



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΣΤΑ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΣΟΦΙΑ ΖΩΓΡΑΦΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΣΤΑ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΣΟΦΙΑ ΖΩΓΡΑΦΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ζωγράφου Σοφίας: 1-12-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 569^α/23-12-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κούκλης Παναγιώτης Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Carol Murphy Ερευνήτρια Β' IBE-ITE

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-1-2006

«Μοριακοί μηχανισμοί ρυθμιζόμενης έκκρισης στα ενδοθλιακά κύτταρα »

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 601^α/27-3-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Χριστοφορίδης Σάββας Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κούκλης Παναγιώτης Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Carol Murphy Ερευνήτρια Β' IBE-ITE

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666^α/22-9-2009

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής

Carol Murphy

Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ερευνήτρια Β΄ Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 10-1-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ - ΖΩΗ

Στη Μαριγούλα...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο 2006-2010 στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (IBE-ITE). Πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Σ. Χριστοφορίδη, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες, για το μεράκι με το οποίο σκύβει πάνω από το νέο φοιτητή και κάνει τα δικά σου άγχη δικά του, καθώς επίσης και για την υπομονή του. Η χρηματοδότηση της διατριβής έγινε από το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003/03ΕΔ68.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, την Ερευνήτρια Β' κ. Carol Murphy και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Κούκλη, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δ. Γαλάρη, τον Καθηγητή κ. Θ. Φώτση, τον Καθηγητή κ. Σ. Γεωργάτο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Θ. Παπαμαρκάκη, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου τα μέλη του εργαστηρίου μου, Τάνια Παπανικολάου, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, Δημήτρη Μπασαγιάννη, καθώς και όλα τα μέλη της Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών. Τη Μιχαέλα Διαμάντη, που εργάστηκε μαζί μου, στα πλαίσια της πτυχιακής της εργασίας, στη σάρωση των Rab GTPασών στα κύτταρα HUVE.

Τη Νατάσα, τη Σοφία, την Κατερίνα, τη Βασιλική και την Αμαλία. Κλείνοντας, να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, Χριστόφορο και Μαριγούλα, και τα αδέρφια μου, Έλενα και Βασίλη, για την αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Το ενδοθήλιο	3
1.1.1 Λειτουργίες του ενδοθηλίου.....	3
1.1.2 Δύο μηχανισμοί προσαρμογής του ενδοθηλίου με σημαντική διαφορά στο χρόνο απόκρισης: βραδύς και βραχύς	6
1.2 Weibel-Palade bodies (WPBs).....	7
1.2.1 Μορφολογία – Κατάταξη των WPBs.....	7
1.2.2 Κυρίαρχο φορτίο των WPBs η πρωτεΐνη vWF: βιολογική δράση	8
1.2.3 Βιογένεση και ωρίμανση των WPBs	11
1.2.5 Ενεργοποιητές και αναστολείς της έκκρισης των WPBs.....	18
1.3 Μοριακός μηχανισμός κυστιδιακής μεταφοράς.....	19
1.3.1 Βασικές αρχές που διέπουν τη δημιουργία, μετακίνηση και σύντηξη των ενδοκυτταρικών οργανιδίων.....	20
1.3.2 Σκοπός της κυστιδιακής μεταφοράς: η ακριβής ροή του φορτίου. Πώς αυτή επιτυγχάνεται.....	22
1.4 Rab GTPάσες	22
1.4.1 Rab GTPάσες: Κατάταξη-Δομή.....	22
1.4.2 Η μηχανιστική βάση της ανακύκλωσης των Rab πρωτεϊνών μεταξύ μεμβρανικών διαμερισμάτων	27
1.4.3 Λειτουργίες των Rab πρωτεϊνών.....	28
1.4.4 Οι Rabs ως οριστές της ταυτότητας των διαφόρων μεμβρανικών διαμερισμάτων ...	32
1.5 Rabs των εκκριτικών κυστιδίων.....	35
1.6 Rab27	38
1.6.1 Πολλαπλοί τελεστές της Rab27	39
1.6.2 Λειτουργίες των τελεστών της Rab27.....	40
1.7 Μηχανισμοί έκκρισης των WPBs	43
1.8 Σκοπός της εργασίας	45
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1. Υλικά.....	47
2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας και χειρισμού κυττάρων	47
2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	47
2.2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου.....	48
2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA και siRNA	49
2.2.4 Ενεργοποίηση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προς έκκριση του vWF.....	50
2.3 Μοριακές μέθοδοι	50
2.3.1 Απομόνωση RNA –Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητάς του.....	50
2.3.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης qRT- PCR	51
2.3.3. Κατασκευές DNA	55
2.3.4.α. Κατασκευή και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών	55
2.3.4.β. Τιτλοποίηση ιών και συνθήκες μόλυνσης κυττάρων	56
2.3.5 Τεχνική διπλού υβριδίου σε κύτταρα ζύμης.....	57
2.4 Παρασκευαστικές Μέθοδοι.....	58
2.4.1 Παρασκευή κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού εκχυλίσματος από ανθρώπινο πλακούντα	58
2.4.2 Προετοιμασία των κολώνων χρωματογραφίας συγγένειας της Rab27a.....	59

2.4.3 Έκφραση και απομόνωση της SHD περιοχής της πρωτεΐνης Slac-2b	60
2.5 Βιοχημικές μέθοδοι	61
2.5.1. Προσπάθεια απομόνωσης τελεστών της Rab27a μέσω χρωματογραφίας συγγένειας	61
2.5.2 Δοκιμασία, <i>in vivo</i> , ανοσοκατακρύμνιση	62
2.5.3. ELISA	62
2.5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	63
2.5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	64
2.5.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting).....	64
2.6 Μορφολογικές μέθοδοι.....	65
2.6.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	65
2.6.2 Συνεστιακή μικροσκοπία.....	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
3.1 Ταυτοποίηση των Rab GTPασών που εντοπίζονται στα WPBs	67
3.2 Οι Rab-27, -3, -15, -33 και -37 εντοπίζονται στα ίδια WPBs	81
3.3 Οι Rab-27a/b, -3a/b/d, -15, -33a/b και -37 εκφράζονται στα κύτταρα HUVE	83
3.4 Οι Rab27a, 3a, 3d και 15 ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs.....	86
3.5 Ενορχηστρωμένη δράση των Rab27a, 3 και 15 απαιτείται για την έκκριση των WPBs	92
3.6 Η Munc13-4 ρυθμίζει την έκκριση των WPBs	95
3.7 Η Munc13-4 αλληλεπιδρά με τη Rab15.....	100
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	103
Σ.1 Υπερέκφραση της Rab27a αυξάνει την επαγόμενη έκκριση των WPBs.....	103
Σ.2 Ο ρόλος της Rab27a στην έκκριση των WPBs είναι ανεξάρτητος του ενεργοποιητή	106
Σ.3 Προσπάθεια καταβύθισης πρωτεϊνών-τελεστών της Rab27a από ανθρώπινο πλακούντα, μετά από επώαση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-Rab27a.....	107
Σ.4 Στοιχίση των αλληλουχιών εκκριτικών και ενδοσωμικών Rabs	109
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
Περίληψη.....	123
Summary.....	125
Βιβλιογραφία	127

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ενδοθήλιο

Το ενδοθήλιο είναι μία μονήρης στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια όλων των αιμοφόρων αγγείων. Το βάρος του στο μέσο ενήλικα είναι 1 kg και αποτελείται από περίπου 10^{13} κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των επιθηλιακών κυττάρων και προέρχονται από τη διαφοροποίηση πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, των αιμαγγειοβλαστών (Sumpio et al., 2002). Πρόκειται για πεπλατυσμένα πολυγωνικά κύτταρα, με μήκος 25-50 μm και πλάτος 10-15 μm , που διατάσσονται παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα του αγγείου και περιβάλλονται από αραιό συνδετικό ιστό (Nico et al., 2007). Από τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι ο πολύ αργός μεταβολικός ρυθμός που παρουσιάζουν *in vivo* (Cines et al., 1998), η αναστολή του πολλαπλασιασμού τους όταν έρθουν σε επαφή (Schwartz et al., 1990) και η πόλωση, βάση της οποίας η κυτταροπλασματική τους μεμβράνη χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές: την κορυφαία, η οποία βρίσκεται προς τον αυλό των αγγείων, τη βασική, η οποία βρίσκεται προς τους ιστούς, και τη βασηοπλευρική, με την οποία σχηματίζουν συνδέσεις με γειτονικά κύτταρα (Tsukita et al., 2001). Η δομική αυτή πόλωση αντανακλά την πολικότητα και σε επίπεδο λειτουργιών.

Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη πως το ενδοθήλιο έχει ως βασική λειτουργία τη ρύθμιση της διαπερατότητας του αγγειακού τείχους. Τα πειράματα του Starling, το 1896, εξυπηρέτησαν την ισχυροποίηση της άποψης ότι το ενδοθήλιο είναι ένας επιλεκτικός, αλλά στατικός φυσικός φραγμός (Starling, 1896). Χρειάστηκαν οι μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του ενδοθηλίου από τον Palade το 1953, καθώς επίσης και οι μελέτες φυσιολογίας του Gowans (Gowans, 1959), που περιέγραψαν την αλληλεπίδραση μεταξύ λεμφοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων, για να οδηγηθούμε πλέον σήμερα στην αναγνώριση του ενδοθηλίου ως ένα δυναμικό, ετερογενές και διάσπαρτο όργανο, με ζωτικές εκκριτικές, συνθετικές, μεταβολικές και ανοσολογικές λειτουργίες (Cines et al., 1998).

1.1.1 Λειτουργίες του ενδοθηλίου

Η ρύθμιση της ροής θρεπτικών συστατικών, βιολογικά ενεργών μακρομορίων και κυττάρων του αίματος, διαμέσου των αγγείων, αποτελεί βασική λειτουργία του ενδοθηλίου. Ο ρυθμιστικός αυτός ρόλος επιτελείται μέσω της παρουσίας μεμβρανικών

υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα για μεγάλο αριθμό μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών (π.χ. αυξητικοί παράγοντες, θρομβωτικές και αντιθρομβωτικές πρωτεΐνες), μορίων μεταφοράς λιπιδίων, μεταβολιτών (π.χ. μονοξειδίο του αζώτου, σεροτονίνη) και ορμονών (π.χ. ενδοθηλίνη-1). Ρόλο στην εκλεκτική διαπερατότητα του ενδοθηλίου διαδραματίζουν επίσης πρωτεΐνες των κυτταρικών συνδέσεων (tight junctions) και τα caveolae, εγκοιλώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με ρόλο στην κυστιδιακή μετακίνηση που διαμεσολαβούν τη διακυττάρωση μορίων.

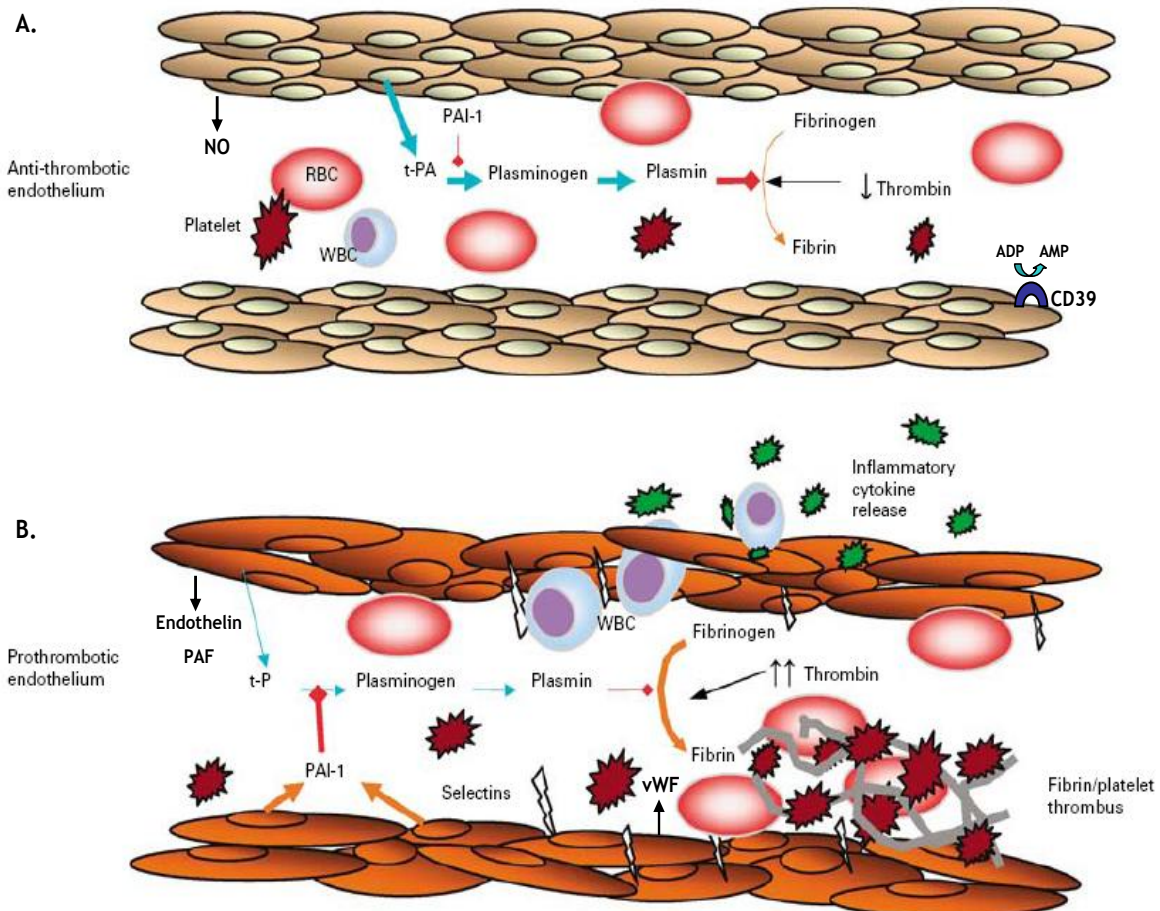
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλουν, επίσης, στη **ρύθμιση της πίεσης και της ροής του αίματος**, εκκρίνοντας αγγειοδιασταλτικούς (μονοξειδίο του αζώτου, προστακυκλίνη) και αγγειοσυσταλτικούς παράγοντες (ενδοθηλίνη, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων – plasminogen activator factor, PAF). Το μονοξειδίο του αζώτου εκκρίνεται ιδιοστατικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά η παραγωγή του ρυθμίζεται από έναν αριθμό εξωγενών χημικών και φυσικών ερεθισμάτων, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες συντίθενται ως απόκριση σε αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος.

Ένας από τους βασικούς ρόλους των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι να διευκολύνουν τη ροή του αίματος, **παρέχοντας μία αντιθρομβωτική επιφάνεια** που εμποδίζει την προσκόλληση αιμοπεταλίων και την εμβολή. Όταν όμως το ενδοθήλιο διαταράσσεται, από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες, τα κύτταρα υπόκεινται βιοχημικές αλλαγές που κορυφώνονται με τη **μετατροπή του ενδοθηλίου σε μία προθρομβωτική επιφάνεια** (Εικόνα 1.1). Μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων υπάρχει μία δυναμική ισορροπία που ρυθμίζεται τόσο σε επίπεδο μεταγραφής γονιδίων όσο και σε επίπεδο ολόκληρου κυττάρου και που συχνά επιτρέπει στο τραυματισμένο ενδοθήλιο να επιστρέψει στην προηγούμενη κατάσταση (Cines et al., 1998; Galley and Webster, 2004; Pearson, 1999).

Στους βασικούς αντιθρομβωτικούς μηχανισμούς του ενδοθηλίου ανήκει ο έλεγχος της παραγωγής θρομβίνης, αφού η πρωτεάση αυτή συμμετέχει στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς επίσης και αρκετών ενζύμων και συμπαραγόντων της πήξης. Επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση της θρομβομοδουλίνης (thrombomodulin, TM) και του αναστολέα του μονοπατιού του ιστικού παράγοντα (tissue factor pathway inhibitor, TFPI). Επιπλέον, ο εντοπισμός στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων της έκτο-ADPάσης CD39 αναστέλλει την ADP-επαγόμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων (Marcus et al., 2003). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα **συμμετέχουν επίσης στην ινωδόλυση**, μέσω της

παραγωγής και έκκρισης του ιστικού πλασμινογόνου παράγοντα (tissue plasminogen activator, t-PA).

Από την άλλη, το κρίσιμο βήμα στη μετατροπή της επιφάνειας του ενδοθηλίου σε προθρομβωτική είναι η επαγωγή του ιστικού παράγοντα (tissue factor-TF). Ο παράγοντας αυτός είναι υποδοχέας του παράγοντα VIIa, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τους παράγοντες X και IX του καταρράκτη της πήξης. Ο ιστικός παράγοντας δεν εκφράζεται από το εν ηρεμία ενδοθήλιο, τουλάχιστον στον ενήλικα οργανισμό. Μετά από διαταραχή, όμως, εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, επάγοντας την παραγωγή θρομβίνης. Αυτή με τη σειρά της, ενεργοποιεί τον αναστολέα ινωδόλυσης (thrombin activable fibrinolysis inhibitor, TAFI), την έκκριση του προθρομβωτικού παράγοντα von Willebrand (von Willebrand factor, vWF), του αναστολέα-1 του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) και την έκφραση σελεκτινών και άλλων μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (Bunte et al., 2008).



Εικόνα 1.1: Διαγραμματική απεικόνιση της μετάβασης της επιφάνειας του ενδοθηλίου από αντιθρομβωτική σε προθρομβωτική. (Α) Στο εν ηρεμία ενδοθήλιο, η έκκριση NO ως αγγειοδιασταλτικού παράγοντα, η ρύθμιση του σχηματισμού ινώδους και η αντιθρομβωτική δράση του CD39 επιτρέπουν την ομαλή ροή των κυττάρων του αίματος. (Β) Μετά από διαταραχή, η παραγωγή θρομβίνης αυξάνεται, με επακόλουθο το σχηματισμό ινώδους, την έκκριση του vWF και αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, καθώς επίσης και την έκφραση σελεκτινών στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, μεταβολές που οδηγούν στη θρόμβωση και στη φλεγμονή.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα **συμμετέχουν επίσης σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις**, ρυθμίζοντας τη μετακίνηση λεμφοκυττάρων και λευκοκυττάρων στους ιστούς. Οι λειτουργίες αυτές διαμεσολαβούνται μέσω υποδοχέων της οικογένειας των σελεκτινών (L-selectin και P-selectin αντίστοιχα) και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (ICAM, VCAM), που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Σημαντικός είναι, τέλος, ο **ρόλος του ενδοθηλίου στις διαδικασίες της αγγειογένεσης και της αγγειοποίησης**. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) και ο ειδικός των ενδοθηλιακών κυττάρων υποδοχέας του, VEGFR2, συμμετέχουν και στις δύο παραπάνω διαδικασίες, ενώ οι αγγειοποιητίνες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα παίζουν, επίσης, ρόλο στην αγγειογένεση.

1.1.2 Δύο μηχανισμοί προσαρμογής του ενδοθηλίου με σημαντική διαφορά στο χρόνο απόκρισης: βραδύς και βραχύς

Από τις παραπάνω λειτουργίες, γίνεται σαφής ο κρίσιμος ρόλος που διαδραματίζει το ενδοθήλιο στη γενικότερη ομοιοστασία του οργανισμού. Ο Ary Goldberger έχει επιχειρηματολογήσει υπέρ της άποψης ότι η υγεία σχετίζεται με την οργανωμένη πολυπλοκότητα και η ασθένεια με την απώλεια της μεταβλητότητας (Goldberger et al., 2002). Μία μη ελεγχόμενη ενδοθηλιακή απόκριση μπορεί να οδηγήσει σε αθηροσκλήρωση, υπέρταση, πνευμονική υπέρταση, σηψαιμία και φλεγμονώδη σύνδρομα (Cines et al., 1998; Galley and Webster, 2004).

Για την αποτροπή, λοιπόν, των παραπάνω καταστάσεων, το ενδοθήλιο πρέπει να προσαρμόζεται σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Η προσαρμογή σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις γίνεται με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος, περιλαμβάνει ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μία διαδικασία που απαιτεί αρκετές ώρες μέχρι να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή/μετάφραση και μεταφορά της πρωτεΐνης στο εξωτερικό ή στην επιφάνεια του κυττάρου. Ο δεύτερος, πραγματοποιείται με

κινητοποίηση ενός μεγάλου αριθμού βιομορίων, τα οποία βρίσκονται ήδη αποθηκευμένα στο εσωτερικό των κυττάρων, σε κατάλληλα μεμβρανικά οργανίδια, και τα οποία εκκρίνονται μετά από κατάλληλη ενεργοποίηση. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί προσαρμογής, βραδύς και βραχύς, δεν είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά αποτελούν γενικούς μηχανισμούς ρύθμισης.

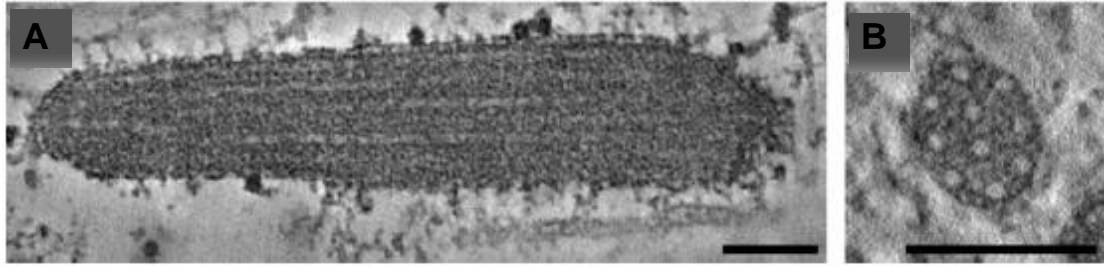
1.2 Weibel-Palade bodies (WPBs)

1.2.1 Μορφολογία – Κατάταξη των WPBs

Από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα των ενδοθηλιακών κυττάρων, που αποθηκεύουν βιομόρια με σκοπό την έκκρισή τους μετά από κατάλληλο ερέθισμα, είναι τα Weibel-Palade bodies (WPBs). Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1964 από τους Ewald R. Weibel και George E. Palade (Weibel and Palade, 1964). Πρόκειται για επιμήκη οργανίδια που φτάνουν τα 3 μm σε μήκος και τα 0,1 μm σε πλάτος. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρούνται εσωτερικές ραβδώσεις, που διατρέχουν παράλληλα τον επιμήκη άξονά τους, και που, σε εγκάρσια διατομή, αποκαλύπτονται ως σωλήνες (Εικόνα 1.2). Οι σωλήνες αυτοί συγκροτούνται από το κυρίαρχο φορτίο των WPBs, τον παράγοντα von Willebrand (vWF).

