868-70.
 13. Wu DD, Lai M, Hughes PE, Sirimanne E, Gluckman PD, Williams CE. Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin A following hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Brain research*. 1999;835(2):369-78.
 14. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & development*. 1994;8(2):133-46.
-

-
15. Fotsis T, Breit S, Lutz W, Rossler J, Hatzi E, Schwab M, et al. Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999;263(3):757-64.
 16. Breit S, Ashman K, Wilting J, Rossler J, Hatzi E, Fotsis T, et al. The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. *Cancer research*. 2000;60(16):4596-601.
 17. Panopoulou E, Murphy C, Rasmussen H, Bagli E, Rofstad EK, Fotsis T. Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. *Cancer research*. 2005;65(5):1877-86.
 18. Greenwald J, Vega ME, Allendorph GP, Fischer WH, Vale W, Choe S. A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Molecular cell*. 2004;15(3):485-9.
 19. Harrington AE, Morris-Triggs SA, Ruotolo BT, Robinson CV, Ohnuma S, Hyvonen M. Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *The EMBO journal*. 2006;25(5):1035-45.
 20. Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jardetzky TS, Woodruff TK. The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction*. 2006;132(2):179-90.
 21. Mason AJ, Farnworth PG, Sullivan J. Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Molecular endocrinology*. 1996;10(9):1055-65.
 22. Walton KL, Mankanji Y, Wilce MC, Chan KL, Robertson DM, Harrison CA. A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(14):9311-20.
 23. Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science*. 1990;247(4948):1328-30.
 24. Huylebroeck D, Van Nimmen K, Waheed A, von Figura K, Marmenout A, Fransen L, et al. Expression and processing of the activin-A/erythroid differentiation factor precursor: a member of the transforming growth factor-beta superfamily. *Molecular endocrinology*. 1990;4(8):1153-65.
 25. Thompson TB, Woodruff TK, Jardetzky TS. Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *The EMBO journal*. 2003;22(7):1555-66.
 26. Ethier JF, Findlay JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction*. 2001;121(5):667-75.
 27. Demura R, Suzuki T, Tajima S, Mitsuhashi S, Odagiri E, Eto Y, et al. Competitive protein binding assay for activin A/EDF using follistatin determination of activin levels in human plasma. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;185(3):1148-54.
-

-
28. Knight PG, Muttukrishna S, Groome NP. Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *The Journal of endocrinology*. 1996;148(2):267-79.
 29. Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(1):247-51.
 30. Schneider O, Nau R, Michel U. Comparative analysis of follistatin-, activin beta A- and activin beta B-mRNA steady-state levels in diverse porcine tissues by multiplex S1 nuclease analysis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2000;142(5):537-44.
 31. Lee WH, Chung MH, Tsai YH, Chang JL, Huang HM. Interferon-gamma suppresses activin A/NF-E2 induction of erythroid gene expression through the NF-kappaB/c-Jun pathway. *American journal of physiology Cell physiology*. 2014;306(4):C407-14.
 32. Miyanaga K, Erickson GF, DePaolo LV, Ling N, Shimasaki S. Differential control of activin, inhibin and follistatin proteins in cultured rat granulosa cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;194(1):253-8.
 33. Scutera S, Riboldi E, Daniele R, Elia AR, Fraone T, Castagnoli C, et al. Production and function of activin A in human dendritic cells. *European cytokine network*. 2008;19(1):60-8.
 34. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:753-91.
 35. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):1-11.
 36. Mehra A, Attisano L, Wrana JL. Characterization of SMAD phosphorylation and SMAD-receptor interaction. *Methods in molecular biology*. 2000;142:67-78.
 37. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-SMAD signalling. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(5):265-73.
 38. Raftery LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics*. 1995;139(1):241-54.
 39. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1995;139(3):1347-58.
 40. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, et al. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell*. 1996;85(4):489-500.
-

-
41. Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator SMAD1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes & development*. 1997;11(8):984-95.
 42. Baker JC, Harland RM. A novel mesoderm inducer, *Madr2*, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes & development*. 1996;10(15):1880-9.
 43. Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, et al. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes & development*. 1998;12(14):2144-52.
 44. Lo RS, Chen YG, Shi Y, Pavletich NP, Massague J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *The EMBO journal*. 1998;17(4):996-1005.
 45. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits SMAD2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. 1998;95(6):779-91.
 46. Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(39):24048-54.
 47. Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*. 1998;394(6692):432-3.
 48. Schmierer B, Tournier AL, Bates PA, Hill CS. Mathematical modeling identifies SMAD nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(18):6608-13.
 49. Xiao Z, Liu X, Lodish HF. Importin beta mediates nuclear translocation of SMAD 3. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(31):23425-8.
 50. Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of SMAD3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(4):1079-91.
 51. Inman GJ, Hill CS. Stoichiometry of active SMAD-transcription factor complexes on DNA. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(52):51008-16.
 52. Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS. Transforming growth factor beta-independent shuttling of SMAD4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(23):9041-54.
 53. Xiao Z, Latek R, Lodish HF. An extended bipartite nuclear localization signal in SMAD4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene*. 2003;22(7):1057-69.
 54. Kurisaki A, Kurisaki K, Kowanetz M, Sugino H, Yoneda Y, Heldin CH, et al. The mechanism of nuclear export of SMAD3 involves exportin 4 and Ran. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(4):1318-32.
-