Τα WPBs απαντώνται αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο αριθμός τους, όμως, στα ενδοθηλιακά κύτταρα ποικίλει ανάλογα με τον αγγειακό τύπο, με τις φλέβες να έχουν περισσότερα από τις αρτηρίες (Cines et al., 1998).

Όπως τα κλασικά εκκριτικά κυστίδια των ενδοκρινών και νευροενδοκρινών κυττάρων, έτσι και τα WPBs σχηματίζονται στο δίκτυο trans-Golgi (TGN) και υπόκεινται μία διαδικασία ωρίμανσης, πριν αρχίσουν να συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα, περιμένοντας το κατάλληλο ερέθισμα για να εκκριθούν. Η παρουσία, όμως, σε αυτά της πρωτεΐνης των όψιμων ενδοσωμάτων/λυσωσωμάτων, CD63, καθώς επίσης και ο ρόλος που παίζει η πρωτεΐνη-προσαρμοστής AP3 (πρωτεΐνη που συμμετέχει στη στόχευση πρωτεϊνών από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα) στη μεταφορά μορίων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των WPBs, έχει οδηγήσει στην άποψη ότι πρέπει να χαρακτηριστούν ως λυσοσωμικά-σχετιζόμενα οργανίδια και όχι ως κλασικά εκκριτικά κυστίδια (Blott and Griffiths, 2002; Raposo et al., 2007).



Εικόνα 1.2: Εικόνες ηλεκτρονικής τομογραφίας ενός WPB. (Α) Σε διαμήκη διατομή παρατηρείται το επίμηκες σχήμα του οργανιδίου και οι εσωτερικές ραβδώσεις. (Β) Η σωληνοειδής φύση των ραβδώσεων αυτών γίνεται εμφανής στην εγκάρσια διατομή του οργανιδίου. (scale bars=100nm) (Valentijn et al., 2008).

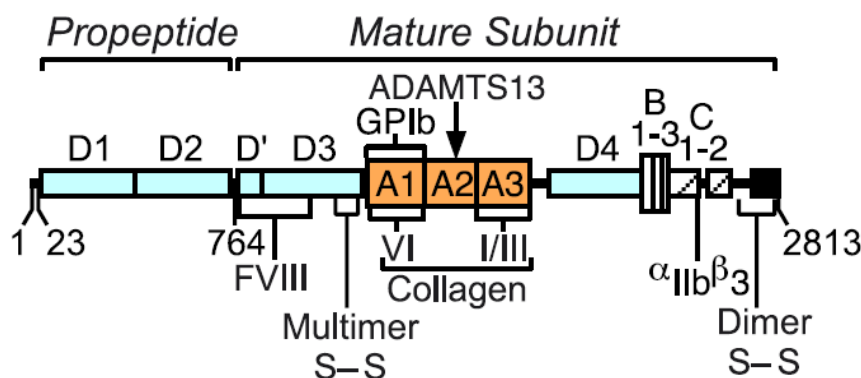
1.2.2 Κυρίαρχο φορτίο των WPBs η πρωτεΐνη vWF: βιολογική δράση

Η πρώτη περιγραφή του κυρίαρχου φορτίου των WPBs έγινε το 1926, όταν ο Φιλανδός γιατρός Erik von Willebrand περιέγραψε μία κληρονομική αιμορραγική διαταραχή, διακριτή από την αιμοφιλία Α. Χρειάστηκαν, όμως, τριάντα χρόνια για να αναγνωριστεί η πρωτεΐνη του πλάσματος, υπεύθυνη για τη διαταραχή αυτή, που ονομάστηκε παράγοντας von Willebrand (vWF).

Πρόκειται για μία πολυμερή γλυκοπρωτεΐνη απαραίτητη για την συγκέντρωση και πρόσφυση των αιμοπεταλίων σε σημεία αγγειακής διαταραχής, καθώς και για την προστασία του συνενζύμου πήξης VIII (FVIII) από πρωτεολυτική αποικοδόμηση στο πλάσμα. Όταν ο παράγοντας VIII δεν είναι δεσμευμένος στον vWF, ο χρόνος ημιζώης του στο πλάσμα μειώνεται από 12 σε 1-2 ώρες.

Το 95% της αλληλουχίας του vWF αποτελείται από επαναλαμβανόμενες περιοχές ή μοτίβα (D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK), για τις περισσότερες από τις οποίες είναι ήδη γνωστές οι αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν (Εικόνα 1.3) (Sadler, 1998). Στα σημεία της αγγειακής διαταραχής, λοιπόν, ο εκκρινόμενος vWF προσδέεται στις ίνες κολλαγόνου μέσω της A3 περιοχής του. Η πρόσδεση αυτή, σε συνδυασμό με τις ισχυρές δυνάμεις που ασκούνται στον ακινητοποιημένο vWF από τη ροή του αίματος, επάγει την έκθεση της A1 περιοχής του, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση με τη γλυκοπρωτεΐνη GPIb των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια, στη συνέχεια, προσφύονται στον υποενδοθηλιακό χώρο, μέσω των υποδοχέων κολλαγόνου που διαθέτουν, και αρχίζει η συσσώρευσή τους. Στην τελευταία αυτή διαδικασία συμμετέχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και της C1 περιοχής του vWF (Εικόνα 1.4).

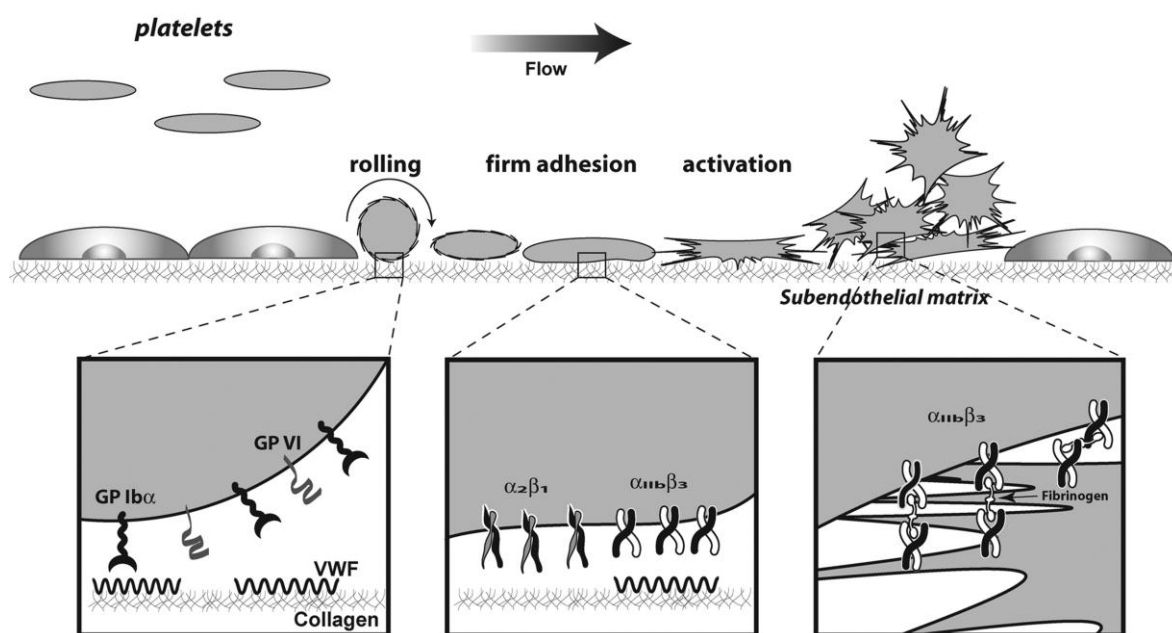
Η βιοσύνθεση του vWF περιορίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα και είναι περίπλοκη, περιλαμβάνοντας εκτεταμένη μετά-μεταφραστική τροποποίηση και πολυμερισμό. Ο vWF των ενδοθηλιακών κυττάρων εκκρίνεται στο αίμα και τον υποενδοθηλιακό χώρο, είτε ιδιοστατικά είτε ρυθμιζόμενα, μετά από ενεργοποίηση της έκκρισης των WPBs, στα οποία είναι αποθηκευμένος. Η ιδιοστατική έκκριση διατηρεί τη συγκέντρωση vWF στο πλάσμα στις φυσιολογικές τιμές, ενώ η μορφή που ελευθερώνεται ρυθμιζόμενα είναι υψηλού βαθμού πολυμερισμού και βιοδραστικότητας. Από την άλλη, στα μεγακαρυοκύτταρα, μετά τη βιοσύνθεσή του, αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και εκκρίνεται μόνο κατόπιν ερεθίσματος.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών του vWF, καθώς επίσης και των θέσεων πρόσδεσης των φυσιολογικών προσδετών του. Αναπαρίστανται, επίσης, οι θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών για το σχηματισμό διμερών και πολυμερών, η θέση 764, όπου η φουρίνη πέπτει το μόριο για το σχηματισμό του προπεπτιδίου και της ώριμης υπομονάδας, καθώς και η περιοχή A2, όπου η ADAMTS13 πέπτει εξωκυτταρικά τα πολυμερή, για το σχηματισμό vWF στο μοριακό βάρος που συνήθως απαντάται στο πλάσμα (R.H. Huang et al., 2008).

Ανεξάρτητα, όμως, από την κυτταρική του πηγή, η δραστηριότητά του εξαρτάται από την έκταση του πολυμερισμού. Η τοπική έκκριση πολύ μεγάλων πολυμερών του vWF, από τα WPBs ή τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, στην κυκλοφορία του αίματος είναι θρομβογενετική. Η δραστηριότητά του, όμως, στην κυκλοφορία είναι μία αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία. Στο μηχανισμό ελέγχου, σημαντικό ρόλο παίζει η μεταλλοπρωτεάση του πλάσματος ADAMTS13, η οποία πέπτει τα πολύ μεγάλα πολυμερή, αμέσως μετά την έκκρισή τους, σε μικρότερα (Sadler, 2008). Ο χρόνος ημιζωής του vWF στην κυκλοφορία του αίματος είναι 8-12 ώρες, ενώ για την απομάκρυνση του συμπλόκου vWF/FVIII έχει προταθεί ότι παίζουν ρόλο τα μακροφάγα, τόσο στο ήπαρ, όσο και στον σπλήνα (De Meyer et al., 2009).

Η σημασία του vWF για την αιμόσταση γίνεται εμφανής από τις σοβαρές αιμορραγίες που λαμβάνουν χώρα όταν αυτός απουσιάζει εντελώς (νόσος του vWF τύπου III, μία ομόζυγη διαταραχή της σύνθεσης του vWF, που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου του). Οι νόσοι του vWF I και II εκδηλώνονται, επίσης, με αιμορραγίες από το δέρμα και τους βλεννογόνους, αν και η ένταση των αιμορραγιών ποικίλει και είναι γενικά ηπιότερη, λόγω της παρουσίας διαφορετικών ποσοτήτων λειτουργικού vWF στο πλάσμα και στην υποενδοθηλιακή θεμέλια ουσία (Sadler, 2005).



Εικόνα 1.4: Ο ρόλος του vWF στην επαγωγή θρόμβωσης και αθηρώματος. Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσφύονται αρχικά στον υποενδοθηλιακό χώρο, μέσω αλληλεπίδρασης της γλυκοπρωτεΐνης τους GPIbα και του εκκρινόμενου και ακινητοποιημένου στο κολλαγόνο vWF. Η πρόσδεση αυτή είναι προσωρινή επιτρέποντας τη συνεχή κίνηση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Η σταθερή πρόσδεσή τους πραγματοποιείται μέσω της ιντεγκρίνης τους $\alpha_{IIb}\beta_3$ και του vWF, καθώς επίσης και της $\alpha_2\beta_1$ και του κολλαγόνου, ενώ η ενεργοποίησή τους οδηγεί στη συσσώρευσή τους. Τα συσσωρευμένα αιμοπετάλια συγκρατούνται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των $\alpha_{IIb}\beta_3$ ιντεγκρινών τους και του ινωδογόνου (J. Chen et al., 2005).

1.2.3 Βιογένεση και ωρίμανση των WPBs

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, κυρίαρχη πρωτεΐνη των WPBs είναι ο vWF. Ο παράγοντας αυτός, πέρα από την εξαιρετική σημασία που έχει στον εξωκυτταρικό χώρο για τη φυσιολογία των αγγείων, παίζει πολύ σημαντικό ενδοκυτταρικό ρόλο στο σχηματισμό των WPBs. Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη και για την ίδια τη δημιουργία των WPBs, όπως καταδεικνύεται από συστήματα ετερόλογης έκφρασης του vWF, όπου φαίνεται πως η υπερέκφραση του vWF σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ψευδό-WPBs, όμοιων με αυτά των ενδοθηλιακών κυττάρων (Blagoveshchenskaya et al., 2002; Wagner et al., 1991). Για να γίνει, όμως, σαφής ο ρόλος αυτός πρέπει να δούμε διεξοδικά το μονοπάτι σύνθεσης και μεταφοράς του vWF.

Διμερισμός στο ενδοπλασματικό δίκτυο:

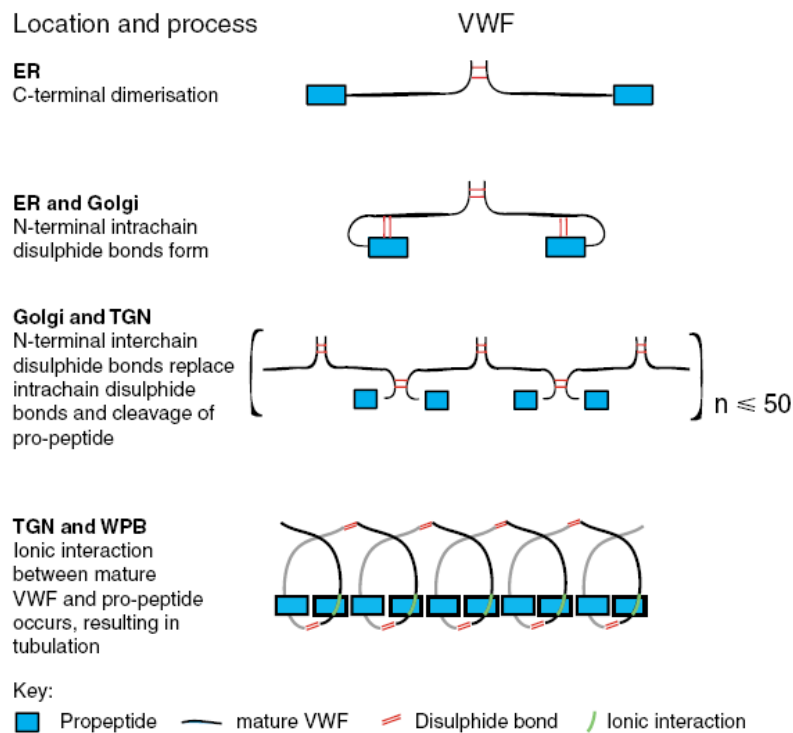
Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω του εκκριτικού μονοπατιού, μεταφράζονται σε ριβοσώματα που εντοπίζονται στην επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου. Συμμεταφραστικά, μετατοπίζονται στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου, μία διαδικασία που κατευθύνεται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το μονομερές του vWF περιλαμβάνει μία τέτοια σηματοδοτική αλληλουχία (22 καταλοίπων), το προπεπτίδιο (741 κατάλοιπα) και την ώριμη πρωτεΐνη (2050 κατάλοιπα) (Εικόνα 1.3). Ακολουθώντας τη μετατόπιση μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόπτεται, ομάδες σακχάρων προστίθενται και η πρωτεΐνη διμερίζεται, μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνών της καρβοξυτελικής περιοχής. Η ορθά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη μεταφέρεται κατόπιν, με κυστίδια καλυμμένα με την πρωτεΐνη του καλύμματος COP II, στη συσκευή Golgi.

Πολυμερισμός και σωληνοειδής διαμόρφωση στο δίκτυο trans-Golgi (TGN):

Στη συσκευή Golgi το διμερές υφίσταται τροποποίηση της γλυκοζυλίωσης και μεταφέρεται κυστιδιακά στο TGN, όπου συμβαίνουν οι τελικές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτές περιλαμβάνουν ολιγομερισμό (μέσω δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνών στην αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης – D3 περιοχή) και πρωτεολυτική σχάση του μορίου, από την πρωτεάση φουρίνη, για την παραγωγή του προπεπτιδίου και του ώριμου vWF (de Wit and van Mourik, 2001; Hannah et al., 2002; Michaux and Cutler, 2004; Sadler, 2009; van Mourik et al., 2002).

Κατά τη διάρκεια αυτών των γεγονότων, το προπεπτίδιο θεωρείται πως λειτουργεί ως συνοδός πρωτεΐνη, μέσα σε μία εξαρτώμενη από χαμηλό pH οξειδοαναγωγική αντίδραση, που επάγει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι αντιδράσεις αυτές πολυμερισμού οδηγούν στο σχηματισμό πολύ μεγάλων μορίων, μέχρι 20MDa σε μέγεθος. Μετά τη διάσπαση από τη φουρίνη, το προπεπτίδιο συνεχίζει να συμμετέχει σε μία pH-εξαρτώμενη αλληλεπίδραση με τις D'-D3 περιοχές της ώριμης πρωτεΐνης και είναι απαραίτητο για την τελική αναδίπλωση των πολυμερών σε δομές που, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μοιάζουν με σωληνάρια (Michaux et al., 2006a).

Το ελεύθερο προπεπτίδιο μπορεί να βρεθεί ως διμερές. Αυτό, σε συνδυασμό με την παραπάνω παρατήρηση, επιτρέπει την υπόθεση πως το διμερές μπορεί να επιβάλει το σχηματισμό θηλιάς μεταξύ γειτονικών αμινο-τελικών περιοχών (D'-D3) μέσα στο πολυμερές και να οδηγήσει σε μία σπειραμένη δομή που μοιάζει με σωληνάριο (Εικόνα 1.5). Η σωληνοειδής αναδίπλωση επιτρέπει στο vWF να συμπιέζεται 100 φορές περίπου χωρίς αυτή την ιδιότητα, η ενδοκυττάρια αποθήκευσή του θα ήταν αδύνατη (Metcalf et al., 2008). Το πρώτο στάδιο, λοιπόν, στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του vWF, στο οποίο παρατηρείται σχηματισμός σωληνίων, είναι το TGN (Εικόνα 1.6A) (Zenner et al., 2007).



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση των σημαντικότερων γεγονότων που συμβαίνουν κατά το σχηματισμό των πολυμερών και σωληνίων του vWF, καθώς επίσης και τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα στα οποία αυτά πραγματοποιούνται (Metcalf et al., 2008).

Διαλογή στο επίπεδο του TGN- Σχηματισμός ανώριμου κυστιδίου:

Είναι σε αυτό το διαμέρισμα, στο TGN, που συμβαίνει η διαλογή του φορτίου και σχηματίζεται το κυστίδιο που θα το μεταφέρει. Δύο υποθέσεις έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν το σχηματισμό εκκριτικών κυστιδίων. Η πρώτη εστιάζεται στην ειδική συσσώρευση αποθηκευμένων συστατικών στο TGN που οδηγεί στην ειδική κατακράτησή τους στο νεοσχηματιζόμενο κυστίδιο. Η δεύτερη επικαλείται υποδοχείς διαλογής (Arvan and Castle, 1998; Blazquez and Shennan, 2000; Thiele and Huttner, 1998). Η ικανότητα, όμως, του vWF να σχηματίζει ψευδό-WPBs, ακόμη και σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα, που λογικά στερούνται ειδικών υποδοχέων, συνηγορεί υπέρ της πρώτης υπόθεσης.

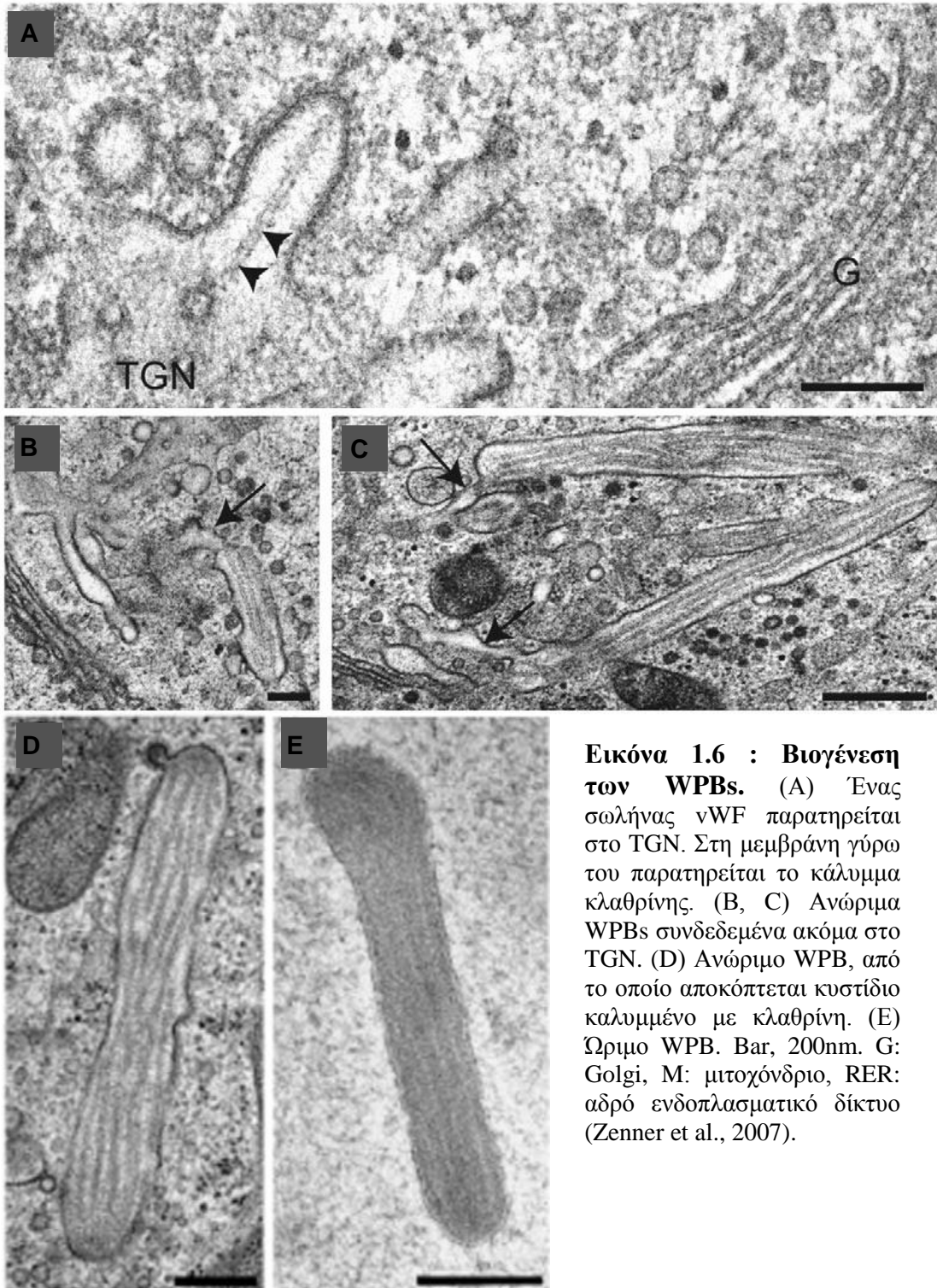
Δεν αποθηκεύονται, όμως, όλες οι μορφές του vWF στα WPBs. Πραγματοποιείται επιλεκτική αποθήκευση των μορίων που είναι περισσότερο πολυμερισμένα, ενώ οι μικρότερου μοριακού βάρους μορφές εκκρίνονται ιδιοστατικά.