-
55. Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E. Regulation of intracellular dynamics of SMAD4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO reports*. 2000;1(2):176-82.
 56. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through SMADs. *Annual review of cell and developmental biology*. 2005;21:659-93.
 57. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(12):970-82.
 58. Chang CC, Lin DY, Fang HI, Chen RH, Shih HM. Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of SMAD4. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10164-73.
 59. Chen Y, Lebrun JJ, Vale W. Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):12992-7.
 60. Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. SMAD4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*. 1997;389(6646):85-9.
 61. Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. SMAD2 and SMAD3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Molecular cell*. 1998;2(1):109-20.
 62. Liu B, Dou CL, Prabhu L, Lai E. FAST-2 is a mammalian winged-helix protein which mediates transforming growth factor beta signals. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(1):424-30.
 63. Liu F, Pouponnot C, Massague J. Dual role of the SMAD4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes & development*. 1997;11(23):3157-67.
 64. Zhou S, Zawal L, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer. *Molecular cell*. 1998;2(1):121-7.
 65. Zhang Y, Feng XH, Derynck R. SMAD3 and SMAD4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*. 1998;394(6696):909-13.
 66. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, SMAD4-independent pathway. *The EMBO journal*. 1999;18(5):1345-56.
 67. Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, et al. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with SMADs. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(44):31577-82.
 68. Shioda T, Lechleider RJ, Dunwoodie SL, Li H, Yahata T, de Caestecker MP, et al. Transcriptional activating activity of SMAD4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(17):9785-90.
-

-
69. Mavrakis KJ, Andrew RL, Lee KL, Petropoulou C, Dixon JE, Navaratnam N, et al. Arkadia enhances Nodal/TGF-beta signaling by coupling phospho-SMAD2/3 activity and turnover. *PLoS biology*. 2007;5(3):e67.
 70. Le Scolan E, Zhu Q, Wang L, Bandyopadhyay A, Javelaud D, Mauviel A, et al. Transforming growth factor-beta suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer research*. 2008;68(9):3277-85.
 71. Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, et al. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of SMAD7. *The EMBO journal*. 2003;22(24):6458-70.
 72. Welt CK. The physiology and pathophysiology of inhibin, activin and follistatin in female reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2002;14(3):317-23.
 73. Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y, Sugino H. A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21):13835-42.
 74. Bilezikjian LM, Blount AL, Donaldson CJ, Vale WW. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. *Reproduction*. 2006;132(2):207-15.
 75. Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*. 1991;65(6):973-82.
 76. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*. 1999;401(6752):480-5.
 77. Matsuzaki T, Hanai S, Kishi H, Liu Z, Bao Y, Kikuchi A, et al. Regulation of endocytosis of activin type II receptors by a novel PDZ protein through Ral/Ral-binding protein 1-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(21):19008-18.
 78. Lu C, Yang W, Chen M, Liu T, Yang J, Tan P, et al. Inhibin A inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing its receptor expression in cultured rat granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;298(1-2):48-56.
 79. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. SMAD6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*. 1997;389(6651):622-6.
 80. Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. SMAD6 inhibits BMP/SMAD1 signaling by specifically competing with the SMAD4 tumor suppressor. *Genes & development*. 1998;12(2):186-97.
 81. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, et al. The MAD-related protein SMAD7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997;89(7):1165-73.
-

-
82. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of SMAD7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997;389(6651):631-5.
 83. Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K, et al. Differential inhibition of SMAD6 and SMAD7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(19):13637-42.
 84. Persson U, Izumi H, Souchelnytskyi S, Itoh S, Grimsby S, Engstrom U, et al. The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying SMAD isoform activation. *FEBS letters*. 1998;434(1-2):83-7.
 85. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. SMAD7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell*. 2000;6(6):1365-75.
 86. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through SMAD7 and induces receptor degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(16):12477-80.
 87. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*. 1999;400(6745):687-93.
 88. Lonn P, van der Heide LP, Dahl M, Hellman U, Heldin CH, Moustakas A. PARP-1 attenuates SMAD-mediated transcription. *Molecular cell*. 2010;40(4):521-32.
 89. Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, et al. PPM1A functions as a SMAD phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell*. 2006;125(5):915-28.
 90. Shukla A, Malik M, Cataisson C, Ho Y, Friesen T, Suh KS, et al. TGF-beta signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-SMAD2 and 3. *Nature cell biology*. 2009;11(6):777-84.
 91. Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, et al. Nuclear CDKs drive SMAD transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*. 2009;139(4):757-69.
 92. Millet C, Yamashita M, Heller M, Yu LR, Veenstra TD, Zhang YE. A negative feedback control of transforming growth factor-beta signaling by glycogen synthase kinase 3-mediated SMAD3 linker phosphorylation at Ser-204. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(30):19808-16.
 93. Gao S, Alarcon C, Sapkota G, Rahman S, Chen PY, Goerner N, et al. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated SMAD2/3 to limit TGF-beta signaling. *Molecular cell*. 2009;36(3):457-68.
 94. Moustakas A, Heldin CH. Non-SMAD TGF-beta signals. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 16):3573-84.
 95. Zhang YE. Non-SMAD pathways in TGF-beta signaling. *Cell research*. 2009;19(1):128-39.
-

-
96. Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-SMAD signaling pathways. *Cell and tissue research*. 2012;347(1):11-20.
 97. Reynisdottir I, Massague J. The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes & development*. 1997;11(4):492-503.
 98. Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(42):15231-6.
 99. Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by SMAD proteins. *Journal of cellular physiology*. 2002;191(1):1-16.
 100. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer research*. 2002;62(13):3789-93.
 101. Su GH, Bansal R, Murphy KM, Montgomery E, Yeo CJ, Hruban RH, et al. ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(6):3254-7.
 102. Zauberman A, Oren M, Zipori D. Involvement of p21(WAF1/Cip1), CDK4 and Rb in activin A mediated signaling leading to hepatoma cell growth inhibition. *Oncogene*. 1997;15(14):1705-11.
 103. Koseki T, Yamato K, Krajewski S, Reed JC, Tsujimoto Y, Nishihara T. Activin A-induced apoptosis is suppressed by BCL-2. *FEBS letters*. 1995;376(3):247-50.
 104. Fukuchi Y, Kizaki M, Yamato K, Kawamura C, Umezawa A, Hata J, et al. Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene*. 2001;20(6):704-13.
 105. Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006;235(4):1124-32.
 106. Muttukrishna S, Tannetta D, Groome N, Sargent I. Activin and follistatin in female reproduction. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;225(1-2):45-56.
 107. Huber S, Stahl FR, Schrader J, Luth S, Presser K, Carambia A, et al. Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. *Journal of immunology*. 2009;182(8):4633-40.
 108. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(10):616-30.
 109. Ogawa K, Funaba M, Chen Y, Tsujimoto M. Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages. *Journal of immunology*. 2006;177(10):6787-94.
-

-
110. Kozaki K, Akishita M, Eto M, Yoshizumi M, Toba K, Inoue S, et al. Role of activin-A and follistatin in foam cell formation of THP-1 macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(11):2389-94.
 111. Munz B, Tretter YP, Hertel M, Engelhardt F, Alzheimer C, Werner S. The roles of activins in repair processes of the skin and the brain. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001;180(1-2):169-77.
 112. Jazwinska A, Badakov R, Keating MT. Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Current biology : CB*. 2007;17(16):1390-5.
 113. Gurdon JB, Harger P, Mitchell A, Lemaire P. Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature*. 1994;371(6497):487-92.
 114. Wang Q, Tabatabaei S, Planz B, Lin CW, Sluss PM. Identification of an activin-follistatin growth modulatory system in the human prostate: secretion and biological activity in primary cultures of prostatic epithelial cells. *The Journal of urology*. 1999;161(4):1378-84.
 115. McPherson SJ, Thomas TZ, Wang H, Gurusinghe CJ, Risbridger GP. Growth inhibitory response to activin A and B by human prostate tumour cell lines, LNCaP and DU145. *The Journal of endocrinology*. 1997;154(3):535-45.
 116. Planz B, Oltean H, Deix T, Kirley SD, Wang QF, McDougal WS, et al. Effect of keratinocyte growth factor and activin on cell growth in the human prostatic cancer cell line LNCaP. *World journal of urology*. 2004;22(2):140-4.
 117. Liu QY, Niranjana B, Gomes P, Gomm JJ, Davies D, Coombes RC, et al. Inhibitory effects of activin on the growth and morphogenesis of primary and transformed mammary epithelial cells. *Cancer research*. 1996;56(5):1155-63.
 118. Ottley E, Gold E. Insensitivity to the growth inhibitory effects of activin A: an acquired capability in prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(3):119-25.
 119. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocrine-related cancer*. 2012;19(6):R187-204.
 120. Hofland J, van Weerden WM, Steenbergen J, Dits NF, Jenster G, de Jong FH. Activin A stimulates AKR1C3 expression and growth in human prostate cancer. *Endocrinology*. 2012;153(12):5726-34.
 121. Krstic J, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:521754.
 122. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
 123. Kelner N, Rodrigues PC, Bufalino A, Fonseca FP, Santos-Silva AR, Miguel MC, et al. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2015;37(4):479-86.
-