Πρωτεΐνες του καλύμματος, όπως η κλαθρίνη και η πρωτεΐνη-προσαρμοστής 1 (adaptor-protein 1, AP1), συγκεντρώνονται στη μεμβράνη γύρω από το νεοσχηματιζόμενο σωλήνα (Εικόνα 1.6A) και είναι απαραίτητες για τη δημιουργία των ανώριμων κυστιδίων, όπως έχει φανεί από πειράματα αποσιώπησής τους (Lui-Roberts et al., 2005).

Ωρίμανση των WPBs:

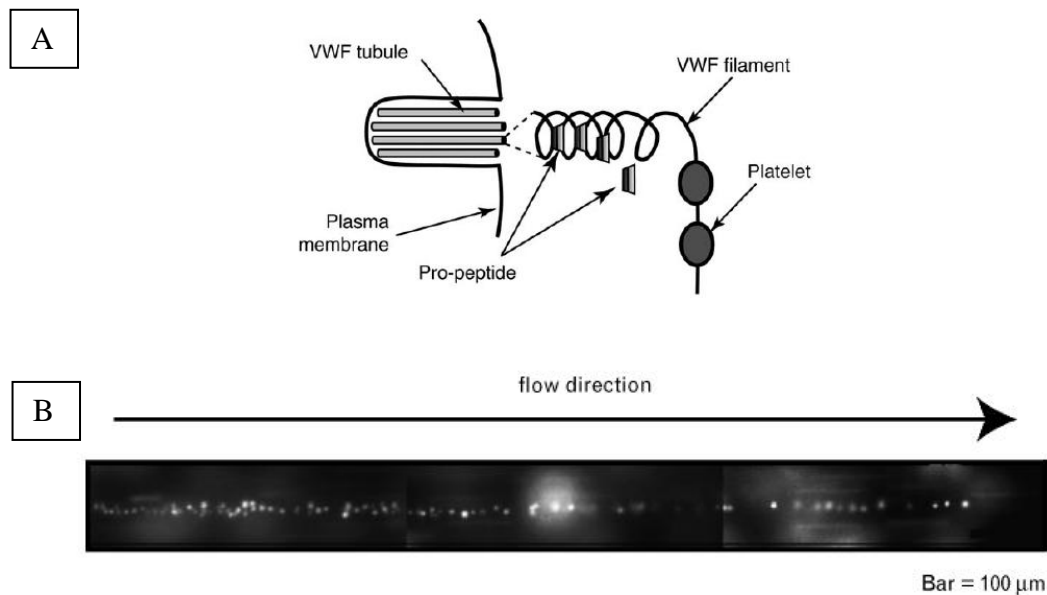
Στη συνέχεια, το νεοσχηματιζόμενο WPB υπόκειται μία διαδικασία ωρίμανσης, όπου και πάλι φαίνεται να είναι σημαντικός ο ρόλος της κλαθρίνης. Υποστηρίζεται η άποψη πως η πρωτεΐνη αυτή έχει στηρικτικό ρόλο, αλλά και ευθύνη στη δημιουργία κυστιδίων που αποκόπτονται από το WPB, απομακρύνοντας έτσι από αυτό πρωτεΐνες που δεν πρέπει να εκκριθούν και που είχαν παρασυρθεί σε αυτό μη ειδικά (Εικόνα 1.6D).

Καθώς η διαδικασία της ωρίμανσης συνεχίζεται, το κάλυμμα κλαθρίνης χάνεται και το WPB μεταφέρεται στην περιφέρεια του κυττάρου όπου έχει σημαντικά αυξημένη ηλεκτρονική πυκνότητα (Εικόνα 1.6E). Η αύξηση αυτή οφείλεται στο έντονα πυκνό πακετάρισμα των σωλήνων του vWF (Zenner et al., 2007) (Valentijn et al., 2008). Φαίνεται, λοιπόν, πως η συμπίεση και η οργάνωση του vWF είναι μία διαρκής διαδικασία που ξεκινά με τη διαμόρφωση σωλήνων και τον πολυμερισμό στο TGN, συνεχίζεται με επιπλέον πολυμερισμό στο εσωτερικό των WPBs, καταλήγοντας στη συμπίεση των σωλήνων καθώς το οργανίδιο ωριμάζει.



Η ρυθμιζόμενη έκκριση των WPBs, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (βλέπε εδάφιο 1.2.5), έχει ως επακόλουθο την απελευθέρωση του vWF στην κυκλοφορία, με τη μορφή ινών μήκους αρκετών χιλιοστών. Οι ίνες αυτές δημιουργούνται από το ξεδίπλωμα του πολυμερούς του vWF, λόγω απομάκρυνσης από τη

δομή αυτή του προπεπτιδίου, καθώς το pH στο εσωτερικό του WPB γίνεται από όξινο ουδέτερο (Εικόνα 1.7) (Michaux et al., 2006a). Στις ίνες αυτές προσδένονται αιμοπετάλια και είναι πιθανό να παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου, ενώ διασπώνται από τη μεταλλοπρωτεάση του πλάσματος ADAMTS13. Είναι πιθανό, λοιπόν, ο υψηλός βαθμός οργάνωσης στο εσωτερικό των ώριμων οργανιδίων να είναι απαραίτητος για το σχηματισμό μακριών ινών.



Εικόνα 1.7: (A) Θεωρητικό μοντέλο αναδίπλωσης των σωλήνων του vWF κατά την έκκριση. (B) Αιμοπετάλια που επικάθονται σε ίνα του vWF, σε ενεργοποιημένο με ισταμίνη ενδοθήλιο (Michaux et al., 2006a).

1.2.4 Άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν φορτίο των WPBs.

Ο vWF, όμως, δεν αποτελεί το μοναδικό φορτίο των WPBs. Ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη θρόμβωση, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση, έχει βρεθεί να εντοπίζεται, επίσης, στα οργανίδια αυτά. Από αυτές, ορισμένες στρατολογούνται στο επίπεδο του TGN, κατά το σχηματισμό του WPB, ενώ άλλες μεταφέρονται με κυστιδιακή μεταφορά στο ώριμο οργανίδιο.

Η P-selectin είναι μία 140 kDa διαμεμβρανική πρωτεΐνη της οικογένειας των σελεκτινών που εντοπίζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια. Οι σελεκτίνες εμπλέκονται στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, το πρώτο βήμα, δηλαδή, για την εξαγγείωση και μετανάστευσή τους στο σημείο της φλεγμονής. Η P-selectin είναι υπεύθυνη για την αρχική κύλιση τους κατά μήκος του αγγειακού τοιχώματος. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, εισέρχεται στο νεοσχηματιζόμενο WPB

στο επίπεδο του TGN, αλληλεπιδρώντας άμεσα με τις D'-D3 περιοχές του vWF (Michaux et al., 2006b). Η έκκριση των WPBs έχει ως επακόλουθο τη μετατόπισή της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εκεί διαμεσολαβεί την κύλιση των λευκοκυττάρων, ενώ μπορεί, επίσης, να παίζει ρόλο άγκυρας για την παραμονή της ίνας του vWF στη μεμβράνη, μετά την έκκριση (Padilla et al., 2004). Είκοσι λεπτά μετά τη μετατόπισή της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενδοκυτταρώνεται και, μέσω της συσκευής Golgi, επιστρέφει στα WPBs (Arribas and Cutler, 2000). Η P-selectin διαμεσολαβεί, επίσης, την κύλιση των αιμοπεταλίων, διαδραματίζοντας, έτσι, ρόλο στη διαδικασία της θρόμβωσης (Cambien and Wagner, 2004). Η ταυτόχρονη έκκριση του vWF και της P-selectin επάγει τη θρόμβωση με διακριτούς, αλλά συμπληρωματικούς, μηχανισμούς.

Εκτός από την P-selectin, τα φορτία αγγειοποιητίνη 2, εοταξίνη 3 και οστεοπροτεγερίνη, στρατολογούνται, επίσης, στα WPBs, στο επίπεδο της συσκευής Golgi. Ακολούθως, τα οργανίδια ωριμάζουν, χάνοντας την κλαθρίνη, αποκτώντας όμως πρωτεΐνες, όπως η λυσοσωμική CD63 και οι GTPάσες Rab27a και Rab3d. Οι τελευταίες δεν αποτελούν φορτίο των WPBs. Είναι ρυθμιστές της κυστιδιακής μεταφοράς και αναλύονται σε επόμενα εδάφια.

Στο φορτίο των WPBs ανήκουν επίσης οι πρωτεΐνες ιντερλευκίνη 8, ενδοθηλίνη 1, το ένζυμο μετατροπής της ενδοθηλίνης, ο παράγοντας t-PA (αν και υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές), η α 1, 3- fucosyltransferase VI και το πεπτίδιο σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης (Metcalf et al., 2008). Η βιολογική δράση των πρωτεϊνών αυτών αναφέρεται συνοπτικά στον Πίνακα 1.1.

Φαίνεται, λοιπόν, τα οργανίδια αυτά να περιέχουν τόσο ινωδολυτικά όσο και προθρομβωτικά φορτία, αγγείο -διασταλτικά και -συσταλτικά μόρια, τα οποία και εκκρίνουν στον περιβάλλοντα χώρο, τόσο ως απόκριση σε προαγγειογόνα όσο και σε προθρομβωτικά ερεθίσματα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει είτε τη δημιουργία WPBs με συγκεκριμένο φορτίο και την ειδική έκκρισή τους, είτε την ύπαρξη μηχανισμών που εξισορροπούν τα ακατάλληλα φορτία. Πράγματι, ορισμένες μελέτες έδειξαν διαχωρισμό ορισμένων φορτίων σε υποπληθυσμούς WPBs. Οι ιντερλευκίνη 8 και εοταξίνη 3, που συντίθενται ως απόκριση στις ιντερλευκίνες 1α και 4 αντίστοιχα, απαντώνται σε έναν ειδικό πληθυσμό WPBs, πιθανώς αυτόν που δημιουργείται την ίδια χρονική στιγμή με τις κυτοκίνες. Ο παράγοντας t-PA εντοπίζεται σε έναν υποπληθυσμό WPBs. Η P-selectin και η αγγειοποιητίνη 2 έχει δειχτεί επίσης να βρίσκονται σε διαφορετικά WPBs (Rondaij et al., 2006).

Η θεωρία των υποπληθυσμών των WPBs, αν και μη καλά εδραιωμένη, δεν αποτελεί τη μόνη πιθανή εξήγηση της ρύθμισης της διακριτής έκκρισης των βιοδραστικών συστατικών από τα WPBs. Νεότερες μελέτες έχουν δείξει πως κατά τη διάρκεια έντονης ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, το 30% των WPBs παρουσιάζουν συμφύσεις μεταξύ τους και υπόκεινται πολύ-κοκκώδη εξωκυττάρωση (multi-granular exocytosis). Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει την έκκριση της διαλυτής πρωτεΐνης vWF, όχι όμως των μεμβρανικών P-selectin και CD63, όπως υποδηλώνει ο εντοπισμός κλαθρίνης στον πολύ-κοκκώδη αυτό σχηματισμό. Ευνοεί, έτσι, την έκκριση παραγόντων αιμόστασης, ενώ οδηγεί στην κατακράτηση φλεγμονωδών μορίων (Valentijn et al.). Αντίθετα, κάτω από συνθήκες ήπιας ενεργοποίησης, το 25% των WPBs σχηματίζει ένα πόρο σύντηξης με την κυτταρική μεμβράνη της τάξης των 10-12 nm, ο οποίος λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, αποτρέποντας την έκκριση των μεγάλων μορίων (vWF, προπεπτιδίο και P-selectin), επιτρέποντας, όμως, την έκκριση μικρών μορίων, όπως η ιντερλευκίνη-8 και η CD63. Με το μηχανισμό αυτό, ευνοούνται οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις έναντι των θρομβωτικών, κάτι που θα περίμενε κανείς από ένα ήπιο ερέθισμα (Babich et al., 2008). Συνοπτικά, λοιπόν, η έκκριση των φορτίων των WPBs ρυθμίζεται τόσο στο επίπεδο την βιογένεσης και ωρίμανσης των οργανιδίων αυτών, όσο και στον τρόπο απελευθέρωσής τους.

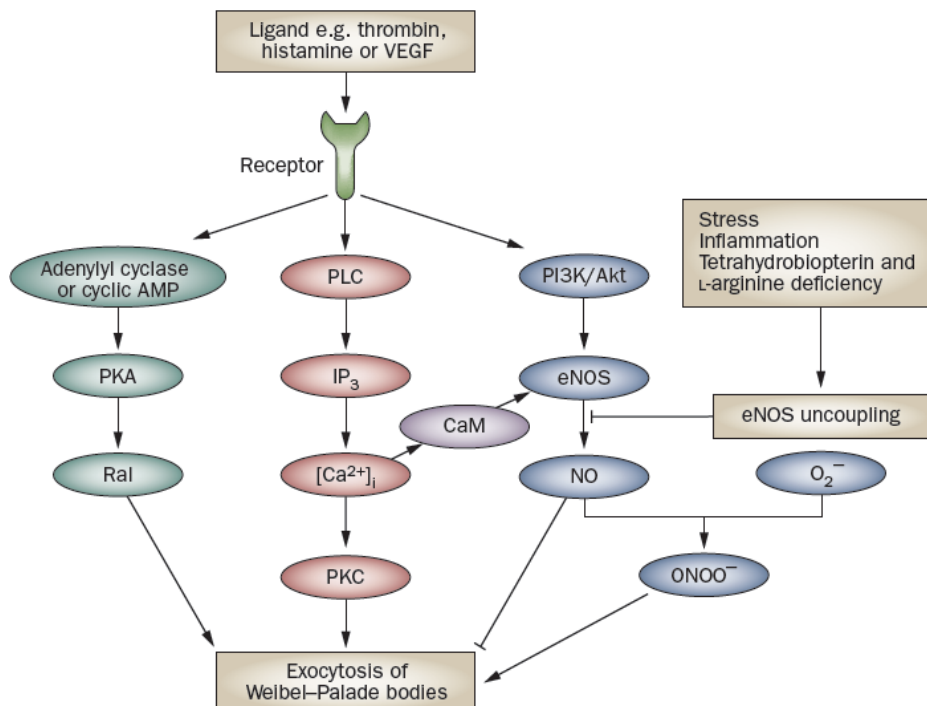
Συστατικά WPBs	Αγγειακή Λειτουργία	Μηχανισμός
vWF	Θρόμβωση	Συσσωρεύει τα αιμοπετάλια στο αγγειακό τοίχωμα.
Παράγοντας XIIIa	Θρόμβωση	Τρανσγλουταμινάση που συνδέει την Φιμπρίνη
Ιστικός Πλασμινογόνο Παράγοντας (t-PA)	Ινοδύλυση	Προένζυμο που αποικοδομεί το ινώδες
P-selectin	Φλεγμονή	Κύλιση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων
IL-8	Φλεγμονή	Ελκύει και ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα
Εοταξίνη 3	Φλεγμονή	Ανακτά και ενεργοποιεί τα ιωσινόφιλα
a 1, 3- fucosyltransferase VI	Φλεγμονή	Σύνδεση προσδετών Σελεκτίνης
CD63 (Lamp3)	Κυτταρική πρόσφυση/μετανάστευση	Αλληλεπίδραση με ινταγκρίνες
Ενδοθηλίνη 1	Αγγειοσύσπαση	Αλληλεπιδρά με τον B υποδοχέα Ενδοθηλίνης
Ένζυμο μετατροπής Ενδοθηλίνης	Αγγειοσύσπαση	Διασπά την μεγάλη Ενδοθηλίνη 1 σε Ενδοθηλίνη 1
Πεπτιδίο σχετιζόμενο με το γονίδιο της Καλσιτονίνης	Αγγειοδιαστολή	Αυξάνει την Σύνθεση NO
Αγγειοποιητίνη 2		Ευαισθητοποιεί τα

Οστεοπροτεγερίνη (OPG)	Αγγειογένεση	ενδοθηλιακά κύτταρα στον TNFα
	Φλεγμονή	Πρόσδεση λευκοκυττάρων

Πίνακας 1.1: Φορτία που απαντώνται στα WPBs, οι λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν και ο υπεύθυνος μηχανισμός.

1.2.5 Ενεργοποιητές και αναστολείς της έκκρισης των WPBs

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η έκκριση των WPBs επάγεται από μία σειρά εξωκυτταρικών σημάτων. Πραγματοποιείται δε, μέσω δύο συστημάτων δεύτερων αγγελιοφόρων σημάτων. Τα πρώτο περιλαμβάνει αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, ενεργοποίηση της καλμομοδουλίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C. Το δεύτερο είναι το μονοπάτι του κυκλικού AMP (cAMP) και περιλαμβάνει ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και την πρωτεΐνη Ral (GTPάση που έχει συνδεθεί με αναδιάταξη του κυτταροσκελετού). Και τα δύο αυτά μονοπάτια μεταβιβάζουν σήματα από προσδέτες τόσο διαφορετικούς όσο η θρομβίνη, ισταμίνη, VEGF, νουκλεοτίδια πουρίνης, ιόντα υπεροξειδίου, επινεφρίνη, βασοπρεσίνη, φωσφορική σφιγγοσίνη κ. άλ (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs (Goligorsky et al., 2009).

Σε αντίθεση με τους παραπάνω παράγοντες που ενεργοποιούν την έκκριση, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) την αναστέλλουν. Και τα δύο αυτά δραστικά μόρια επιδρούν στον παράγοντα NSF (συστατικό του μηχανισμού μεμβρανικής σύντηξης), εμποδίζοντας ουσιαστικά την αποσυγκρότηση των συμπλόκων v-SNARE και t-SNARE (πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν τη μεμβρανική σύντηξη). Έτσι, οι πρωτεΐνες αυτές δεν μπορούν να ανακυκλωθούν και να συμμετάσχουν σε νέους κύκλους σύντηξης.

Το παράδοξο είναι πως ενώ το μονοξείδιο του αζώτου αναστέλλει την έκκριση, το ασβέστιο, που την επάγει, ενεργοποιεί, επίσης, την NO συνθάση. Αντίδραση, όμως, του NO με υπεροξειδικό ανιόν παράγει περοξυνιτρώδες που επάγει την έκκριση. Φαίνεται λοιπόν πως, σε ό,τι αφορά το ρόλο του NO, καθοριστικό ρόλο παίζει ο ρυθμός σύνθεσής του. Έντονη σύνθεσή του, από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναστέλλει την έκκριση των WPBs. Όταν, όμως, ο ρυθμός σύνθεσης είναι μικρός, το βιοδιαθέσιμο NO αντιδρά με το υπεροξειδικό ανιόν, παράγονται υπεροξυνιτρώδη και η έκκριση αυξάνεται (Εικόνα 1.8) (Goligorsky et al., 2009; Lowenstein et al., 2005).

Να σημειώσουμε στο σημείο αυτό πως οι παράγοντες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο cAMP προκαλούν ισχυροποίηση του αγγειακού φραγμού και μικρότερης έκτασης έκκριση, κατά την οποία εκκρίνονται μόνο τα περιφερειακά WPBs, ενώ ένας υποπληθυσμός συγκεντρώνεται περιπυρηνικά, αποφεύγοντας να εκκριθεί. Αντίθετα, οι παράγοντες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο προκαλούν καταστροφή του αγγειακού φραγμού και εκτεταμένη έκκριση όλων των WPBs (Rondaij et al., 2006).

1.3 Μοριακός μηχανισμός κυστιδιακής μεταφοράς

Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την έκκριση των WPBs έχει μεγάλη σημασία, όχι μόνο για να κατανοήσουμε καλύτερα την οργάνωση του ενδοθηλιακού κυττάρου σε επίπεδο κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, αλλά και επειδή η γνώση αυτή δυνητικά θα επέτρεπε τον έλεγχο των λειτουργιών της πήξης του αίματος και της φλεγμονής, αλλά και της αγγειογένεσης, μέσω ρύθμισης της έκκρισης των WPBs. Για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που διέπουν την έκκριση των WPBs πρέπει προηγουμένως να λάβουμε υπ' όψη μας ότι τα μεμβρανικά αυτά οργανίδια διέπονται από τους ίδιους κανόνες που καθορίζουν τη δυναμική όλων των άλλων μεμβρανικών

οργανιδίων που υπόκεινται τις διαδικασίες της ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια, θα γίνει παρουσίαση αυτών των βασικών αρχών.