-
124. Chang KP, Kao HK, Liang Y, Cheng MH, Chang YL, Liu SC, et al. Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(7):1945-56.
 125. Yoshinaga K, Mimori K, Inoue H, Kamohara Y, Yamashita K, Tanaka F, et al. Activin A enhances MMP-7 activity via the transcription factor AP-1 in an esophageal squamous cell carcinoma cell line. *International journal of oncology*. 2008;33(3):453-9.
 126. Brown CW, Houston-Hawkins DE, Woodruff TK, Matzuk MM. Insertion of *Inhbb* into the *Inhba* locus rescues the *Inhba*-null phenotype and reveals new activin functions. *Nature genetics*. 2000;25(4):453-7.
 127. Abe M, Shintani Y, Eto Y, Harada K, Fujinaka Y, Kosaka M, et al. Interleukin-1 beta enhances and interferon-gamma suppresses activin A actions by reciprocally regulating activin A and follistatin secretion from bone marrow stromal fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*. 2001;126(1):64-8.
 128. Cho SH, Yao Z, Wang SW, Alban RF, Barbers RG, French SW, et al. Regulation of activin A expression in mast cells and asthma: its effect on the proliferation of human airway smooth muscle cells. *Journal of immunology*. 2003;170(8):4045-52.
 129. Karagiannidis C, Hense G, Martin C, Epstein M, Ruckert B, Mantel PY, et al. Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(1):111-8.
 130. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004;303(5659):848-51.
 131. Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral oncology*. 2011;47(9):840-6.
 132. Zhou B, Chen WL, Wang YY, Lin ZY, Zhang DM, Fan S, et al. A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2014;43(8):585-92.
 133. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(5):392-401.
 134. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology*. 2007;51(6):849-53.
 135. Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental cell research*. 2010;316(17):2713-22.
 136. McCarthy SA, Bicknell R. Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(31):23066-71.
-

-
137. Kaneda H, Arai T, Matsumoto K, De Velasco MA, Tamura D, Aomatsu K, et al. Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer. *British journal of cancer*. 2011;105(8):1210-7.
138. Nold-Petry CA, Rudloff I, Baumer Y, Ruvo M, Marasco D, Botti P, et al. IL-32 promotes angiogenesis. *Journal of immunology*. 2014;192(2):589-602.
139. Guo Y, Kyprianou N. Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;9(2):185-93.
140. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):e218-28.
141. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO journal*. 2002;21(7):1743-53.
142. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(2):584-94.
143. Breen MJ, Moran DM, Liu W, Huang X, Vary CP, Bergan RC. Endoglin-mediated suppression of prostate cancer invasion is regulated by activin and bone morphogenetic protein type II receptors. *PloS one*. 2013;8(8):e72407.
144. Nakagawa T, Li JH, Garcia G, Mu W, Piek E, Bottinger EP, et al. TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct SMAD pathways. *Kidney international*. 2004;66(2):605-13.
145. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer research*. 2002;62(21):6021-5.
146. Guillot N, Kollins D, Badimon JJ, Schlondorff D, Hutter R. Accelerated reendothelialization, increased neovascularization and erythrocyte extravasation after arterial injury in BAMBI^{-/-} mice. *PloS one*. 2013;8(3):e58550.
147. Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):1116-24.
148. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1775(1):21-62.
-

-
149. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(10):790-811.
 150. Singh G, Singh SK, Konig A, Reutlinger K, Nye MD, Adhikary T, et al. Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(35):27241-50.
 151. Hannigan A, Smith P, Kalna G, Lo Nigro C, Orange C, O'Brien DI, et al. Epigenetic downregulation of human disabled homolog 2 switches TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(8):2842-57.
 152. Heikkinen PT, Nummela M, Leivonen SK, Westermarck J, Hill CS, Kahari VM, et al. Hypoxia-activated SMAD3-specific dephosphorylation by PP2A. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(6):3740-9.
 153. Halder SK, Rachakonda G, Deane NG, Datta PK. SMAD7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2008;99(6):957-65.
 154. Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology*. 1997;138(9):3976-86.
 155. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
 156. McDowell N, Gurdon JB. Activin as a morphogen in *Xenopus* mesoderm induction. *Seminars in cell & developmental biology*. 1999;10(3):311-7.
 157. Roberts AB, Sporn MB. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Molecular reproduction and development*. 1992;32(2):91-8.
 158. Green JB, New HV, Smith JC. Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell*. 1992;71(5):731-9.
 159. Symes K, Yordan C, Mercola M. Morphological differences in *Xenopus* embryonic mesodermal cells are specified as an early response to distinct threshold concentrations of activin. *Development*. 1994;120(8):2339-46.
 160. Gurdon JB, Ryan K, Stennard F, McDowell N, Zorn AM, Crease DJ, et al. Cell response to different concentrations of a morphogen: activin effects on *Xenopus* animal caps. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1997;62:151-8.
 161. McDowell N, Zorn AM, Crease DJ, Gurdon JB. Activin has direct long-range signalling activity and can form a concentration gradient by diffusion. *Current biology : CB*. 1997;7(9):671-81.
 162. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*. 2005;132(6):1273-82.
-

-
163. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 19):4495-509.
 164. Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development*. 2009;136(8):1339-49.
 165. Chng Z, Vallier L, Pedersen R. Activin/nodal signaling and pluripotency. *Vitamins and hormones*. 2011;85:39-58.
 166. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem cells*. 2006;24(6):1476-86.
 167. Evseenko D, Zhu Y, Schenke-Layland K, Kuo J, Latour B, Ge S, et al. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(31):13742-7.
 168. Brown S, Teo A, Pauklin S, Hannan N, Cho CH, Lim B, et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem cells*. 2011;29(8):1176-85.
 169. Pauklin S, Vallier L. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development*. 2015;142(4):607-19.
 170. Olkkonen VM, Ikonen E. When intracellular logistics fails--genetic defects in membrane trafficking. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 24):5031-45.
 171. Sannerud R, Saraste J, Goud B. Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(4):438-45.
 172. Bonifacino JS, Rojas R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(8):568-79.
 173. Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 2004;116(2):153-66.
 174. Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell research*. 2010;20(3):256-75.
 175. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *The Biochemical journal*. 2008;412(3):415-23.
 176. Kumari S, Mayor S. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nature cell biology*. 2008;10(1):30-41.
 177. Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG, et al. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Current biology : CB*. 2008;18(22):1802-8.
 178. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(8):603-12.
-

-
179. Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(10):721-30.
 180. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology*. 2010;25(1):99-112.
 181. Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Current opinion in cell biology*. 2001;13(4):485-92.
 182. Sasaki T, Sasaki J, Sakai T, Takasuga S, Suzuki A. The physiology of phosphoinositides. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2007;30(9):1599-604.
 183. Zwang Y, Yarden Y. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*. 2009;10(4):349-63.
 184. Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Current biology : CB*. 1998;8(25):1399-402.
 185. Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, et al. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidyl-inositol 3-kinase activity. *Current biology : CB*. 1999;9(1):55-8.
 186. Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, et al. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *The EMBO journal*. 2000;19(17):4577-88.
 187. Gillooly DJ, Simonsen A, Stenmark H. Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *The Biochemical journal*. 2001;355(Pt 2):249-58.
 188. Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(4):496-504.
 189. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(2):107-17.
 190. Grosshans BL, 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*. 2006;103(32):11821-7.
 191. Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(11):a022616.
 192. Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature cell biology*. 1999;1(4):249-52.
 193. Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 1991;64(5):915-25.
 194. Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature cell biology*. 1999;1(6):376-82.
-

-
195. Benmerah A. Endocytosis: signaling from endocytic membranes to the nucleus. *Current biology : CB*. 2004;14(8):R314-6.
 196. Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, Rhinn M, Giner A, Habermann B, et al. The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell*. 2008;133(3):486-97.
 197. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, et al. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 2004;116(3):445-56.
 198. Vanlandingham PA, Ceresa BP. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(18):12110-24.
 199. Silverman JS, Schwartz KJ, Hajduk SL, Bangs JD. Late endosomal Rab7 regulates lysosomal trafficking of endocytic but not biosynthetic cargo in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology*. 2011;82(3):664-78.
 200. Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of cell biology*. 2000;149(4):901-14.
 201. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 22):3905-10.
 202. Miaczynska M, Zerial M. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Experimental cell research*. 2002;272(1):8-14.
 203. Zhen Y, Stenmark H. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of cell science*. 2015;128(17):3171-6.
 204. Lippe R, Horiuchi H, Runge A, Zerial M. Expression, purification, and characterization of Rab5 effector complex, rabaptin-5/rabex-5. *Methods in enzymology*. 2001;329:132-45.
 205. Lippe R, Miaczynska M, Rybin V, Runge A, Zerial M. Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(7):2219-28.
 206. Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, Miaczynska M, Dewitte F, Wilm M, 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*. 2000;151(3):601-12.
 207. Cozier GE, Carlton J, McGregor AH, Gleeson PA, Teasdale RD, Mellor H, et al. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(50):48730-6.
-