1.3.1 Βασικές αρχές που διέπουν τη δημιουργία, μετακίνηση και σύντηξη των ενδοκυτταρικών οργανιδίων

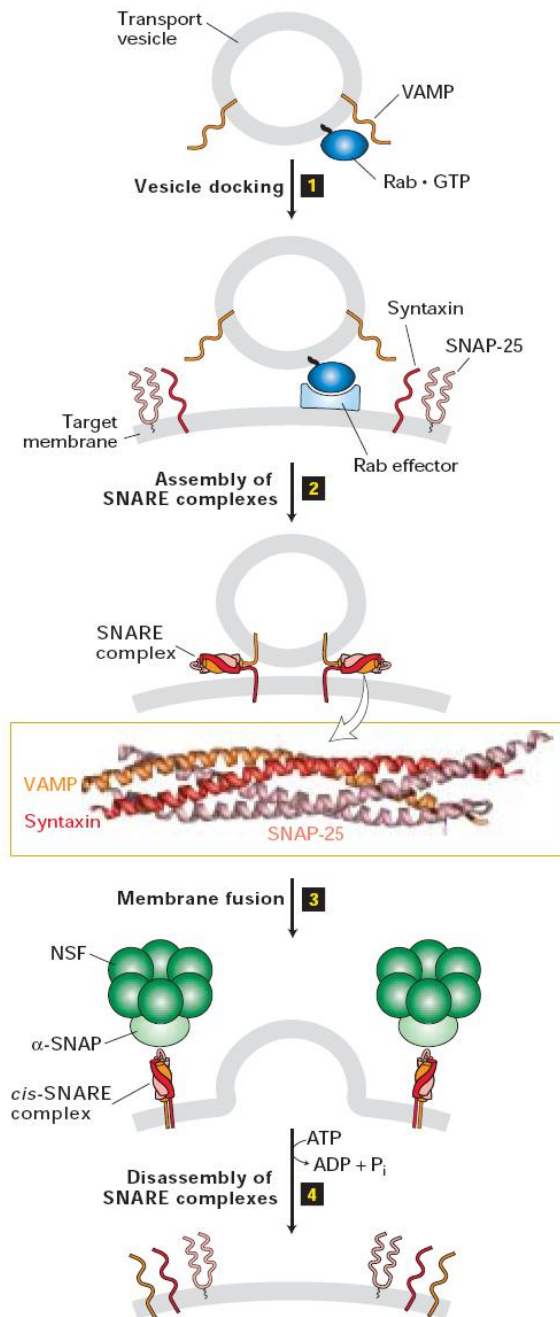
Κάθε βήμα κυστιδιακής μεταφοράς, στο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης, έχει ως στόχο τη μεταφορά συστατικών (φορτίων) από ένα μεμβρανικό οργανίδιο (δότη) προς ένα άλλο οργανίδιο (δέκτη). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με το σχηματισμό ενδιάμεσων κυστιδίων που αναλαμβάνουν τη μεταφορά των συστατικών (φορτίων). Ο μοριακός μηχανισμός κυστιδιακής μεταφοράς είναι κοινός για κάθε τύπο κυστιδίου και περιλαμβάνει τα εξής διακριτά στάδια:

1. Σχηματισμός του κυστιδίου (από τη μεμβράνη δότη)
2. Μεταφορά του προς τη μεμβράνη στόχο
3. Σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη στόχο

Η πραγματοποίηση καθενός από τα παραπάνω στάδια απαιτεί τη δράση συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών. Για το σχηματισμό του κυστιδίου απαιτείται κυρίως η δράση των πρωτεϊνών Sar1/ARF και των πρωτεϊνών του καλύμματος. Για τη μετακίνησή του απαιτούνται οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Τέλος, για τη σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη-στόχο απαιτούνται κατά κύριο λόγο οι πρωτεΐνες Rabs, SNAREs, SNAP και NSF (Εικόνα 1.9).

Κεντρικό ρόλο στην ορθή ροή του φορτίου κατέχουν οι πρωτεΐνες Rabs, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των μικρών GTPασών και συμμετέχουν στη στόχευση των κυστιδίων στην κατάλληλη μεμβράνη στόχο. Οι Rabs στρατολογούνται στη μεμβράνη του κυστιδίου και στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με τελεστές στις μεμβράνες-στόχους. Η δέσμευση της Rab-GTP σε έναν τελεστή οδηγεί στην πρόσδεση και στον ελλιμενισμό του κυστιδίου στην κατάλληλη μεμβράνη-στόχο.

Οι SNAREs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, υπεύθυνες για τη σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη στόχο. Οι v-SNAREs που βρίσκονται στη μεμβράνη του κυστιδίου, αλληλεπιδρούν με τις t-SNAREs, της μεμβράνης στόχου, σχηματίζοντας μία σφιχτή τεταρτοταγή δομή που φέρει σε πολύ στενή επαφή τις δύο μεμβράνες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η σύντηξη. Τέλος, οι NSF και SNAP επιτυγχάνουν την ανακύκλωση των SNAREs, ώστε να επιτευχθεί νέος κύκλος αντιδράσεων και σύντηξης.



Εικόνα 1.9: Μοντέλο για τον ελλιμενισμό και τη σύντηξη των μεταφερόμενων κυστιδίων με τις μεμβράνες στόχους. **Βήμα 1** Μια πρωτεΐνη Rab προσδεμένη, μέσω λιπιδικής ουράς, σε ένα εκκριτικό κυστίδιο δεσμεύεται σε ένα σύμπλοκο τελεστών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και, με αυτόν τον τρόπο, οδηγεί στον ελλιμενισμό του μεταφερόμενου κυστιδίου στην κατάλληλη μεμβράνη στόχο. **Βήμα 2** Μια v-SNARE πρωτεΐνη (στην περίπτωση αυτή η VAMP) αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή συγγενών t-SNAREs (στην περίπτωση αυτή η syntaxin και SNAP25). Το σταθερό σύμπλοκο των SNAREs που σχηματίζεται κρατά το κυστίδιο κοντά στη μεμβράνη στόχο. **Βήμα 3**: Ο σχηματισμός του συμπλόκου των SNAREs οδηγεί στη μεμβρανική σύντηξη. **Βήμα 4**: Ο NSF συζεύγνεται με την α -SNAP και προσδένεται στο σύμπλοκο των SNAREs. Η υδρόλυση ATP από τον NSF οδηγεί στη αποσυγκρότηση του συμπλόκου, ελευθερώνοντας τις SNAREs για νέο κύκλο κυστιδικής σύντηξης

1.3.2 Σκοπός της κυστιδιακής μεταφοράς: η ακριβής ροή του φορτίου. Πώς αυτή επιτυγχάνεται.

Η ειδικότητα στις διαδικασίες της κυστιδιακής μεταφοράς, πρόσδεσης και σύντηξης είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ταυτότητας των οργανιδίων και την ορθή ροή του φορτίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Η συγκρότηση, λοιπόν, και αποσυγκρότηση του καλύμματος των κυστιδίων, η σύνδεση των κατάλληλων πρωτεϊνών-κινητήρων στα κατάλληλα οργανίδια και ο σχηματισμός των κατάλληλων, χρονικά και χωροταξικά, συμπλόκων των SNAREs, αποτελούν διαδικασίες υψηλής ρύθμισης. Το κύτταρο αντιμετωπίζει την ανάγκη συντονισμού όλων αυτών των γεγονότων μέσω των πρωτεϊνών Rab και SNARE.

Τα 60 και πλέον μέλη της οικογένειας Rab εντοπίζονται σε διακριτά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και, μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεών τους με συστατικά του καλύμματος, πρωτεΐνες-κινητήρες και SNAREs (αναλυτικά βλ.1.4.3), λειτουργούν ως οργανωτές όλων σχεδόν των σταδίων μεμβρανικής μεταφοράς των ευκαρυωτικών κυττάρων (Stenmark, 2009). Ο διακριτός αυτός εντοπισμός τους συντελεί στην εξειδίκευση της μεταφοράς, ενώ ο κύκλος ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους (αναλυτικά βλ.1.4.2) συντελεί στην απόδοση της ρυθμιστικής τους δράσης.

Αντίθετα, τα 36 μέλη της οικογένειας των SNAREs, αν και εμφανίζουν, επίσης, διακριτή ενδοκυτταρική κατανομή, γεγονός που περιορίζει σημαντικά τη δυναμική της σύντηξης, έχουν, τουλάχιστον *in vitro*, παρουσιάσει την ιδιότητα να σχηματίζουν ετερόκλητα μεταξύ τους σύμπλοκα. Επιπρόσθετα, ο μηχανισμός σύντηξης είναι διαρκώς ενεργοποιημένος, με αποτέλεσμα να απαιτείται ένας αριθμός πρωτεϊνών για τη ρύθμισή του, αναστολή ή ενεργοποίησή του. Σε αυτές συγκαταλέγονται οι πρωτεΐνες Rabs και οι τελεστές τους (Malsam et al., 2008); (Sudhof and Rothman, 2009).

Φαίνεται, λοιπόν, τόσο από άποψη εξειδίκευσης, όσο και από άποψη απόδοσης, η εξαιρετική σημασία των Rab πρωτεϊνών ως σταθμού ελέγχου της κυστιδιακής μεταφοράς.

1.4 Rab GTPάσες

1.4.1 Rab GTPάσες: Κατάταξη-Δομή

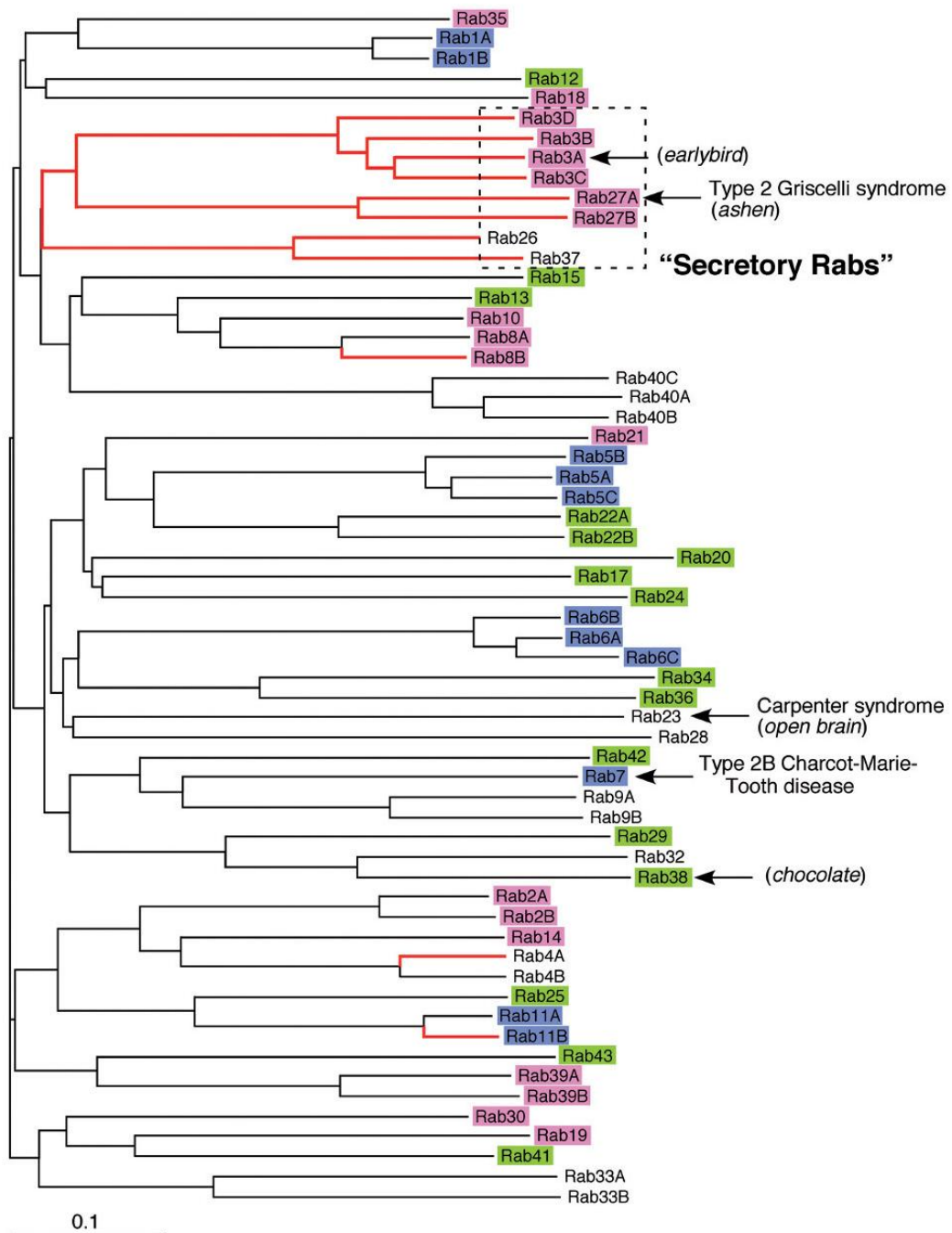
Οι Rabs αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια μονομερών μικρών GTPασών. Συγκροτούν, μαζί με τις οικογένειες των Ras, Rho/Rac, Arf και Ran, την υπεροικογένεια των Ras (Colicelli, 2004). Ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1980 και από τότε ο αριθμός

τους έχει αυξηθεί σημαντικά. Αριθμούνται παραδοσιακά με βάση τη σειρά εύρεσής τους, Rab1, Rab2, μέχρι Rab44. Πολλές Rabs φαίνεται να έχουν προέλθει από διπλασιασμό γονιδίων, δεδομένης της ύπαρξης πολλών υποοικογενειών με 75-95% αμινοξική ομοιότητα και παρόμοιες λειτουργίες μεταξύ των μελών τους, π.χ. οι Rab1a, Rab1b συγκροτούν την υποοικογένεια Rab1. Η ύπαρξη των παραλόγων αυτών ανεβάζει το συνολικό αριθμό των μελών της οικογένειας των Rab, στα θηλαστικά, στο 63 (Εικόνα 1.10) (Schwartz et al., 2007).

Ορισμένες από αυτές έχουν ευρεία έκφραση, ενώ σε άλλες η έκφραση ρυθμίζεται ιστοειδικά ή εξελικτικά. Έντεκα Rabs απαντώνται στο σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα με την πολυπλοκότητα του οργανισμού. Αυτή η αυξανόμενη πολυπλοκότητα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, αντανακλά τη μεγαλύτερη ανάγκη για κυτταρική οργάνωση και ενδοκυττάρια μεταφορά στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους των πολυκύτταρων οργανισμών (Pereira-Leal and Seabra, 2001).

Η αναδίπλωσή τους είναι, σε γενικές γραμμές, κοινή για όλες τις μικρές GTPάσες της υπεριοικογένειας των Ras. Αποτελούνται από έξι β πτυχωτές επιφάνειες, πέντε παράλληλες και μία αντιπαράλληλη, περιστοιχιζόμενες από πέντε α έλικες. Στη δομή αυτή υπάρχουν συντηρημένες περιοχές που εμπλέκονται στην πρόσδεση νουκλεοτιδίου γουανίνης και ιόντων μαγνησίου, οι οποίες αναφέρονται ως G1-G3 και PM1-PM3 αντίστοιχα. Υπάρχουν επίσης δύο περιοχές, οι switch I και switch II, που υπόκεινται σημαντική αλλαγή διαμόρφωσης μετά από πρόσδεση ή υδρόλυση GTP (Εικόνα 1.11A).

Τι είναι λοιπόν αυτό που διαφοροποιεί μία Rab από τις υπόλοιπες Ras; Όλα τα μέλη των Ras διαθέτουν στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο μοτίβο πρενυλίωσης, το οποίο διαθέτει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, με εξαίρεση τις Rabs που έχουν δύο, σε μία από τις παρακάτω αλληλουχίες: XXXCC, XXCCX, XCCXX, CCXXX ή XXCXC. Το κριτήριο αυτό θα μπορούσε να είναι διαγνωστικό μιας Rab πρωτεΐνης, αν δεν είχαν βρεθεί οι Rab8 και Rab13, με μοτίβο μιας κυστεΐνης.

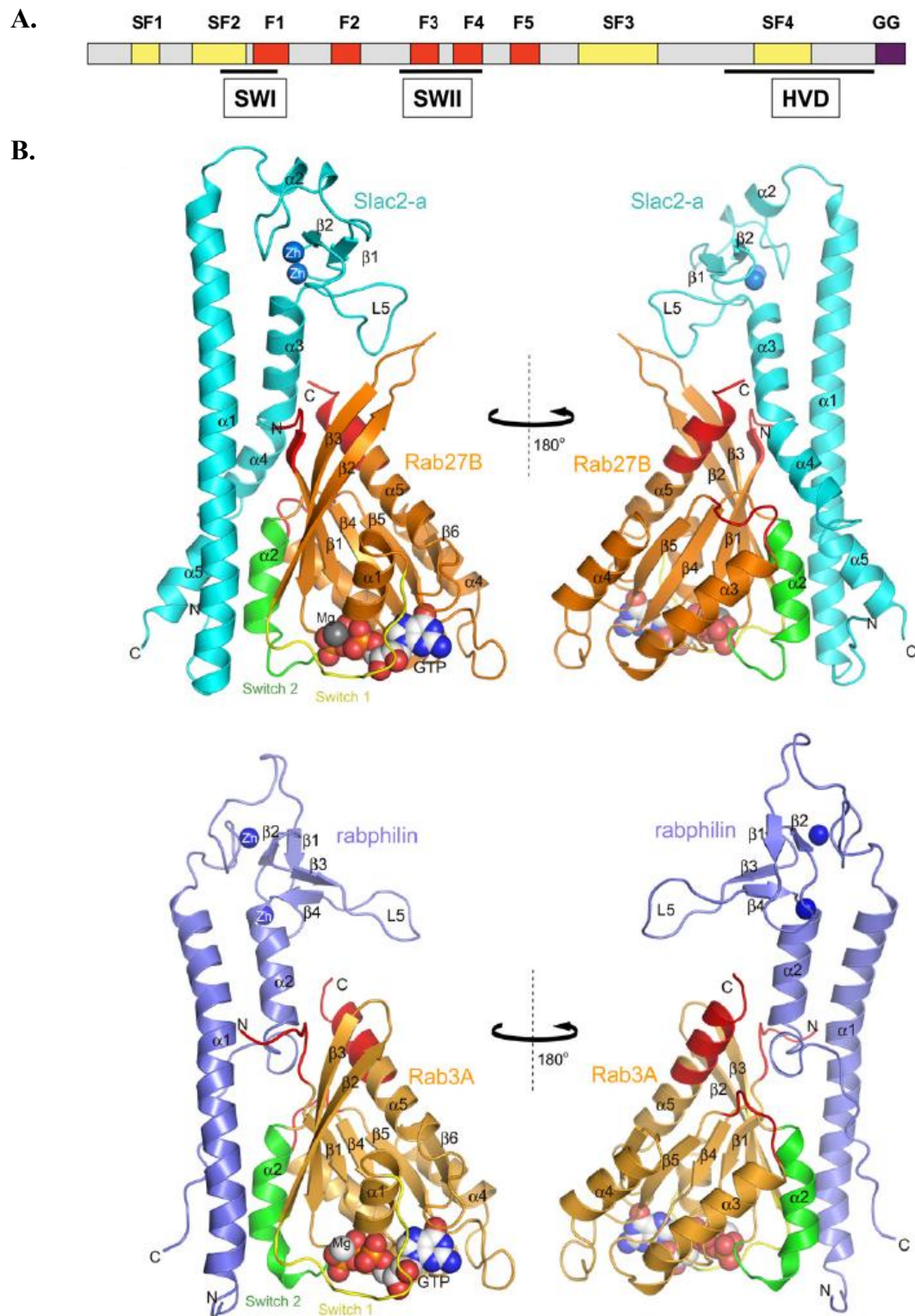


Εικόνα 1.10: Φυλογενετικό δέντρο των μελών της οικογένειας των Rab στον άνθρωπο (Fukuda, 2008).

Σήμερα έχουν αναγνωριστεί πέντε περιοχές, Rab family regions – RabF, που είναι συντηρημένες μόνο μεταξύ των Rab πρωτεϊνών και χρησιμοποιούνται για τη διάκρισή τους από τα υπόλοιπα μέλη της υπερκογένειας των Ras. Η περιοχή RabF1 τοποθετείται μέσα στη λεγόμενη περιοχή του τελεστή (loop2/β2), μέσα στη switch I περιοχή. Οι υπόλοιπες τέσσερις περιοχές, RabF2 (β3), RabF3 (loop2), RabF4 (α2/loop5) και RabF5 (β4/loop6), τοποθετούνται μέσα και γύρω από τη switch II περιοχή, ανάμεσα στις β πτυχωτές επιφάνειες β3 και β4. Επειδή οι RabF περιοχές βρίσκονται γύρω από τις περιοχές switch, οι οποίες υπόκεινται αλλαγή διαμόρφωσης κατόπιν πρόσδεσης GDP ή GTP, έχει προταθεί για αυτές ότι εμπλέκονται στη πρόσδεση γενικών ρυθμιστών της λειτουργίας των Rabs. Κι αυτό, γιατί οι γενικοί αυτοί ρυθμιστές, όπως οι πρωτεΐνες RabGDI και REP, για τις οποίες θα γίνει αναφορά στο επόμενο εδάφιο, προσδένονται στη Rab με ένα νουκλεοτίδιο-εξαρτώμενο τρόπο και αναγνωρίζουν όλες τις Rabs, χωρίς να παρουσιάζουν κάποια περαιτέρω εξειδίκευση έναντι συγκεκριμένων υποοικογενειών.

Επιπρόσθετα, έχουν αναγνωριστεί και τέσσερις περιοχές με υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των υποοικογενειών των Rabs. Πρόκειται για τις Rab subfamily regions (RabSF): RabSF1 (β1), RabSF2 (α1/ loop2), RabSF3 (α3/ loop7) και RabSF4 (α5) (Εικόνα 11A). Οι RabSF1, RabSF3 και RabSF4, στην κρυσταλλική δομή των Rab27b και Rab3a, φαίνεται να σχηματίζουν μία επιφάνεια υπεύθυνη για την πρόσδεση στον τελεστή (Slac2-a και Rabphilin3a αντίστοιχα), ενώ η RabSF2 φαίνεται να σχηματίζει μία επιφάνεια στην αντίθετη πλευρά του μορίου που, πιθανώς, διαμεσολαβεί την πρόσδεση σε άλλους τελεστές (Εικόνα 1.11B) (Kukimoto-Niino et al., 2008; Ostermeier and Brunger, 1999). Θεωρείται, λοιπόν, ότι οι τελεστές προσδένονται στις RabF περιοχές, αναγνωρίζοντας τη GDP ή GTP διαμόρφωση, και στις RabSF περιοχές για να προσδώσουν την ειδικότητα στη λειτουργία της Rab.