-
208. Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*. 1998;394(6692):494-8.
 209. McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*. 1999;98(3):377-86.
 210. Mills IG, Jones AT, Clague MJ. Regulation of endosome fusion. *Molecular membrane biology*. 1999;16(1):73-9.
 211. Jones AT, Mills IG, Scheidig AJ, Alexandrov K, Clague MJ. Inhibition of endosome fusion by wortmannin persists in the presence of activated Rab5. *Molecular biology of the cell*. 1998;9(2):323-32.
 212. de Renzis S, Sonnichsen B, Zerial M. Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nature cell biology*. 2002;4(2):124-33.
 213. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(9):597-608.
 214. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(2):121-32.
 215. Kummel D, Ungermann C. Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Current opinion in cell biology*. 2014;29:61-6.
 216. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 9):1515-24.
 217. Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(4):1255-9.
 218. Roth TF, Porter KR. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *The Journal of cell biology*. 1964;20:313-32.
 219. Kirchhausen T. Clathrin. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:699-727.
 220. Marsh M, McMahon HT. The structural era of endocytosis. *Science*. 1999;285(5425):215-20.
 221. Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell*. 2004;118(5):591-605.
 222. Ungewickell EJ, Hinrichsen L. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(4):417-25.
 223. Merrifield CJ, Perrais D, Zenisek D. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*. 2005;121(4):593-606.
 224. Young A. Structural insights into the clathrin coat. *Seminars in cell & developmental biology*. 2007;18(4):448-58.
-

-
225. Kirchhausen T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15:705-32.
226. Blood PD, Voth GA. Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(41):15068-72.
227. Habermann B. The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO reports*. 2004;5(3):250-5.
228. Kanaseki T, Kadota K. The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *The Journal of cell biology*. 1969;42(1):202-20.
229. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006;124(4):729-40.
230. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(8):517-33.
231. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992;68(4):673-82.
232. Chadda R, Howes MT, Plowman SJ, Hancock JF, Parton RG, Mayor S. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic*. 2007;8(6):702-17.
233. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*. 2008;132(1):113-24.
234. McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 2005;438(7068):590-6.
235. Kalia M, Kumari S, Chadda R, Hill MM, Parton RG, Mayor S. Arf6-independent GPI-anchored protein-enriched early endosomal compartments fuse with sorting endosomes via a Rab5/phosphatidylinositol-3'-kinase-dependent machinery. *Molecular biology of the cell*. 2006;17(8):3689-704.
236. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology*. 1994;127(5):1217-32.
237. Herreros J, Ng T, Schiavo G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(10):2947-60.
238. Shogomori H, Futerman AH. Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(12):9182-8.
-

-
239. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic*. 2002;3(5):311-20.
240. Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular biology of the cell*. 1996;7(11):1825-34.
241. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(6).
242. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic*. 2009;10(4):364-71.
243. Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling*. 2009;21(1):1-6.
244. Amyere M, Mettlen M, Van Der Smissen P, Platek A, Payraastre B, Veithen A, et al. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2002;291(6-7):487-94.
245. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *The Journal of cell biology*. 2001;155(4):649-59.
246. Fabbri A, Falzano L, Travaglione S, Stringaro A, Malorni W, Fais S, et al. Rho-activating Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: macropinocytosis of apoptotic bodies in human epithelial cells. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2002;291(6-7):551-4.
247. Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*. 1993;364(6438):639-42.
248. Watarai M, Derre I, Kirby J, Gowney JD, Dietrich WF, Isberg RR. Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(8):1081-96.
249. Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman AM, Daha MR, van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*. 2006;107(12):4930-7.
250. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation*. 2008;15(2):243-50.
251. Lanzetti L, Palamidessi A, Areces L, Scita G, Di Fiore PP. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature*. 2004;429(6989):309-14.
252. Bar-Sagi D, Feramisco JR. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*. 1986;233(4768):1061-8.
-