Η περιοχή, τέλος, που εμφανίζει το μικρότερο βαθμό ομοιότητας (14,4% κατά μέσο όρο) μεταξύ των μελών της οικογένειας των Rabs, βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο, με μήκος 35-40 αμινοξέων και καλείται hypervariable region. Ακόμη και μεταξύ των μελών των υποοικογενειών, η ομοιότητα στην περιοχή αυτή, δεν ξεπερνά το 55% (Pereira-Leal and Seabra, 2000); (Leung et al., 2006); (Stenmark and Olkkonen, 2001). Είχε, λοιπόν, αρχικά προταθεί ότι είναι υπεύθυνη για τον διακριτό ενδοκυττάριο εντοπισμό των Rabs (Chavrier et al., 1991).



Εικόνα 1.11: Δομή των Rab GTPασών. (A) Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών μιας Rab. (B) Σύγκριση των δομών των συμπλόκων Rab27b/Slac2-a και Rab3a/rabphilin (Kukimoto-Niino et al., 2008).

1.4.2 Η μηχανιστική βάση της ανακύκλωσης των Rab πρωτεϊνών μεταξύ μεμβρανικών διαμερισμάτων

Οι Rab GTPάσες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, όπου προσδένοντας GDP βρίσκονται στην ανενεργό, ενώ προσδένοντας GTP στην ενεργό μορφή τους, σε αυτή δηλαδή που θεωρείται ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους καθοδικούς τελεστές. Ο κύκλος του νουκλεοτιδίου είναι άμεσα συνυφασμένος με τον κύκλο εντοπισμού των Rabs μεταξύ κυτταροπλάσματος και μεμβράνης αντίστοιχα. Για τον μεμβρανικό εντοπισμό τους, απαραίτητη τροποποίηση είναι η πρενυλίωση, καθώς μεταλλαγμένες Rabs, που αδυνατούν να πρενυλιωθούν, παραμένουν κυτταροπλασματικές και μη λειτουργικές.

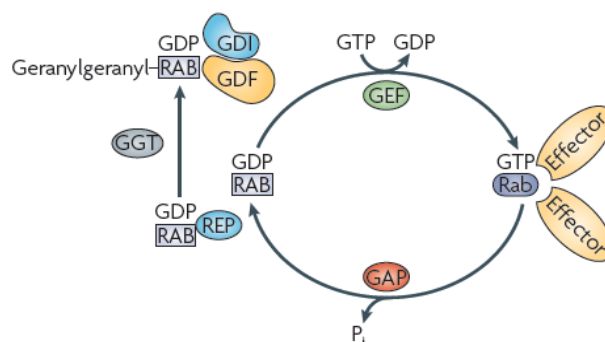
Αμέσως μετά τη σύνθεσή τους στα ριβοσώματα, οι Rabs αναγνωρίζονται, στη GDP μορφή τους, από την πρωτεΐνη συνοδό των Rab (Rab escort protein – REP). Στο σύμπλοκο αυτό, η Rab παρουσιάζεται στο ένζυμο geranylgeranyl μεταφοράση II (geranylgeranyl transferase II – GGTaseII), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά δύο geranylgeranyl ομάδων (20 άνθρακες) σε δύο κυστεΐνες του καρβοξυ-τελικού άκρου του μορίου. Η ανάγκη της REP ως έναν επιπρόσθετο παράγοντα πρενυλίωσης είναι χαρακτηριστική της οικογένειας των Rabs, καθώς άλλες GTPάσες που υπόκεινται μετά-μεταφραστική πρενυλίωση, τροποποιούνται άμεσα από το ένζυμο. Γίνεται, επιπλέον, κατανοητό γιατί μείωση ή απώλεια της δραστηριότητας της REP οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις και θάνατο.

Η REP πρέπει στη συνέχεια να μεταφέρει την πρενυλιωμένη Rab στην κατάλληλη μεμβράνη. Η μετατόπιση αυτή καταλύεται από έναν παράγοντα που ονομάζεται GDI displacement factor (GDF). Ορισμένοι τέτοιοι παράγοντες έχουν ήδη αναγνωριστεί, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την πρωτεΐνη Pra1, έναν GDF για τη Rab9. Έχει αποδειχτεί ότι η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει ειδικότητα έναντι ενδοσωμικών Rabs (Rab9, Rab5), σε σχέση με Rabs του πρώιμου εκκριτικού μονοπατιού (Rab1, Rab2).

Η μεμβρανική μετατόπιση ακολουθείται από ανταλλαγή του προσδεμένου GDP με GTP, διαδικασία που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες GEFs (guanine nucleotide-exchange factors). Εφόσον έχουν βρεθεί ειδικές GEFs για ορισμένες Rabs, θεωρείται πως οι πρωτεΐνες αυτές συμβάλουν, επίσης, στην πιστότητα του εντοπισμού των τελευταίων. Οι μέχρι σήμερα γνωστές, όμως, GEFs είναι περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες που απαιτούν άλλους παράγοντες για τη στόχευσή τους.

Η υδρόλυση του GTP καταλύεται από μία GTPase activating protein (GAP) και οδηγεί στη μετάπτωση της Rab στην ανενεργή μορφή της. Στη μορφή αυτή, η Rab

εξάγεται από τη θέση της στη μεμβράνη και μεταφέρεται σε νέα. Η διαδικασία της εξαγωγής και νέας μεταφοράς διαμεσολαβείται από μία τελευταία ομάδα πρωτεϊνών, τις GDI (GDP dissociation inhibitor), με τις οποίες οι Rabs σχηματίζουν σταθερά κυτταροπλασματικά σύμπλοκα (Ali and Seabra, 2005; Goody et al., 2005; Seabra and Wasmeier, 2004; ten Klooster and Hordijk, 2007) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12: Η πρενυλίωση των Rab, η μεταφορά τους στη μεμβράνη και ο κύκλος του νουκλεοτιδίου. Σχηματική αναπαράσταση (Stenmark, 2009).

Η κυτταροπλασματική δεξαμενή των Rabs, λοιπόν, βρίσκεται προσδεμένη είτε στις REP, είτε στις GDI. Η δομική ομοιότητα μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών υποδηλώνει ότι ο τρόπος αλληλεπίδρασης με τις Rabs πρέπει να είναι παρόμοιος. Διαφέρουν στο βαθμό συγγένειας που παρουσιάζουν έναντι πρενυλιωμένων και μη πρωτεϊνών, καθώς επίσης και στο γεγονός ότι η REP είναι υπεύθυνη μόνο για τη μεταφορά της Rab στη μεμβράνη, ενώ η GDI και για την εξαγωγή της (Wu et al., 2007).

Οι Rabs, λοιπόν, υπόκεινται διαδοχικούς κύκλους μεμβρανικής εισαγωγής και εξαγωγής. Η ικανότητά τους να εναλλάσσονται μεταξύ των δύο αυτών διαμορφώσεων-εντοπισμών επιβάλλει τη χρονική και χωροταξική ρύθμιση της κυστιδιακής μεταφοράς.

1.4.3 Λειτουργίες των Rab πρωτεϊνών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε βήμα στη διαδικασία της κυστιδιακής μεταφοράς απαιτεί την ενεργοποιημένη Rab να αλληλεπιδρά με παράγοντες που δρουν ως τελεστές για τη μεταβίβαση του σήματος από τη Rab προς τον μηχανισμό μεταφοράς. Ένας μεγάλος αριθμός τελεστών και ρυθμιστών έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Δεδομένης της δομικής συντήρησης των Rabs, θα περίμενε κανείς οι τελεστές τους να μπορούν, επίσης, να κατηγοριοποιηθούν σε μία ομάδα δομικά συντηρημένων πρωτεϊνών. Δε φαίνεται, όμως, να συμβαίνει κάτι τέτοιο. Η δομική ετερογένεια που παρουσιάζουν οι τελεστές υποδηλώνει πως πρόκειται για εξειδικευμένα μόρια που τροποποιούν τη δράση

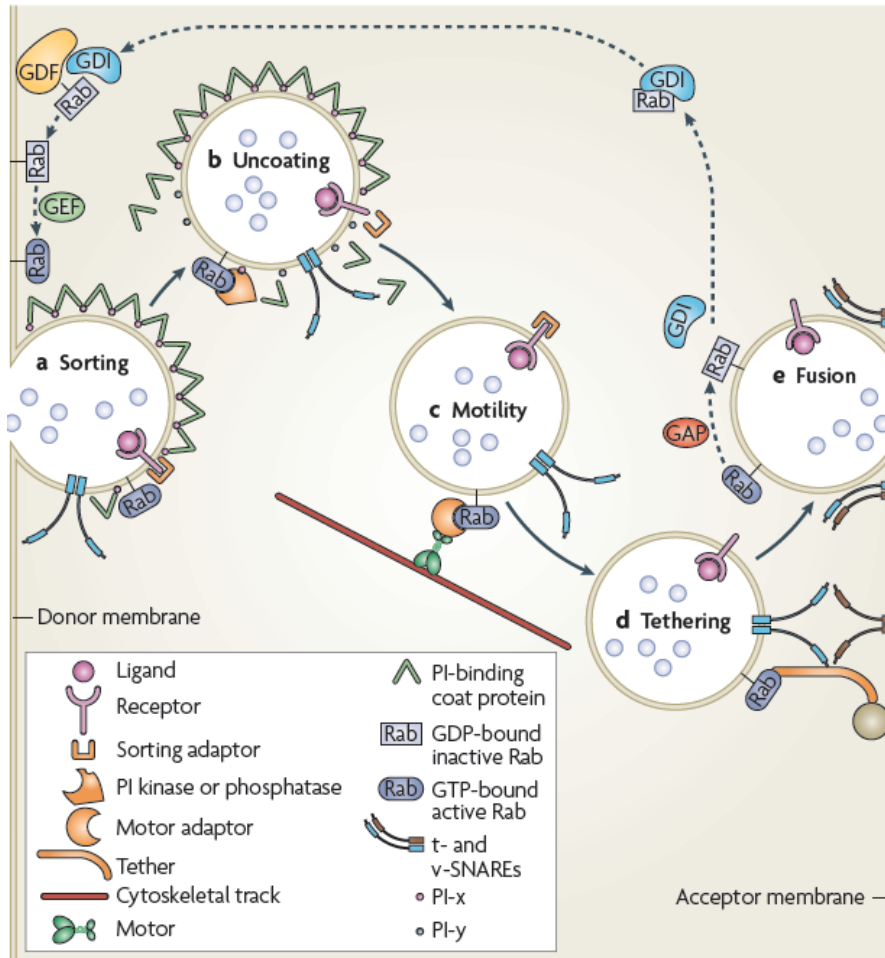
τους ανάλογα με τα ιδιαίτερα οργανίδια και συστήματα μεταφοράς. Μία προσπάθεια κατηγοριοποίησής τους ουσιαστικά φανερώνει και τις διαφορετικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν οι Rabs. Οι διαδικασίες αυτές αναφέρονται αναλυτικά στη συνέχεια (Εικόνα 1.13).

Ο ρόλος των Rab στον **σχηματισμό κυστιδίων** είναι αρκετά ασαφής, αφού τα πειραματικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Η διαλογή του φορτίου σε εξειδικευμένα κυστίδια μεταφοράς είναι ένας βασικός μηχανισμός της διαδικασίας της κυστιδιακής μεταφοράς. Η διαλογή αυτή μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, που αντιπροσωπεύουν είτε το φορτίο είτε τους υποδοχείς του, με κυτταροπλασματικά συμπλέγματα των πρωτεϊνών του καλύμματος. Επειδή τα διάφορα τέτοια συμπλέγματα αναγνωρίζουν διακριτά δομικά συστατικά των διαφόρων φορτίων, η συναρμολόγηση του καλύμματος θεωρείται διαδικασία εξειδικευμένη, ανάλογα με το φορτίο. Εκτός, όμως, από το φορτίο, διάφοροι άλλοι καθοριστικοί παράγοντες, όπως η μεμβρανική καμπυλότητα, η λιπιδιακή σύσταση και τα μέλη της οικογένειας των Rabs, συμβάλλουν στη διασφάλιση της ειδικής αυτής διαδικασίας.

Το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα Rab πρωτεΐνης αυτής της κατηγορίας αφορά τη Rab9, μία Rab των όψιμων ενδοσωμάτων που έχει βρεθεί να διευκολύνει τη διαλογή του υποδοχέα της 6-φωσφορικής-μαννόζης (mannose-6-phosphate receptor, M6PRs) σε κυστίδια ανακύκλωσης από τα όψιμα ενδοσώματα στο TGN (Carroll et al., 2001).

Εκτός, όμως, από τον πιθανό τους ρόλο στο σχηματισμό των κυστιδίων, οι Rabs φαίνεται, επίσης, να συμμετέχουν και στην **απώλεια του καλύμματος** των κυστιδίων, μία διαδικασία απαραίτητη πριν τη σύντηξη αυτών. Ένα καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί η Rab5, που φαίνεται να ενορχηστρώνει την απώλεια της πρωτεΐνης-προσαρμοστή AP2 από τα πρώιμα ενδοσώματα (Semerdjieva et al., 2008).

Η **κατεύθυνση της κυστιδιακής μεταφοράς** μεσολαβείται, εν μέρει, από τα ινίδια ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους, που είναι υπεύθυνοι για την τοπική και μεγάλο μήκους μεταφορά των κυστιδίων, αντίστοιχα. Η κινητήριος δύναμη για την κατευθυνόμενη μετακίνηση των κυστιδίων, κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και των ινιδίων ακτίνης, παρέχεται από μία ομάδα πρωτεϊνών, που καλούνται πρωτεΐνες-κινητήρες (motor proteins) και, επομένως, η πρόσδεση αυτών στα κυστίδια απαιτεί αυστηρή ρύθμιση, ούτως ώστε να επιτευχθεί η ορθή ροή του φορτίου.



Εικόνα 1.13: Σχηματική παράσταση των λειτουργιών των Rabs στην κυστιδιακή μεταφορά. (a) Ενεργοποίηση ενός υποδοχέα διαλογής από μία Rab, στην ενεργό μορφή της, σε ένα νεοσχηματιζόμενο κυστίδιο. (b) Η αλληλεπίδραση των Rabs με κινάσες και φωσφατάσες φωσφοϊνοσιτιδίων αλλάζει τη σύσταση σε φωσφοϊνοσιτίδια του μεταφερόμενου κυστιδίου, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του καλύμματος που αλληλεπιδρούν με αυτά. (c) Οι Rab GTPάσες μεσολαβούν τη μεταφορά των κυστιδίων κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και των ινιδίων ακτίνης αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες-κινητήρες. (d) Οι Rabs μεσολαβούν, επίσης, τον ελλιμενισμό του κυστιδίου στη μεμβράνη-στόχο, μέσω αλληλεπίδρασής τους με παράγοντες ελλιμενισμού. Αυτοί, με τη σειρά τους, μπορεί να αλληλεπιδρούν με τις SNAREs και τους ρυθμιστές αυτών, επάγοντας τη μεμβρανική σύντηξη. (e) Με την ολοκλήρωση της μεμβρανικής σύντηξης και έκκρισης, η Rab μετατρέπεται στην ανενεργό μορφή της και, σε σύμπλοκο με τη GDI, μεταφέρεται στη μεμβράνη-δότη, όπου η ενεργοποίησή της οδηγεί σε νέο κύκλο μεταφοράς (Stenmark, 2009).

Οι Rabs, είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω των τελεστών τους, φαίνεται να ρυθμίζουν και αυτή τη διαδικασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι Rab27 και Rab11 που, μέσω ορισμένων τελεστών τους, διαμεσολαβούν τη σύνδεση των κυστιδίων, στα οποία βρίσκονται, με τις πρωτεΐνες-κινητήρες myosin Va και myosin Vb (πρωτεΐνες-κινητήρες των ινιδίων ακτίνης) αντίστοιχα (Hales et al., 2002; Wu et al., 2002). Παραδείγματα Rab

GTPασών υπεύθυνων για τη διαμεσολάβηση της σύνδεσης των κυστιδίων με πρωτεΐνες-κινητήρες των μικροσωληνίσκων (kinesin, dynein) έχουν, επίσης, αναφερθεί. Οι κινεσίνες μπορεί να αποτελούν τελεστές των Rab (π.χ. η rabkinesin 6, που ρυθμίζει την κυττοκίνηση, αποτελεί τελεστή της Rab6) (Echard et al., 1998; Fontijn et al., 2001) ή να ρυθμίζονται έμμεσα από Rab GTPάσες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της δεύτερης κατηγορίας αποτελεί η κινεσίνη KIF16b που εντοπίζεται στις ενδοσωμικές μεμβράνες, όπου αλληλεπιδρά με το φωσφοϊνοσιτιδίο PI3P, η σύνθεση του οποίου ελέγχεται από τη Rab5 (Hoerfner et al., 2005).

Μία από τις καλύτερα μελετημένες διαδικασίες που ελέγχουν οι Rabs είναι ο **ελλιμενισμός του κυστιδίου στη μεμβράνη-στόχο**. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών, αλλά και πρωτεϊνικών συμπλόκων, φαίνεται να παίζει το ρόλο του παράγοντα ελλιμενισμού. Ο εφοδιασμός της μεμβράνης με τη Rab και τον παράγοντα αυτό μπορεί να είναι συμμετρικός ή μη, μεταξύ της μεμβράνης δότη και δέκτη. Έτσι, η Rab μπορεί να βρίσκεται στη μία μεμβράνη και, μέσω του παράγοντα ελλιμενισμού, να αλληλεπιδρά με μία μεμβρανική πρωτεΐνη ή λιπίδιο της άλλης μεμβράνης ή, εναλλακτικά, μπορεί να βρίσκεται και στις δύο μεμβράνες, οπότε ο παράγοντας αυτός να αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ των δύο διαμερισμάτων (Zerial and McBride, 2001). Οι παράγοντες ελλιμενισμού είναι κυρίως κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, που ανακτώνται από τις ενεργοποιημένες Rabs, με εξαίρεση ορισμένους τέτοιους παράγοντες της συσκευής Golgi, οι οποίοι αποτελούν βασικά συστατικά της (Moyer et al., 2001). Μέσω αυτών των παραγόντων, η Rab συνδέει το κυστίδιο, στο οποίο βρίσκεται, με πρωτεΐνες SNARE και φωσφολιπίδια της μεμβράνης.

Τέλος, μέσω του ρόλου τους στην κυστιδιακή μεταφορά, οι Rabs έχουν βρεθεί να **ελέγχουν σηματοδοτικά μονοπάτια**, καθώς υπάρχει μία στενή συσχέτιση μεταξύ κυστιδιακής μεταφοράς και σηματοδότησης, διαμεσολαβούμενης από υποδοχείς. Η ενεργοποίηση, δηλαδή, αρκετών υποδοχέων ορμονών και αυξητικών παραγόντων οδηγεί στη μετακίνηση αυτών στα ενδοσώματα, ενώ ορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια απαιτούν μετατόπιση των υποδοχέων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα ενδοσώματα. Έτσι, οι Rabs έχουν, επίσης, εμπλακεί **στην έκφραση γονιδίων, την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση**.

Ο κεντρικός, λοιπόν, ρόλος των Rab πρωτεϊνών στην κυστιδιακή μεταφορά και τη μεταγωγή του σήματος ερμηνεύει τη συσχέτιση της δυσλειτουργίας τους (τόσο αυτών όσο

και των ρυθμιστών ή τελεστών τους) με διάφορες ασθένειες, κυρίως λοιμικές, νευρολογικές και ενδοκρινολογικές, καθώς επίσης και με διάφορες μορφές καρκίνου.

1.4.4 Οι Rabs ως οριστές της ταυτότητας των διαφόρων μεμβρανικών διαμερισμάτων

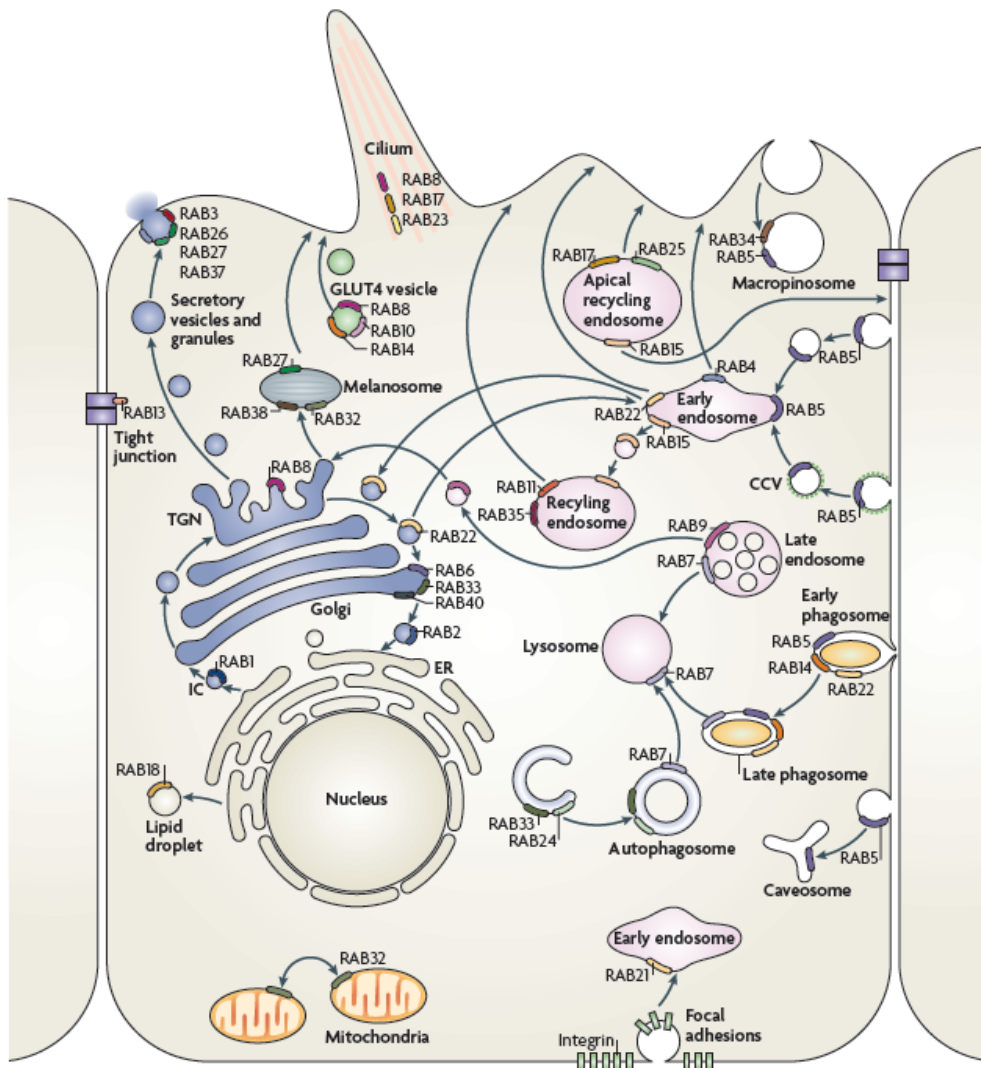
Ένα βασικό και ακόμα αναπάντητο ερώτημα της Κυτταρικής Βιολογίας είναι πώς τα κύτταρα εγκαθιδρύουν διακριτά μεμβρανικά διαμερίσματα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν πληθώρα διαμερισμάτων, συμπεριλαμβανομένων του ενδοπλασματικού δικτύου, της συσκευής Golgi, των πρώιμων και όψιμων ενδοσωμάτων, λυσοσωμάτων και μιτοχονδρίων. Καθένα από αυτά διαθέτει διακριτές ομάδες ενζύμων και έχει ξεχωριστή λιπιδιακή σύσταση.