-
253. Mercer J, Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*. 2008;320(5875):531-5.
254. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70(3):401-10.
255. Schnatwinkel C, Christoforidis S, Lindsay MR, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Parton RG, et al. The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS biology*. 2004;2(9):E261.
256. Radhakrishna H, Klausner RD, Donaldson JG. Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *The Journal of cell biology*. 1996;134(4):935-47.
257. Radhakrishna H, Al-Awar O, Khachikian Z, Donaldson JG. ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *Journal of cell science*. 1999;112 (Pt 6):855-66.
258. Lundmark R, Doherty GJ, Vallis Y, Peter BJ, McMahon HT. Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. *The Biochemical journal*. 2008;414(2):189-94.
259. Svensson HG, West MA, Mollahan P, Prescott AR, Zaru R, Watts C. A role for ARF6 in dendritic cell podosome formation and migration. *European journal of immunology*. 2008;38(3):818-28.
260. Donaldson JG. Arfs, phosphoinositides and membrane traffic. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 6):1276-8.
261. Santy LC, Casanova JE. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *The Journal of cell biology*. 2001;154(3):599-610.
262. Franco M, Peters PJ, Boretto J, van Donselaar E, Neri A, D'Souza-Schorey C, et al. EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *The EMBO journal*. 1999;18(6):1480-91.
263. Porat-Shliom N, Kloog Y, Donaldson JG. A unique platform for H-Ras signaling involving clathrin-independent endocytosis. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(3):765-75.
264. Liberali P, Ramo P, Pelkmans L. Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. *Annual review of cell and developmental biology*. 2008;24:501-23.
265. Liberali P, Kakkonen E, Turacchio G, Valente C, Spaar A, Perinetti G, et al. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *The EMBO journal*. 2008;27(7):970-81.
266. Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(10):3341-52.
267. Parrini MC, Matsuda M, de Gunzburg J. Spatiotemporal regulation of the Pak1 kinase. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 4):646-8.
-

-
268. Dharmawardhane S, Brownson D, Lennartz M, Bokoch GM. Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(3):521-7.
269. Puto LA, Pestonjamas K, King CC, Bokoch GM. p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(11):9388-93.
270. Galisteo ML, Chernoff J, Su YC, Skolnik EY, Schlessinger J. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(35):20997-1000.
271. Miyata Y, Nishida E, Koyasu S, Yahara I, Sakai H. Protein kinase C-dependent and -independent pathways in the growth factor-induced cytoskeletal reorganization. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(26):15565-8.
272. Amyere M, Payraastre B, Krause U, Van Der Smissen P, Veithen A, Courtoy PJ. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(10):3453-67.
273. West MA, Bretscher MS, Watts C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *The Journal of cell biology*. 1989;109(6 Pt 1):2731-9.
274. Dowrick P, Kenworthy P, McCann B, Warn R. Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *European journal of cell biology*. 1993;61(1):44-53.
275. Egami Y, Taguchi T, Maekawa M, Arai H, Araki N. Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation. *Frontiers in physiology*. 2014;5:374.
276. Araki N, Egami Y, Watanabe Y, Hatae T. Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Experimental cell research*. 2007;313(7):1496-507.
277. Lindmo K, Stenmark H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 4):605-14.
278. Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(8):639-49.
279. Araki N, Hamasaki M, Egami Y, Hatae T. Effect of 3-methyladenine on the fusion process of macropinosomes in EGF-stimulated A431 cells. *Cell structure and function*. 2006;31(2):145-57.
280. Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology*. 1996;135(5):1249-60.
281. Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, et al. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Current biology : CB*. 1995;5(4):393-403.
-

-
282. Robinson FL, Dixon JE. Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends in cell biology*. 2006;16(8):403-12.
283. Amoasii L, Hnia K, Laporte J. Myotubularin phosphoinositide phosphatases in human diseases. *Current topics in microbiology and immunology*. 2012;362:209-33.
284. Maekawa M, Terasaka S, Mochizuki Y, Kawai K, Ikeda Y, Araki N, et al. Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(11):E978-87.
285. Schaletzky J, Dove SK, Short B, Lorenzo O, Clague MJ, Barr FA. Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. *Current biology : CB*. 2003;13(6):504-9.
286. Hewlett LJ, Prescott AR, Watts C. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *The Journal of cell biology*. 1994;124(5):689-703.
287. Racoosin EL, Swanson JA. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *The Journal of cell biology*. 1993;121(5):1011-20.
288. Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J, Stahl PD. Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68(5):627-32.
289. Hamasaki M, Araki N, Hatae T. Association of early endosomal autoantigen 1 with macropinocytosis in EGF-stimulated A431 cells. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;277(2):298-306.
290. Bryant DM, Kerr MC, Hammond LA, Joseph SR, Mostov KE, Teasdale RD, et al. EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 10):1818-28.
291. Lim JP, Wang JT, Kerr MC, Teasdale RD, Gleeson PA. A role for SNX5 in the regulation of macropinocytosis. *BMC cell biology*. 2008;9:58.
292. Kerr MC, Lindsay MR, Luetterforst R, Hamilton N, Simpson F, Parton RG, et al. Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 19):3967-80.
293. Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *The EMBO journal*. 1994;13(18):4269-77.
294. Baass PC, Di Guglielmo GM, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends in cell biology*. 1995;5(12):465-70.
-