Ειδικές αλληλουχίες στόχευσης είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι λειτουργικές υπομονάδες του είναι πιθανώς αποτέλεσμα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι αντίστοιχες της συσκευής Golgi διακρίνονται από τις ομάδες ενζύμων που περιέχουν. Στην περίπτωση των ενδοσωμάτων όμως τα πράγματα δεν είναι τόσο σαφή. Τα διαμερίσματα αυτά ωριμάζουν αυξάνοντας την οξύτητά τους, αλλά τα όρια στα ενδιάμεσα στάδια αυτής της διαδικασίας δεν είναι σαφώς καθορισμένα.

Η εύρεση ότι τα διαφορετικά διαμερίσματα των εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών μονοπατιών έχουν διακριτές Rabs στην επιφάνειά τους, δημιούργησε τη θεωρία ότι μπορεί να είναι αυτές που ορίζουν την ταυτότητα των διαμερισμάτων. Για παράδειγμα, η Rab1 βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η Rab6 στη συσκευή Golgi, η Rab5 στα πρώιμα ενδοσώματα και η Rab7 στα όψιμα (Εικόνα 1.14).

Η άποψη αυτή είναι μερικώς ορθή. Οι Rabs, έχοντας την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με διάφορους τελεστές, συγκεντρώνουν ενσωματωμένες και περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες σε ειδικές περιοχές ενός οργανιδίου, σχηματίζοντας έτσι ένα ικρίωμα. Υποδιαμερισματοποιούν, με τον τρόπο αυτό, τη μεμβράνη του οργανιδίου και κατευθύνουν το φορτίο στους διαφορετικούς προορισμούς του. Επιπλέον, μέσω ρύθμισης διαδοχικών αντιδράσεων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης φωσφοϊνοσιτιδίων, οι GTPάσες αυτές καθορίζουν απόλυτα τη σύσταση σε φωσφοϊνοσιτιδία σε περιορισμένες μεμβρανικές περιοχές (Zerial and McBride, 2001).

Η εικόνα αυτή γίνεται ακόμη πιο πολύπλοκη αν προσθέσουμε το γεγονός πως πολλές διαφορετικές Rabs έχει βρεθεί να εντοπίζονται σε ένα οργανίδιο και, μάλιστα, να καταλαμβάνουν σε αυτό διακριτές μεμβρανικές υποπεριοχές (Sonnichsen et al., 2000).



Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των Rab σε ένα επιθηλιακό κύτταρο. Η RAB1 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και μεσολαβεί την κυστιδιακή μεταφορά μεταξύ ER–Golgi, ενώ η RAB2 που εντοπίζεται στο ER–Golgi ενδιάμεσο διαμέρισμα (ER–Golgi intermediate compartment, ERGIC) ρυθμίζει την Golgi–ER μεταφορά. Οι Rabs που εντοπίζονται στο Golgi είναι οι RAB6, RAB33 και RAB40 και μεσολαβούν τη μεταφορά μεταξύ των κυστιδίων του Golgi. Οι RAB33 και RAB24 ρυθμίζουν, επίσης, το σχηματισμό αυτό-φαγοσωμάτων. Η RAB8 ρυθμίζει την ιδιοστατική μεταφορά από το δίκτυο *trans*-Golgi (TGN) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ συμμετέχει, επίσης, στη μετατόπιση των κυστιδίων του μεταφορέα GLUT4 (μαζί με τις RAB10 και RAB14). Οι RAB3, RAB26, RAB27 και RAB37 ρυθμίζουν διάφορες μορφές ρυθμιζόμενης έκκρισης, ενώ η RAB27 είναι, επίσης, υπεύθυνη για τη μετατόπιση των μελανοσωμάτων στην περιφέρεια του κυττάρου. Οι RAB32 and RAB38 συμμετέχουν στη βιογένεση των μελανοσωμάτων, ενώ η RAB32 ρυθμίζει και τη μιτοχondριακή σχάση. Η RAB13 ρυθμίζει τη συγκρότηση των πυκνών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ η RAB18 ρυθμίζει το σχηματισμό σταγονιδίων λίπους. Η RAB22 μεσολαβεί τη μεταφορά μεταξύ του TGN και των πρώιμων ενδοσωμάτων και αντίστροφα, ενώ η RAB5, που εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, τα φαγοσώματα, τα καβεοσώματα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση, τη σύντηξη ενδοσωμάτων με κυστίδια καλυμμένα από κλαθρίνη

(clathrin-coated vesicles, CCVs), τη μακροπινοκυττάρωση (μαζί με τη RAB34) και την ωρίμανση των πρώιμων φαγοσωμάτων (μαζί με τις RAB14 και RAB22). Η RAB21 ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση ιντεγκρινών. Οι RAB11 και RAB35 μεσολαβούν την ανακύκλωση από τα ενδοσώματα ανακύκλωσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ η RAB4 μεσολαβεί την άμεση ανακύκλωση από τα πρώιμα ενδοσώματα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η RAB15 συμμετέχει στη μεταφορά από τα πρώιμα στα ενδοσώματα ανακύκλωσης και στη μεταφορά ενδοσωμάτων ανακύκλωσης από την κορυφαία στη βασειοπλευρική μεμβράνη. Οι RAB17 και RAB25 ρυθμίζουν τη μεταφορά των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης στην κορυφαία μεμβράνη. Η RAB7 ρυθμίζει την ωρίμανση των όψιμων ενδοσωμάτων και φαγοσωμάτων και τη σύντηξή τους με τα λυσοσώματα, ενώ η άλλη Rab των όψιμων ενδοσωμάτων, η RAB9, ρυθμίζει τη μεταφορά από τα όψιμα ενδοσώματα στο TGN (Stenmark, 2009).

Με ποιο μηχανισμό, λοιπόν, επιτυγχάνεται η σωστή στόχευση των κατάλληλων Rabs στα διάφορα μεμβρανικά διαμερίσματα; Τι είναι αυτό που κάνει τη Rab5 να πηγαίνει στα πρώιμα ενδοσώματα και τη Rab27 στα εκκριτικά κυστίδια; Ακόμα παραπέρα, γιατί πολλές Rabs, και συνήθως με υψηλά ποσοστά αμινοξικής ομοιότητας μεταξύ τους, εντοπίζονται στο ίδιο μεμβρανικό διαμέρισμα; Πώς εντοπίζονται η στόχευση όλων αυτών;

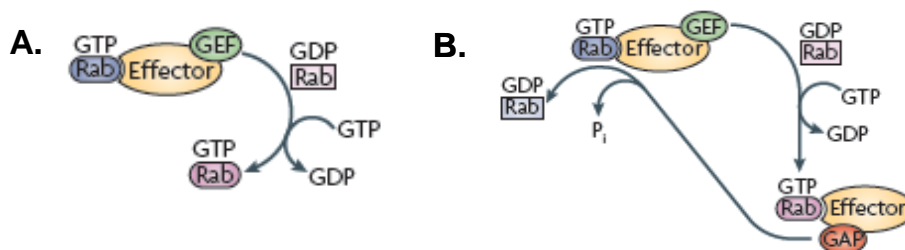
Αναφορικά με την ορθή στόχευση των Rabs στα διάφορα μεμβρανικά διαμερίσματα, ο ρόλος της hypervariable περιοχής τους, ήταν ο πρώτος που μελετήθηκε (Chavrier et al., 1991; Stenmark et al., 1994) και απορρίφθηκε. Αλλάζοντας δηλαδή τη hypervariable περιοχή της Rab5 με την αντίστοιχη της Rab27, η πρωτεΐνη δεν πήγαινε σε εκκριτικά κυστίδια, αλλά στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Ali et al., 2004). Στη συνέχεια, προτάθηκε πως μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Pra/Yip, που έχουν δραστηριότητα GDF, παίζουν, πιθανώς, ρόλο στην εξειδικευμένη στόχευση, εφόσον ένα, τουλάχιστον, μέλος τους έχει βρεθεί να είναι υπεύθυνο για τον ειδικό εντοπισμό ορισμένων ενδοσωμικών Rabs (Sivars et al., 2003). Αν άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι υπεύθυνες για τον εντοπισμό των εκκριτικών Rabs ή αυτών της συσκευής Golgi παραμένει άγνωστο.

Όσον αφορά τη σημασία της ύπαρξης διαφορετικών Rabs στο ίδιο μεμβρανικό διαμέρισμα, είναι πιθανό αυτές να αντιπροσωπεύουν τους διαφορετικούς στόχους που μπορεί αυτό να έχει. Μία άποψη που έχει, επίσης, αρχίσει να διαμορφώνεται τα τελευταία χρόνια είναι ότι η ύπαρξη στενά συγγενικών Rabs στα ίδια οργανίδια και η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με κάποιους κοινούς τελεστές αποτελεί μηχανισμό εφεδρείας του κυττάρου, ούτως ώστε σε περίπτωση απώλειας της μιας να διασφαλίζεται η ολοκλήρωση της μεταφοράς. Εναλλακτικά, αυτοί οι κοινοί τελεστές μπορεί να ρυθμίζουν διαφορετικά

βήματα μιας διαδικασίας μεταφοράς, με τη διαδοχική πρόσδεσή τους σε διαφορετικές Rabs (Fukuda, 2008).

Για την ενορχηστρωμένη στόχευση, τέλος, των διαφορετικών αυτών Rabs στο ίδιο οργανίδιο, έχουν προταθεί δύο πολύ ενδιαφέροντα μοντέλα. Το πρώτο προτείνει πως μία Rab μπορεί να ρυθμίζει την ενεργοποίηση μιας άλλης, που δρα καθοδικά στο μονοπάτι μεταφοράς, στρατολογώντας τη GEF της. Το δεύτερο προσθέτει στον προηγούμενο μηχανισμό πως η δευτερογενώς ενεργοποιημένη Rab μπορεί να στρατολογήει ένα σύμπλεγμα τελεστών που να περιλαμβάνει μία GAP για την πρώτη Rab (Εικόνα 1.15). Ο μηχανισμός αυτός έχει προταθεί στην περίπτωση μετατροπής των πρώιμων, Rab5-θετικών, ενδοσωμάτων σε Rab7-θετικά όψιμα ενδοσώματα (Stenmark, 2009).

Ουσιαστικά, λοιπόν, κανένα από τα παραπάνω ερωτήματα δεν έχει πλήρως απαντηθεί. Αν λάβει κανείς υπόψη ότι υπάρχουν περισσότερες από 60 διαφορετικές Rabs στον άνθρωπο, κάθε μία με ορισμένους εξειδικευμένους και με ορισμένους κοινούς ρυθμιστές και τελεστές, γίνεται φανερό πως η κατανόηση του, διαμεσολαβούμενου από τις Rabs, μηχανισμού κυστιδιακής μετακίνησης, σε επίπεδο συστήματος, θα χρειαστεί πολύ μεγάλη προσπάθεια.



Εικόνα 1.15: Πιθανά μοντέλα ενορχηστρωμένης στόχευσης διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο. (A) Η συμμετοχή μιας GEF της δεύτερης Rab στο σύμπλοκο των τελεστών της πρώτης Rab οδηγεί στην ενεργοποίηση της δεύτερης. (B) Η συμμετοχή στο σύμπλοκο των τελεστών της δεύτερης Rab μιας GAP για την πρώτη Rab οδηγεί την πρώτη στην απενεργοποίησή της (Stenmark, 2009).

1.5 Rabs των εκκριτικών κυστιδίων

Η καλύτερα μελετημένη Rab των εκκριτικών κυστιδίων είναι η Rab3 (με τέσσερα παράλογα, Rab3A/B/C/D). Ο αριθμός των αναφορών σχετικά με τον εντοπισμό των μελών της υποοικογένειας Rab3 και τον ρόλο που διαδραματίζουν στη ρυθμιζόμενη έκκριση είναι πολύ μεγάλος. Απώλεια των τριών από τα τέσσερα παράλογα, όμως, έχει ως αποτέλεσμα μείωση της έκκρισης του νευροδιαβιβαστή μόνο κατά ένα ποσοστό της τάξης

του 30% (Schluter et al., 2004). Ποιες είναι λοιπόν οι επιπλέον Rabs που συμμετέχουν στη διαδικασία της έκκρισης;

Η δεύτερη Rab, που μελετήθηκε διεξοδικά, ήταν η Rab27 (με δύο παράλογα, Rab27A/B), ενώ οι Rab26 και Rab37 έχουν επίσης βρεθεί να εντοπίζονται αποκλειστικά σε εκκριτικά κυστίδια. Οι τέσσερις αυτές Rabs συγκροτούν ένα μικρό κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο και αναφέρονται ως εκκριτικές Rabs (Fukuda, 2008). Τα μέλη των υποοικογενειών Rab3 και Rab27 έχουν εντοπιστεί σε εκκριτικά κυστίδια νευρικών, ενδοκρινών, εξωκρινών και κυττάρων του ανοσοποιητικού. Αν και η υπερέκφρασή τους έχει δείχτει να έχει άλλοτε ανασταλτικό και άλλοτε θετικό ρόλο στη ρυθμιζόμενη έκκριση, τα *in vivo* μοντέλα με απαλοιφές αυτών των γονιδίων παρουσιάζουν σαφή ελαττώματα στην έκκριση (Menasche et al., 2000; Schluter et al., 2004). Όσον αφορά τις Rab26 και Rab37, αυτές εντοπίζονται σε εκκριτικά κυστίδια σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους, ενώ ο ρόλος τους στην έκκριση παραμένει άγνωστος (Masuda et al., 2000; Nashida et al., 2006).

Εκτός δε από τις κλασικές εκκριτικές Rabs, ένας ακόμη αριθμός από άλλες Rabs, οι οποίες έχουν ξεκάθαρο ρόλο σε διαμερίσματα ανεξάρτητα της έκκρισης (π.χ. ενδοσώματα), έχουν, επίσης, εμπλακεί στη διαδικασία της ρυθμιζόμενης έκκρισης. Η Rab4, για παράδειγμα, που έχει σαφή ρόλο στα πρώιμα ενδοσώματα, έχει, επίσης, δείχθει να συμμετέχει στην έκκριση των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων (Shirakawa et al., 2000). Αυτές οι Rabs (συγκεντρωτικά αναφέρονται στον Πίνακα 1.2), δεν αποτελούν γενικούς ρυθμιστές της εκκριτικής διαδικασίας, αλλά έχουν σχετιστεί με εξειδικευμένες μορφές έκκρισης.

Rab	Συμμετοχή σε έκκριση
Rab2	Υπερέκφρασή της οδηγεί σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης.
Rab 4	Έκκριση α-κοκκίων των αιμοπεταλίων, έκκριση αμυλάσης από τα παγκρεατικά βοτρυοειδή κύτταρα.
Rab 8	Απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από τα AtT-20 κύτταρα.
Rab 10	Ρυθμίζει τη μετατόπιση του μεταφορέα GLUT4 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Rab 11	Απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή από νευρώνες, έκκρισης ορμόνης από τα PC12 κύτταρα.
Rab 18	Αναστέλλει την έκκριση νευροενδοκρινών κυττάρων.

Πίνακας 1.2: Rab GTPάσες με κύριο ρόλο διαφορετικό της έκκρισης, αλλά που έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται σε εξειδικευμένες μορφές έκκρισης.

Προκειμένου, τέλος, να βρεθεί το πλήρες εύρος των Rab GTPασών που σχετίζονται με την έκκριση, πραγματοποιήθηκαν μελέτες πρωτεομικής αρκετών εκκριτικών κυστιδίων, που φανέρωσαν ένα πολύ μεγάλο αριθμό Rabs σε αυτά (25 σε νευρικά εκκριτικά κυστίδια, 16 στα εκκριτικά λυσοσώματα των NK κυττάρων-natural killer cells, 11 στα εκκριτικά κυστίδια των β παγκρεατικών κυττάρων) (Brunner et al., 2007; Casey et al., 2007; Takamori et al., 2006) (βλέπε Πίνακα 1.3). Ο ρόλος, όμως, αυτού του εντοπισμού, για τις περισσότερες από αυτές, παραμένει ασαφής. Αν και νεότερες μελέτες που συνδυάζουν ανοσοαναλυτικές μεθόδους με μικροσκοπία φθορισμού έχουν μειώσει τον αριθμό των Rabs σε 7 στα νευρικά εκκριτικά κυστίδια (Pavlos et al., 2010) και 4 στα πυκνά κοκκία των νευροενδοκρινών κυττάρων PC12 (Tsuboi and Fukuda, 2006), είναι πλέον σαφές πως η ρύθμιση της έκκρισης των εξειδικευμένων κυστιδίων είναι υπόθεση αρκετών Rabs.

Εκκριτικά οργανίδια	Rabs που εντοπίζονται σε αυτά
Εκκριτικά κυστίδια νευρικών κυττάρων	Rab1, 2, <u>3</u> , 4, <u>5</u> , 6, <u>7</u> , 8, 9, <u>10</u> , <u>11</u> , 12, <u>14</u> , 15, 16, 18, 21, 24, 25, 26, <u>27</u> , 30, 31, 33, 35
Ζυμογόνα κοκκία παγκρεατικών κυττάρων	Rab1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 18, 26, 27, 35
Κοκκία ινσουλίνης παγκρεατικών κυττάρων	Rab1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 27, 35, 37
Λυτικά κοκκία κυττάρων φυσικών φονέων	Rab1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 21, 27, 33, 35, 37, 39
Πυκνά κοκκία νευροενδοκρινών PC12 κυττάρων	Rab3, 27, 33, 37

Πίνακας 1.3 Rab GTPάσες που έχουν προκύψει από μελέτες πρωτεομικής διαφόρων εκκριτικών κυστιδίων. Εξαίρεση αποτελούν οι Rabs των κοκκίων των PC12, που προέκυψαν έπειτα από συστηματική σάρωση μιας βιβλιοθήκης GFP-συζευγμένων Rab GTPασών. Οι υπογραμμισμένες Rabs των εκκριτικών κυστιδίων των νευρικών κυττάρων, είναι αυτές που προέκυψαν από ανοσοαναλυτικές μεθόδους και μικροσκοπία φθορισμού.

1.6 Rab27

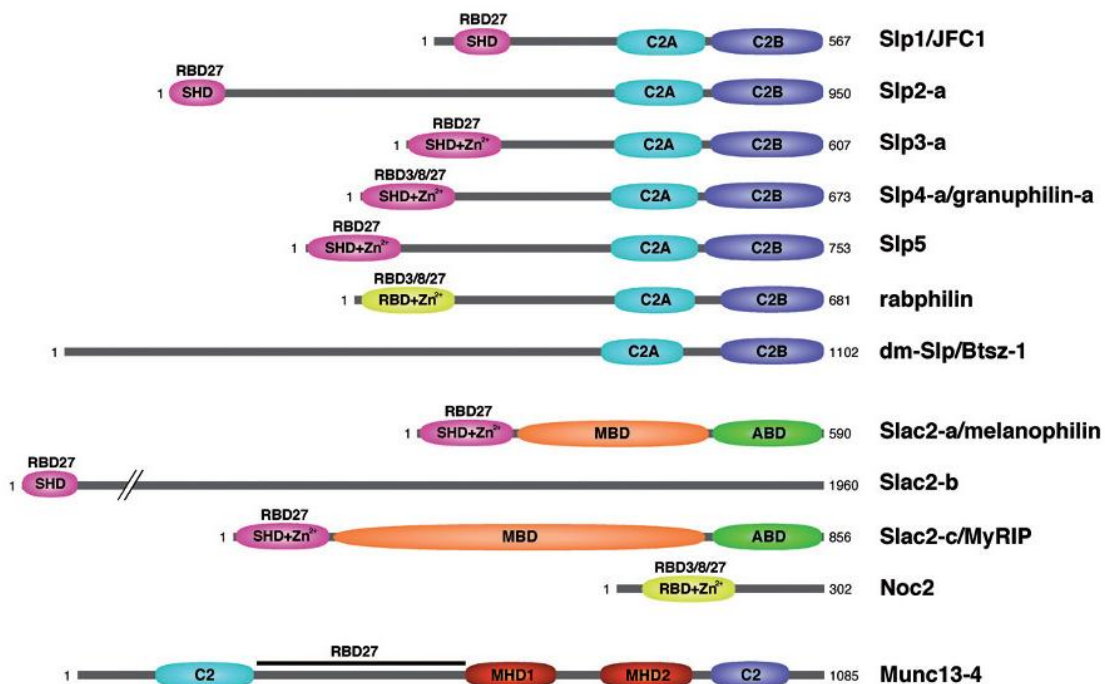
Η Rab27, εκτός από μία από τις σημαντικότερες εκκριτικές Rabs, αποτελεί και την πρώτη Rab που βρέθηκε να εντοπίζεται στη μεμβράνη των WPBs (Hannah et al., 2003). Για το λόγο αυτό θα αναλυθεί εκτενέστερα.

Το ενδιαφέρον προς τη Rab27, ως ρυθμιστή της εκκριτικής διαδικασίας, στράφηκε όταν το 2000 ο Menasche και οι συνεργάτες του βρήκαν πως μεταλλάξεις του γονιδίου αυτής είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση ενός γενετικού συνδρόμου στον άνθρωπο, του συνδρόμου Griscelli. Πρόκειται ουσιαστικά για το πρώτο παράδειγμα μιας Rab να εμπλέκεται σε ανθρώπινη γενετική ασθένεια. Χαρακτηρίζεται από χρωματική αραίωση του δέρματος και του τριχωτού της κεφαλής και ανοσοανεπάρκεια. Η χρωματική αραίωση είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι τα μελανοσώματα των μελανοκυττάρων, απουσία της Rab27, δεν μπορούν να μεταφερθούν στην περιφέρεια των μελανοκυττάρων και παραμένουν σε περιπυρηνικές περιοχές. Από την άλλη, τα λυτικά κοκκία των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν μειωμένη έκκριση (Menasche et al., 2000). Σήμερα, η Rab27 είναι γνωστό πως εντοπίζεται σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορφών εκκριτικών κυστιδίων και ελέγχει την έκκρισή τους (Fukuda, 2008).

Ποιο, όμως, είναι το βήμα στο εκκριτικό μονοπάτι που ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη αυτή; Τεχνικές μικροσκοπίας έχουν δείξει μειωμένο αριθμό κυστιδίων, σταθερά προσδεμένων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, σε κύτταρα PC12, στα οποία έχει αποσιωπηθεί η Rab27 (Tsuboi and Fukuda, 2006). Ανάλογο φαινόμενο παρουσιάζουν κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Stinchcombe et al., 2001) και κύτταρα της υπόφυσης ποντικών (Gomi et al., 2007), μετά από απαλοιφή του γονιδίου αυτού. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή έχει σχετιστεί και με τη δημιουργία και ωρίμανση των κυστιδίων, αφού σε ποντίκια που έχει απαλειφθεί το γονίδιο της Rab27b, ο αριθμός των πυκνών κοκκίων των αιμοπεταλίων είναι σημαντικά μικρότερος (Gomi et al., 2007). Συνοπτικά, λοιπόν, φαίνεται να ρυθμίζει τον ελλιμενισμό των κυστιδίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και, σε μία περίπτωση, τον σχηματισμό τους.

1.6.1 Πολλαπλοί τελεστές της Rab27

Η ταυτοποίηση των ειδικών μορίων-τελεστών της εκάστοτε Rab, αποτελεί το βασικό βήμα προς την κατανόηση του μηχανισμού, με τον οποίο πραγματοποιείται η ρύθμιση της κυστιδιακής μεταφοράς, στην οποία η κάθε Rab συμμετέχει. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί 14 τελεστές της Rab27. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται exophilins (exocytosis-associated rabphilin3/granophilin-like proteins) ή Slps (synaptotagmin-like proteins) / Slac2s (Slp homologous lacking C2 domains). Περιέχουν μία συντηρημένη περιοχή στο αμινο-τελικό τους άκρο, υπεύθυνη για την πρόσδεσή τους στη Rab27, που ονομάζεται RBD (Rab binding domain) ή SHD (Slp homology domain). Εξαιρέση αποτελεί η Munc13-4, που δεν τη διαθέτει. Το καρβόξυ-τελικό τους άκρο, από την άλλη, εμφανίζει χαμηλό βαθμό συντήρησης. Αρκετές, εμφανίζουν δύο C2 περιοχές, σε σειρά, μέσω των οποίων μπορεί να πραγματοποιείται η πρόσδεσή τους σε φωσφολιπίδια, με ένα ασβέστιο-εξαρτώμενο ή μη τρόπο. Οι exophilins 3, 5 και 8 στερούνται αυτών των C2 περιοχών. Συγκεκριμένα, για τις Slac2-a (exophilin 3) και Slac2-c (exophilin 8) έχει βρεθεί να διαθέτουν, στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο, coiled-coil περιοχές, μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με τη μυοσίνη Va και VIIa αντίστοιχα (Fukuda, 2005; Izumi, 2007).



Εικόνα 1.15: Αναπαράσταση των διαφορετικών περιοχών της δομής των γνωστών τελεστών της Rab27. Όλες, εκτός από τη Munc13-4, περιέχουν μία συντηρημένη περιοχή στο αμινο-τελικό τους άκρο για την αλληλεπίδραση με τη Rab27. Η περιοχή αλληλεπίδρασης της Munc13-4 με τη Rab27 έχει χαρτογραφηθεί μεταξύ των περιοχών C2 και MHD1 του μορίου.

Η ύπαρξη πολλαπλών τελεστών, με διαφορεική έκφραση στους διάφορους ιστούς, μπορεί να υποδηλώνει ότι ο ρόλος της Rab27 ποικίλει στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, ανάλογα με το μόριο-τελεστή που χρησιμοποιεί κάθε φορά. Επιπρόσθετα, η granuphilin, η rabphilin και η Noc2 είναι κοινοί τελεστές των Rab27, Rab3 και Rab8, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση των λειτουργιών των Rab αυτών (Fukuda et al., 2004; Kuroda et al., 2002a).

1.6.2 Λειτουργίες των τελεστών της Rab27

Με ποιους μηχανισμούς, όμως, οι τελεστές της Rab27 διαμεσολαβούν τη δράση της; Το γενικό προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει την ενεργοποιημένη Rab27, εντοπισμένη στη μεμβράνη ενός εκκριτικού κυστιδίου, να αλληλεπιδρά με ένα τελεστή, μέσω του αμινο-τελικού άκρου αυτού. Ο τελεστής λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ του κυστιδίου και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αφού, μέσω του καρβοξυ-τελικού του άκρου, αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες ή φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Εικόνα 1.16A) (Fukuda, 2006).

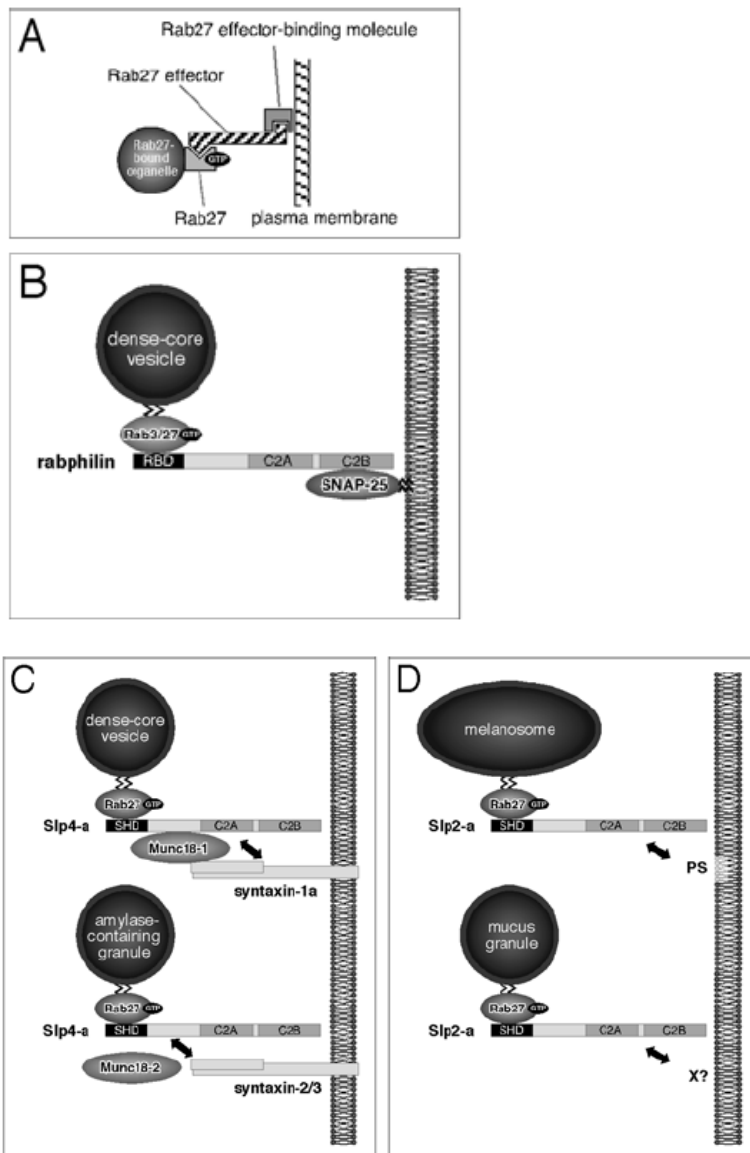
Το γενικό αυτό μοντέλο υφίσταται μερικές τροποποιήσεις, ανάλογα με τον εκάστοτε τελεστή, οπότε στο σημείο αυτό θα δώσουμε μία περίληψη της γνώσης για καθένα από αυτούς.

Exophilin 1 / Rabphilin: Η πρωτεΐνη αυτή έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τις Rab27, Rab3 και Rab8, μέσω του αμινο-τελικού της άκρου. Μέσω του καρβοξυ-τελικού της άκρου, μπορεί να αλληλεπιδράσει με φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και PIP₂ (Chung et al., 1998), και την πρωτεΐνη σύντηξης, SNAP25 (Εικόνα 1.16B). Υπερέκφρασή της, σε PC12 κύτταρα, αυξάνει τον αριθμό των σταθερά προσδεμένων, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυστιδίων και την επαγόμενη έκκρισή τους (Tsuboi et al., 2007).

Exophilin 2 / Granuphilin / Slp4: Η granuphilin βρέθηκε, αρχικά, στα παγκρεατικά β κύτταρα, να διακοσμεί την κυτταροπλασματική μεμβράνη και τη μεμβράνη των κυστιδίων ινσουλίνης (Wang et al., 1999). Είναι υπεύθυνη για την παραμονή των κυστιδίων στην περιφέρεια του κυττάρου, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη σύντηξης syntaxin 1a. Υπερέκφρασή της, όμως, οδηγεί σε μείωση της επαγόμενης έκκρισης ινσουλίνης. Αυτό φάνηκε να οφείλεται στο γεγονός ότι η granuphilin, μέσω ενός παράγοντα πρόσδεσης, της πρωτεΐνης Munc18-1, αλληλεπιδρά με την κλειστή διαμόρφωση της syntaxin 1a. Στη διαμόρφωση αυτή, η syntaxin 1a δεν μπορεί να

σχηματίζει σύμπλοκο με τις άλλες SNAREs και να ολοκληρώσει τη μεμβρανική σύντηξη (Εικόνα 1.16C) (Gomi et al., 2005).

Exophilin 3 / Melanophilin / Slac2-a: Η melanophilin λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ της Rab27, των κυστιδίων και της myosin Va. Σχηματίζεται, έτσι, ένα σύμπλοκο απαραίτητο για τη μετακίνηση των μελανοσωμάτων στην περιφέρεια των μελανοκυττάρων. Επίσης, ενεργοποιεί και τη δράση ΑΤΡάσης της μυοσίνης (Hume et al., 2006).



Εικόνα 1.16: Θεωρητικό μοντέλο για το μηχανισμό ελλιμενισμού που διαμεσολαβείται από τις Slps και τη Rabphilin. (A) Η ενεργός μορφή της Rab27a εντοπίζεται στη μεμβράνη ενός οργανιδίου. Ο τελεστής της λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ του οργανιδίου και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αλληλεπιδρώντας, μέσω του αμινο-τελικού του άκρου, με τη Rab27a του οργανιδίου και, μέσω του καρβοξυ-τελικού του, με πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια της μεμβράνης. (B) Στα πυκνά κοκκία των

PC12 κυττάρων η Rab27a αλληλεπιδρά με το αμίνο-τελικό άκρο της rabphilin. Ο τελεστής αυτός, μέσω του καρβόξυ-τελικού του άκρου, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SNARE της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, SNAP-25, επάγοντας τη σύντηξη των κοκκίων. (C) Η Slp-4, στα πυκνά κοκκία των PC12 κυττάρων, αλληλεπιδρά από τη μία με τη Rab27a των οργανιδίων και από την άλλη με τη Munc18-1. Αυτή με τη σειρά της, αλληλεπιδρά με την κλειστή διαμόρφωση της SNARE syntaxin-1a, εμποδίζοντας τη σύντηξη των οργανιδίων. Στα κοκκία αμυλάσης, ο ίδιος τελεστής αλληλεπιδρά με τη SNARE syntaxin-2/3, με ένα Munc18-1 – εξαρτώμενο τρόπο. (D) Η Slp2-a συνδέει τα μελανοσώματα και τα κοκκία βλέννης με φωσφολιπίδια της μεμβράνης.

Exophilin 4 / Slp2-a: Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για τον περιφερειακό εντοπισμό των μελανοσωμάτων (Kuroda and Fukuda, 2004) και των κοκκίων γλυκαγόνου, μέσω της αλληλεπίδρασης της C2A περιοχής της με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης PS και PIP₂ (Εικόνα 1.16D). Η δράση της αυτή αναστέλλεται μετά από αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, μετά δηλαδή από ενεργοποίηση του κυττάρου (Yu et al., 2007).

Exophilin 5 / Slac2-b: Ο ρόλος της παραμένει άγνωστος.

Exophilin 6 / Slp3: Ελάχιστα μελετημένη είναι και αυτή η πρωτεΐνη. Πιθανώς, μέσω αλληλεπιδράσεων με φωσφολιπίδια της μεμβράνης να επάγει την έκκριση στα PC12 κύτταρα (Fukuda et al., 2002).

Exophilin 7 / JFC1 / Slp1: Η JFC1, μέσω της C2A περιοχής της, αλληλεπιδρά με PIP₃. Αποσυνδέεται από τη μεμβράνη μετά την, επαγόμενη από ενεργοποιητή, ενδοκυττάρια εισροή ιόντων ασβεστίου. Έχει βρεθεί σε κυστίδια των ουδετερόφιλων και καρκινικών κυττάρων προστάτη, LNCap (Johnson et al., 2005) (Brzezinska et al., 2008).

Exophilin 8 / MyRIP / Slac2-c: Η MyRIP εκφράζεται σε φωτοδεκτικά κύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή και στα PC12 κύτταρα. Μέσω της καρβόξυ-τελικής περιοχής της αλληλεπιδρά με τη μυοσίνη VIIa (Kuroda et al., 2005). Έχει δειχτεί να παρουσιάζει ποικίλους ρόλους, θετικούς (Waselle et al., 2003) ή αρνητικούς (Desnos et al., 2003), στην έκκριση, ανάλογα με το κάθε σύστημα.

Exophilin 9 / Slp5: Έχει βρεθεί σε παγκρεατικά β κύτταρα και σε κύτταρα PC12 και, μέσω αλληλεπιδράσεων με φωσφολιπίδια, επάγει τη ρυθμιζόμενη έκκριση (Kuroda et al., 2002b).

Noc2: Αρχικά, αναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη των παγκρεατικών νησιδίων (Kotake et al., 1997). Πειράματα υπερέκφρασης έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς το αν πρόκειται για θετικό ή αρνητικό ρυθμιστή της έκκρισης. Ποντίκια στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο της Noc2, όμως, παρουσίασαν πλήρη αναστολή της έκκρισης

αμυλάσης από παγκρεατικά βοτρυοειδή κύτταρα (Matsumoto et al., 2004). Ο μηχανισμός δράσης της, όμως, παραμένει άγνωστος.

Munc13-4: Είναι το τέταρτο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Munc13, και το μοναδικό που εκφράζεται εκτός του νευρικού συστήματος. Έχει βρεθεί, στα λυτικά κοκκία των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (Yamamoto et al., 2004) και στα αζουρόφιλα κοκκία των ουδετερόφιλων κυττάρων (Pivot-Pajot et al., 2008), να διαδραματίζει θετικό ρόλο στην έκκρισή τους. Δομικά διαφέρει από τους υπόλοιπους τελεστές της Rab27. Δε διαθέτει την RBD περιοχή, αλλά δύο MHDs (Munc13 homology domains) και δύο C2 περιοχές, μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με λιπίδια (Koch et al., 2000).

Η πολυπλοκότητα, στη μελέτη της ρύθμισης της έκκρισης από μία Rab GTPάση, φαίνεται αν στην ιστοειδικότητα της έκφρασης της ίδιας και των τελεστών της και στις αλληλεξαρτήσεις που παρουσιάζει με άλλες Rabs, προστεθεί και ο διακριτός ρόλος που μπορεί να παρουσιάζει ο ίδιος τελεστής μεταξύ διαφορετικών συστημάτων.

Από όλα τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ρύθμιση της έκκρισης δεν παρουσιάζει ένα καθορισμένο πρότυπο, αλλά έχει σαφείς διαφορές ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το εκκριτικό οργανίδιο και το μεταφερόμενο φορτίο.

1.7 Μηχανισμοί έκκρισης των WPBs

Ποιος είναι, λοιπόν, ο εξειδικευμένος μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στην έκκριση των WPBs; Τρία μέλη της οικογένειας των SNARE έχουν, μέχρι σήμερα, αναγνωριστεί ως υπεύθυνα για τη σύντηξη των κυστιδίων αυτών με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Πρόκειται για τις VAMP3, syntaxin 4 και SNAP23. Η σφιχτή τεταρτοταγής δομή που σχηματίζεται μεταξύ της VAMP3, των WPBs, και των syntaxin 4 και SNAP23, της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, είναι απαραίτητη για τη σύντηξη (Pulido et al., 2010). Αντισώματα έναντι της syntaxin 4 μειώνουν την έκκριση κατά 75%, ενώ αντίσωμα έναντι των VAMPs μειώνει την έκκριση κατά 25% (Fu et al., 2005; Matsushita et al., 2003).

Από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Rab, η Rab27a και η Rab3d έχουν βρεθεί να εντοπίζονται στα WPBs και να ρυθμίζουν την έκκρισή τους. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με τη Rab27 βρέθηκε πως ο εντοπισμός της στα WPBs εξαρτάται από τον βαθμό ωρίμανσης των οργανιδίων αυτών, με την πρωτεΐνη να εντοπίζεται μόνο στα ώριμα οργανίδια. Αν και ο μηχανισμός στόχευσής της στα WPBs είναι άγνωστος, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως καθοδηγείται από το φορτίο (τον vWF), ανεξάρτητα

κυτταρικού τύπου. Ετερόλογη έκφραση, δηλαδή, του vWF σε HEK-293 κύτταρα οδήγησε στη δημιουργία WPBs, που έφεραν στην επιφάνειά τους τη Rab27 (Hannah et al., 2003). Μέχρι το 2009 η σημασία αυτού του εντοπισμού παρέμενε άγνωστη. Τότε, και ενώ η παρούσα μελέτη βρισκόταν σε εξέλιξη, οι T.D. Nightingale et al δημοσίευσαν πως η Rab αυτή εμποδίζει τα ανώριμα WPBs να εκκριθούν, αφού, μέσω του τελεστή MyRIP, τα εγκλωβίζει στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Nightingale et al., 2009). Αναφορικά με τη Rab3d, βρέθηκε πως η πρωτεΐνη αυτή στην ενεργό μορφή της προκαλούσε εμφάνιση μεγαλύτερων, σφαιρικών WPBs, ενώ παρεμπόδιζε την έκκρισή τους. Αντίθετα, υπερέκφραση της ανενεργούς μορφής της Rab3d οδήγησε σε μικρότερο αριθμό WPBs στα HUVEC (Knop et al., 2004). Και οι δύο, λοιπόν, μέχρι σήμερα γνωστές Rab GTPάσες των WPBs έχειδειχθεί να παρεμποδίζουν την έκκρισή τους. Η διαπίστωση αυτή δημιουργεί αυτόματα το ερώτημα αναφορικά με το ποιος είναι ο μηχανισμός, μέσω του οποίου η έκκριση επιτυγχάνεται. Επιπλέον, και επειδή οι Rab GTPάσες έχειδειχθεί σε πλήθος συστημάτων να διευκολύνουν την κυστιδιακή μεταφορά, αναρωτιέται κανείς μήπως άλλα μέλη της οικογένειας αυτής είναι αυτά που επιτρέπουν την έκκριση των WPBs.

1.8 Σκοπός της εργασίας

Ενώ έχουν περάσει 45 χρόνια από την ανακάλυψη των WPBs, η γνώση μας σχετικά με τους μηχανισμούς που ελέγχουν την έκκρισή τους παραμένει φτωχή. Λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο των Rab GTPασών στη μετακίνηση και σύντηξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανικών οργανιδίων με τις μεμβράνες-στόχους, ορίσαμε ως σκοπό της παρούσας διατριβής:

- Την ταυτοποίηση όλων των Rab GTPασών του ανθρώπινου γονιδιώματος που εντοπίζονται στα WPBs.
- Τη διερεύνηση του ρόλου των ταυτοποιηθέντων Rab GTPασών στη σύντηξη των WPBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και, τέλος,
- την περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού έκκρισης, μέσω ταυτοποίησης πρωτεϊνών-τελεστών, με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι Rab GTPάσες των WPBs, και τη διερεύνηση του ρόλου τους στην εκκριτική διαδικασία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

Τα αντιδραστήρια phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) και ATP προήλθαν από την εταιρία Sigma. Ο ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας VEGF165 και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας bFGF-2 από την εταιρία ImmunoTools, ενώ η ανθρώπινη α-θρομβίνη από την Enzyme Research Laboratories.

Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Rab27a παρασκευάστηκε από την εταιρία Davids για λογαριασμό μας και καθαρίστηκε από την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, με χρήση sulfolink gel. Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Rab3d ήταν δώρο του R.Jahn. Το μονοκλωνικό αντίσωμα 9E10 (anti-myc) καθαρίστηκε από αντίστοιχα κύτταρα-υβριδώματα, χρησιμοποιώντας καθιερωμένες τεχνικές. Το πολυκλωνικό anti-GFP είναι προϊόν συνεργασίας μας με το εργαστήριο της Χ.Μπολέτη (Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα). Το μονοκλωνικό anti-tubulin προήλθε από τον Μ.Κlymkowsky. Το μονοκλωνικό και τα πολυκλωνικά αντισώματα anti-human vWF (M0616, A0082 και P0226), που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν από την εταιρία Dakocytomation. Το μονοκλωνικό anti-Flag αντίσωμα ήταν της εταιρίας Sigma. Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Munc13-4 ήταν δώρο από τον Δρ. Η.Horiuchi. Τα αντισώματα Alexa 488 και 595nm (αντι-κονίκλου και αντι-ποντικού) ήταν της εταιρίας Invitrogen.

2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας και χειρισμού κυττάρων

2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC), απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I και πλυθεί με PBS. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν M199 εμπλουτισμένο με 20% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS), 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), 0,05 IU ηπαρίνης/ml, 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά σε αραιώση 1:4. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2-4.

Ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού 293 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό βοός και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά σε αραιώση 1:4.

Η κυτταρική σειρά ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων νεφρού 293α, που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των αδενοϊών, καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό βοός, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 1% NEA (non essential aminoacids) και 0,34% D-γλυκόζη. Όπως και προηγουμένως, η διασπορά τους γινόταν, σε αραιώση 1:4, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.