-
295. von Zastrow M, Sorkin A. Signaling on the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(4):436-45.
296. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*. 2005;122(5):735-49.
297. Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, et al. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*. 2005;436(7047):78-86.
298. Johannessen LE, Pedersen NM, Pedersen KW, Madshus IH, Stang E. Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(2):389-401.
299. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
300. Nonnenmacher M, Weber T. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell host & microbe*. 2011;10(6):563-76.
301. Lu Z, Murray JT, Luo W, Li H, Wu X, Xu H, et al. Transforming growth factor beta activates SMAD2 in the absence of receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):29363-8.
302. Mitchell H, Choudhury A, Pagano RE, Leof EB. Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(9):4166-78.
303. Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell*. 1983;33(1):273-85.
304. Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, Vallee RB. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *The Journal of cell biology*. 1993;122(3):565-78.
305. 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*. 2002;158(7):1239-49.
306. Chen CL, Hou WH, Liu IH, Hsiao G, Huang SS, Huang JS. Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGFbeta signaling and responses. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 11):1863-71.
307. Panopoulou E, Gillooly DJ, Wrana JL, Zerial M, Stenmark H, Murphy C, et al. Early endosomal regulation of SMAD-dependent signaling in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(20):18046-52.
308. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology*. 2003;5(5):410-21.
309. Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(9):609-22.
-

-
310. Zhou Y, Scolavino S, Funderburk SF, Ficociello LF, Zhang X, Klibanski A. Receptor internalization-independent activation of SMAD2 in activin signaling. *Molecular endocrinology*. 2004;18(7):1818-26.
 311. Hagemann AI, Xu X, Nentwich O, Hyvonen M, Smith JC. Rab5-mediated endocytosis of activin is not required for gene activation or long-range signalling in *Xenopus*. *Development*. 2009;136(16):2803-13.
 312. Jullien J, Gurdon J. Morphogen gradient interpretation by a regulated trafficking step during ligand-receptor transduction. *Genes & development*. 2005;19(22):2682-94.
 313. Rupper A, Lee K, Knecht D, Cardelli J. Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(9):2813-24.
 314. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*. 1973;52(11):2745-56.
 315. Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological reviews*. 2006;58(1):32-45.
 316. Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. The role of internalization in transforming growth factor beta1-induced SMAD2 association with SMAD anchor for receptor activation (SARA) and SMAD2-dependent signaling in human mesangial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(9):8300-8.
 317. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Bottinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6727-38.
 318. Mercer J, Helenius A. Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Current opinion in microbiology*. 2012;15(4):490-9.
 319. Davies PF, Ross R. Mediation of pinocytosis in cultured arterial smooth muscle and endothelial cells by platelet-derived growth factor. *The Journal of cell biology*. 1978;79(3):663-71.
 320. Schmees C, Villasenor R, Zheng W, Ma H, Zerial M, Heldin CH, et al. Macropinocytosis of the PDGF beta-receptor promotes fibroblast transformation by H-RasG12V. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(13):2571-82.
 321. Koumakpayi IH, Le Page C, Delvoye N, Saad F, Mes-Masson AM. Macropinocytosis inhibitors and Arf6 regulate ErbB3 nuclear localization in prostate cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. 2011;50(11):901-12.
 322. Koivusalo M, Welch C, Hayashi H, Scott CC, Kim M, Alexander T, et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of cell biology*. 2010;188(4):547-63.
-

-
323. Hatsell SJ, Idone V, Wolken DM, Huang L, Kim HJ, Wang L, et al. ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Science translational medicine*. 2015;7(303):303ra137.
324. Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergermann JH, Hassel S, et al. Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(20):7791-805.
325. Gleason RJ, Akintobi AM, Grant BD, Padgett RW. BMP signaling requires retromer-dependent recycling of the type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(7):2578-83.
326. Steinberg F, Gallon M, Winfield M, Thomas EC, Bell AJ, Heesom KJ, et al. A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nature cell biology*. 2013;15(5):461-71.
327. Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, Toyoshima K, et al. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science*. 1984;224(4647):417-9.
328. Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Sullivan M, Wilson RK, Ma DP, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells. *Nature*. 1984;309(5971):806-10.
329. Xu YH, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(23):7308-12.
330. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-related cancer*. 2001;8(3):161-73.
331. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*. 2013;497(7451):6337
-