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

2.2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου

Για την απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVEC) χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή της μεθόδου των Jaffe E.A et al. (Jaffe et al., 1973). Η πηγή των κυττάρων ήταν φρέσκος ομφάλιος λώρος, ο οποίος μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας του διατηρήθηκε σε πάγο. Με τη χρήση σύριγγας, μετά από ψηλάφηση, εντοπίστηκε η φλέβα του λώρου και πλύθηκε με 50 ml διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffer Saline). Ακολούθως, φράχθηκαν τα άκρα του λώρου, με τη βοήθεια βαλβίδων τριών σημείων (three way stop cocks) και δέθηκαν με χειρουργικό νήμα. Ακολούθησε διαποτισμός της φλέβας με 0.1% διάλυμα κολλαγενάσης σε HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) και επώαση του λώρου σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 12 min. Για την απενεργοποίηση της κολλαγενάσης, ο λώρος πλύθηκε με 10 ml πλήρες θρεπτικό υλικό για HUVEC. Ακολούθησαν πλύσεις με 3x10 ml διάλυμα φωσφορικών PBS. Το διάλυμα (40 ml συνολικά) συλλέχθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρησης, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 1000 rpm και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού για HUVEC και καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο.

2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA και siRNA

Για τη διαμόλυνση κυττάρων HUVE με DNA χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontex). Τα κύτταρα, τη στιγμή της διαμόλυνσης, βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 60-70% και είχαν ομοιόμορφη κατανομή στο τρυβλίο. Το λιπίδιο METAFECTENE Pro, σε αναλογία με το DNA 3:1 και σε διάλυμα M199, μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, αποτέλεσε το μίγμα διαμόλυνσης, το οποίο προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονταν σε υλικό καλλιέργειας M199, εμπλουτισμένο με 5% FCS. Διατηρήθηκε για 4 ώρες, πριν αντικατασταθεί με πλήρες μέσο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες μετά από 48 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Η διαμόλυνση των κυττάρων 293 και 293α, για διάφορα πειράματα ελέγχου και για την αρχική παραγωγή των αδενοϊών, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε με το λιπίδιο Lipofectamine2000 (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι διαμολύνσεις με siRNAs πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE με το λιπίδιο RNAiMax (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αραίωση των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε το χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό υλικό OptiMEM I (Invitrogen). Η τελική συγκέντρωση του κάθε siRNA ήταν 25 nM. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν, στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες, μετά από 72 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Τα siRNAs, που χρησιμοποιήθηκαν, προήλθαν από τις εταιρίες Ambion και Biospring.

Η διαμόλυνση ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων νεφρού 293 με DNA και siRNA πραγματοποιήθηκε, για τον έλεγχο της δραστηριότητας των siRNAs της Rab27b και Rab27a έναντι της υπερεκφρασμένης myc-Rab27b, με τα αντιδραστήρια PEI (polyethyleneimine της εταιρίας Fluka) και Lipofectamine2000 (Invitrogen), αντίστοιχα. Τα κύτταρα βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 40-50% και είχαν ομοιόμορφη κατανομή στο τρυβλίο. Για τη διαμόλυνση με DNA, σε τρυβλίο 24 φρεατίων, χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαμόλυνσης, αποτελούμενο από 0,07% PEI και 0,35 μg DNA, το οποίο προστέθηκε σε κύτταρα που βρίσκονταν σε 200 μl πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Τέσσερις ώρες αργότερα, ακολούθησε η διαμόλυνση με το siRNA, που πραγματοποιήθηκε με το λιπίδιο Lipofectamine2000, το χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό υλικό OptiMEM I και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η τελική συγκέντρωση του siRNA ήταν 25 nM και τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά Western, μετά από 72 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂.

2.2.4 Ενεργοποίηση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προς έκκριση του vWF

Η ενεργοποίηση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε όταν αυτά βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 100% (κατάσταση συρροής), οπότε και κάλυπταν πλήρως την επιφάνεια επίστρωσης. Ως ενεργοποιητές χρησιμοποιήθηκαν οι παράγοντες: ATP (100 μ M), Thrombin (1 U/ml), PMA (100 ng/ml), VEGF (50 ng/ml), bFgf (15 ng/ml) καθώς επίσης και ο συνδυασμός ATP/bFgf/VEGF. Η ενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε ως εξής: Κύτταρα HUVE πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα HBSS. Ακολούθησε προσθήκη του ενεργοποιητή σε διάλυμα HBSS (με 20% HEPES) και 0,1% BSA, για διάφορα χρονικά διαστήματα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Στο τέλος, το υλικό επώασης συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 1000 rpm και το υπερκείμενο διατηρήθηκε στους -20 °C. Για τη συλλογή δείγματος που αντιστοιχεί στην ιδιοστατική έκκριση του vWF, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, μόνο που τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν μόνο με διάλυμα HBSS – 0,1% BSA, απουσία ενεργοποιητή, για τα ίδια ακριβώς χρονικά διαστήματα. Τέλος, για τη συλλογή δείγματος για τη μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του vWF, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με διάλυμα 0,2% Triton – 1 mM EDTA, φυγοκέντρηση των δειγμάτων, για 10 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C, και διατήρηση των υπερκείμενων στους -20 °C. Για την ποσοτικοποίηση του vWF, στους τρεις παραπάνω τύπους δείγματος, ακολουθήθηκε μεθοδολογία τύπου ELISA (βλέπε 2.5.3).

2.3 Μοριακές μέθοδοι

2.3.1 Απομόνωση RNA –Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητάς του

Κύτταρα HUVE, μάρτυρες ή αυτά που είχαν διαμολυνθεί με siRNAs, συλλέχθηκαν και απομονώθηκε το συνολικό RNA από το κάθε δείγμα, με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος Rneasy Micro Kit (Qiagen).

Προκειμένου να υπολογίσουμε την ποσότητα του RNA, ίσοι όγκοι από κάθε δείγμα φωτομετρήθηκαν στα 260 nm. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε από τον τύπο: Συγκέντρωση RNA = 44 x A₂₆₀ x Συντελεστής αραιώσης, όπου A₂₆₀ είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και συντελεστής αραιώσης είναι η αραιώση του δείγματος σε 0,5 ml 10 mM Tris, pH 7.5, στη γυάλινη κυβέτα φωτομέτρησης. Ως προς την αξιολόγηση της ποιότητας του RNA, το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε στα 260 nm και 280 nm και

υπολογίστηκε ο λόγος A_{260}/A_{280} . Υψηλής ποιότητας RNA θεωρήθηκε μόνο αυτό που ο λόγος A_{260}/A_{280} ήταν μεταξύ 1.8 – 2.1.

2.3.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης qRT-PCR

Η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) επιτυγχάνει υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας δοκιμασίας (kit) QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) ενός σταδίου. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην ενός σταδίου δοκιμασία, είναι οι ακόλουθες δύο:

A. Αντίστροφη μεταγραφή. Με την παρουσία ενός μίγματος ανάστροφων μεταγραφασών (Omniscrypt & Sensiscrypt) παράγεται το συμπληρωματικό DNA (cDNA) από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Ο συνδυασμός αυτός, των δύο ενζύμων, παρέχει υψηλή ευαισθησία και απόδοση απέναντι σε ένα μεγάλο εύρος ποσοτήτων RNA.

B. Πολλαπλασιασμός του τμήματος του DNA που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο γονίδιο, με χρήση α) των κατάλληλων εκκινήτων, σύμφωνα με τις αρχές της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, καθώς και β) της HotStarTaq DNA πολυμεράσης. Η συγκεκριμένη DNA πολυμεράση έχει την ιδιότητα να παραμένει ανενεργή, χωρίς καμία ενζυμική δράση, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ένζυμο ενεργοποιείται από ένα 15-λεπτο βήμα επώασης στους 95°C, το οποίο προστίθεται πριν από το κλασικό πρόγραμμα της PCR. Έτσι, παραμένει ανενεργή κατά τη διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής, ενώ μετά την ενεργοποίησή της, απενεργοποιεί και τις αντίστροφες μεταγραφάσες, διασφαλίζοντας, με τον τρόπο αυτό, το χρονικό διαχωρισμό των αντιδράσεων, της αντίστροφης μεταγραφής και της PCR, και επιτρέποντας, στα δύο αυτά στάδια, να πραγματοποιηθούν διαδοχικά στο ίδιο τριχοειδές.

Παρούσα στη δοκιμασία είναι και η χρωστική SYBR Green I, η οποία δένεται στο δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορίζον σήμα. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση διαφορετικών στόχων, χωρίς να χρειάζεται ανιχνευτής (probe) με ειδική αλληλουχία. Η διεγερση και η εκπομπή της SYBR Green I γίνεται στα 494nm και 521nm, αντίστοιχα. Ο κύκλος στον οποίο παρατηρείται φθορισμός μεγαλύτερος του βασικού φθορισμού (threshold cycle, Ct) εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας

στόχου. Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, γνωστές συγκεντρώσεις αρχικού RNA μπορεί να σχεδιαστεί μία πρότυπη καμπύλη φθορισμού, $Ct = a^x \log$ συγκέντρωσης και, από αυτή την καμπύλη, να υπολογιστεί και η συγκέντρωση του συγκεκριμένου RNA, στο προς εξέταση δείγμα.

Με βάση την παραπάνω διαδικασία ελέγχθηκε η ενδογενής έκφραση των Rab27a, Rab27b, Rab3a, Rab3b, Rab3c, Rab3d, Rab15, Rab33a, Rab33b, Rab37 και Munc13-4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ποσοτικοποιήθηκε η αποσιώπηση που προκαλούν εξειδικευμένα siRNAs έναντι αυτών.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού DnaStar και οι αλληλουχίες τους είναι οι ακόλουθες:

Rab27a: forward: 5'- AGCAGGGCAGGAGAGGTTTCGTA -3'
reverse: 5'- TGCTATGGCTTCCTCCTCTTTCAC -3'

Rab27b: forward: 5'- GCTCGGGAAGTGGCTGACA -3'
reverse: 5'- ACATTTCTTCTCTGGTGGCTTTTC -3'

Rab3a: forward: 5'- TCGCGCTATGGGCAGAAGGAG -3'
reverse: 5'- TCAGCATAGCGGAAGAGGAAGGAC -3'

Rab3b: forward: 5'- TTCCTCTTCCGCTATGCTGATGAC -3'
reverse: 5'- CCCACGGTAATAGGCTGTTG -3'

Rab3d: forward: 5'- TGTGGGCATCGATTTCAAGGTCAA -3'
reverse: 5'- CCCATGGCTCCCCGGTAGTAGG -3'

Rab15: forward: 5'- GCTGTTCCGGCTGCTGCTGAT -3'
reverse: 5'- CCCGCCGATAGTACTGCTTTGTGA -3'

Rab33a: forward: 5'- ACCTGCCTGACCTTCCGCTTCTG -3'
reverse: 5'- GCCCTCGATTTCCACGGTCTTC -3'

Rab33b: forward: 5'- GCCCGCTCCCGCATCTTCA -3'
reverse: 5'- TGCGCTCCCCATCAATCTCCAC -3'

Rab37: forward: 5'- CTGTGGATGGCGTGAGAGTGAAGC -3'
reverse: 5'- GGCCCTGATGTTGTTCGAAAGAAGA -3'

Munc13-4: forward: 5'- GCGGGCCCTGCTCTACGA -3'
reverse: 5'- CCCTTGGCCTGTTTCACTGTTG -3'

Έτσι, σε ένα τελικό όγκο 20 μl υπήρχαν 100 ή 50 ng από το υπό εξέταση δείγμα, 0,3 μM από τον κάθε εκκινητή, μίγμα δύο RNA πολυμερασών (Omniscript & Sensiscript),

HotStarTaq DNA πολυμεράση, μίγμα δεόξυριβονουκλεοτιδίων, SYBR Green I και MgCl₂. Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις RNA (από 1-200 ng), προερχόμενο από κύτταρα HUVE. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, για το κάθε στάδιο και για το κάθε γονίδιο, σχεδιάστηκαν όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο LightCycler 2.0 (Roche).

<i>Γονίδιο</i>	<i>Στάδιο</i>	<i>Χρόνος</i>	<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Ρυθμ. μεταβ. θερμ.</i>
Rab27a	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	54 °C	20 °C/s
	Extension	12 s	72 °C	2 °C/s
Rab27b	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	54 °C	20 °C/s
	Extension	11 s	72 °C	2 °C/s
Rab3a	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	12 s	72 °C	2 °C/s
Rab3b	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	10 s	72 °C	2 °C/s
Rab3d	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	10 s	72 °C	2 °C/s

Rab15	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	12 s	72 °C	2 °C/s
Rab33a	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	10 s	72 °C	2 °C/s
Rab33b	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	10 s	72 °C	2 °C/s
Rab37	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	59 °C	20 °C/s
	Extension	12 s	72 °C	2 °C/s
Munc13-4	Rev. transcription	20 min	50 °C	20 °C/s
	PCR in. act. step	15 min	95 °C	20 °C/s
	Denaturation	15 s	94 °C	20 °C/s
	Annealing	20 s	57 °C	20 °C/s
	Extension	12 s	72 °C	2 °C/s

Η θερμοκρασία τήξης, προκειμένου να ελέγξουμε την ειδικότητα των προϊόντων, τέθηκε στους 60 °C, ενώ τα τελικά προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και η ηλεκτροφορητική τους ταχύτητα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη προϊόντων απλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και τα αντίστοιχα cDNA, ως εκμαγεία.

2.3.3. Κατασκευές DNA

Οι DNA κατασκευές myc-Rab27a wt (αγρίου τύπου), myc-Rab27aQ78L (ενεργός μορφή), myc-Rab27aT23N και myc-Rab27aN133I (ανεργές μορφές) και η myc-Rab27b wt, καθώς επίσης και η myc-Munc13-4, ήταν μία ευγενική προσφορά του H.Horiuchi. Οι DNA κατασκευές GFP-Rab(1-43) ήταν μία ευγενική προσφορά του M. Fukuda.

Η ανθρώπινη Rab27aQ78L, που χρησιμοποιήθηκε για το σύστημα δύο υβριδίων, κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την ανθρώπινη Rab27a wt ως εκμαγείο και προκαλώντας σημειακή μετάλλαξη με τρεις αντιδράσεις PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις δύο πρώτες αντιδράσεις ήταν οι 5'-GGCGAATTCATGTCTGATGGAGATTATGAT-3', 5'-AACCTCTCCAGCCCT GCTG-3' και 5'-CAGCAGGGCTGGAGAGGTT-3', 5'-CCGCTCGAGTCAACAGCCACATGCCCC-3', ενώ ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το cDNA της ανθρώπινης Rab27a wt. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων ως εκμαγείο και τους εκκινητές 5'-GGCGAATTCATGTCTGATGGAGATTAT GAT -3' και 5'-CCGCTCGAGTCAACAGCCACATGCCCC-3' πραγματοποιήθηκε η τρίτη αντίδραση PCR. Το τελικό προϊόν κλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoRI/SalI του φορέα pLexA-N.

Οι κατασκευές flag-Rab27a wt, flag-Rab27aQ78L και flag-Rab27aN133I κατασκευάστηκαν ως εξής: Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τους cDNA κλώνους των myc-Rab27a wt, myc-Rab27aQ78L και myc-Rab27aN133I πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους εκκινητές 5'-CCACGCGGCCGCCCATGGGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGAGGTGGAATGTCGGATGGAGATTATGAC-3' και 5'-CCTCTAGAGCTAGCGGATCCTCAACAGCGCATAACCC-3'. Τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις NotI/XbaI του πλασμιδιακού φορέα pCDNA3.

Όλες οι DNA κατασκευές, που χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση κυττάρων HUVE, ήταν ελεύθερες ενδοτοξίνης. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας Endotoxin-free plasmid midiprep (Sigma).

2.3.4.α. Κατασκευή και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Αναςυνδυασμένοι αδενοϊοί κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την αναφορά (He et al., 1998). Όλοι οι φορείς και τα στελέχη βακτηρίων για τη δημιουργία των αδενοϊών ήταν ευγενική προσφορά των C.Murphy και Θ.Φώτση.

Οι αδενοϊοί, που χρησιμοποιήθηκαν, εξέφραζαν είτε την αγρίου τύπου Rab27a, είτε τις μορφές Rab27aQ78L και Rab27aN133I, σημασμένες, στο N-τελικό άκρο, με τον επίτοπο flag. Αναλυτικότερα, οι flag-Rab27a wt, flag-Rab27aQ78L και flag-Rab27aN133I κλωνοποιήθηκαν στη θέση NotI/XbaI του φορέα έκφρασης pShuttle-CMV. Για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια BJ5183. Έτσι, καθένα από τα παραπάνω πλασμίδια υποβλήθηκε σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI και αναμείχθηκε με το σκελετό-φορέα pAdEasy1, που περιέχει όλο το γονιδίωμα του αδενοϊού, εκτός από τις περιοχές των πρώιμων γονιδίων E1 και E3. Η επιλογή των αποικιών έγινε με τη χρήση 50 μg/ml καναμυκίνης. Οι αποικίες αναλύθηκαν αρχικά σε πηκτή αгарόζης, ανάλογα με το υπερελικωμένο μέγεθος του DNA τους, αλλά και με ενδεικτικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PacI και BamHI. Επίσης, ως αδενοϊός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε ο αδενοϊός που εξέφραζε τη β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ), που ήταν επίσης προσφορά των C.Murphy και Θ.Φώτση.

Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά πακεταρίσματος 293α (packaging line), η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των παραγόμενων αδενοϊών, προμηθεύοντάς τους με τα προϊόντα των γονιδίων που τους λείπουν (E1 και E2). Τα παραπάνω ανασυνδυασμένα πλασμίδια, μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση PacI, χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων 293α με τη χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου Lipofectamine2000. Οι αδενοϊοί, που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μεσαίας κλίμακας αδενοϊών, μετά από διαδοχικές ενισχύσεις.

2.3.4.β. Τιτλοποίηση ιών και συνθήκες μόλυνσης κυττάρων

Όλοι οι ιοί πολλαπλασιάστηκαν σε 293α κύτταρα και ο ιικός τίτλος προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία ιικής πλάκας. 293α κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων μέχρι να καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας. Στη συνέχεια, έγινε μόλυνση των κυττάρων με διαφορετικές αραιώσεις του κάθε ιού (εύρος από 10^{-2} – 10^{-6}), για 4 ώρες. Ακολούθως, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα και προσθήκη 4 ml διαλύματος αгарόζης (20 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂, 1% αгарόζη σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640), στο κάθε φρεάτιο, το οποίο και παρέμεινε 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να πήξει. Τέλος, προστέθηκε PBS στα μεσοδιαστήματα των φρεατίων (προκειμένου να μην ξεραθεί η παγωμένη αгарόζη και σπάσει), το τρυβλίο σφραγίστηκε με μεμβράνη και ακολούθησε επώαση σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 37 °C και

η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Οι ικές πλάκες αναπτύχθηκαν μετά από περίπου 10 μέρες και αναγνωρίστηκαν ως μεμονωμένες εστίες λύσης των κυττάρων. Από τον αριθμό των ικών πλακών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά φρεάτια, τα οποία αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές αραιώσεις του ιού, υπολογίστηκε ο ικός τίτλος (ικά σωματίδια/μl).

Προκειμένου να μολυνθούν και να εκφράσουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, τα HUVE κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν, όταν βρίσκονταν σε κατάσταση 80-90% κάλυψης της επιφάνειας του τρυβλίου τους, με τους ανασυνδυασμένους ιούς, σε αναλογία ικών σωματίων/αριθμός κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI), όπως αναφέρεται ανά περίπτωση. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενώ το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων εξετάστηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

2.3.5 Τεχνική διπλού υβριδίου σε κύτταρα ζύμης

Το σύστημα των δύο υβριδίων αναπτύχθηκε αρχικά από τους Fields και Song, το 1989, ως μία γενετική μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσα σε ένα κυτταρικό περιβάλλον. Εκμεταλλεύεται την ιδιότητα πολλών μεταγραφικών παραγόντων να αποτελούνται από δύο λειτουργικά διακριτές περιοχές: η μία διαμεσολαβεί την πρόσδεση στο DNA και η άλλη ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Ως δόλωμα χρησιμοποιήθηκε η hRab27aQ78L (η διαρκώς ενεργή μορφή της Rab27a), που κλωνοποιήθηκε σε φορέα ζύμης, συντηγμένη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain-DBD) ενός μεταγραφικού παράγοντα. Ως θήραμα χρησιμοποιήθηκαν τα cDNA βιβλιοθήκης από ανθρώπινο πλακούντα, τα οποία κλωνοποιήθηκαν σε δεύτερο φορέα, συντηγμένα με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD, activation domain), του ίδιου με το δόλωμα μεταγραφικού παράγοντα. Ο φορέας που φέρει το δόλωμα και οι φορείς της βιβλιοθήκης που φέρουν τα θηράματα μετασχηματίστηκαν σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ζύμης, που φέρουν τρία γονίδια αναφοράς: το γονίδιο *HIS3* (που κωδικοποιεί ένα ένζυμο του μονοπατιού της ιστιδίνης στη ζύμη και επιτρέπει τη διαλογή των στελεχών εκείνων που αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό από το οποίο λείπει το αμινοξύ ιστιδίνη), το γονίδιο *ADE2* (που κωδικοποιεί ένα ένζυμο του μονοπατιού σύνθεσης της αδενίνης και επιτρέπει τη διαλογή των στελεχών εκείνων που αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό από το οποίο λείπει αυτή) και το γονίδιο *lacZ* (που κωδικοποιεί τη βακτηριακή β-γαλακτοσιδάση). Ανοδικά των γονιδίων αναφοράς υπάρχουν οι αλληλουχίες των θέσεων του χειριστή (operator), όπου προσδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας, μέσω της DBD του για να

ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς. Μόνο, λοιπόν, όταν το δόλωμα αλληλεπιδράσει με ένα θήραμα συγκροτείται ο πλήρης μεταγραφικός παράγοντας, που ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Έτσι τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης, στα οποία εκφράζεται το δόλωμα και το αλληλεπιδρών θήραμα, αναπτύσσονται σε ειδικό θρεπτικό υλικό διαλογής. Από τους θετικούς κλώνους απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA και βρίσκεται η αλληλουχία του.

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής είναι η συχνή απομόνωση των λεγόμενων ‘false-positive interactors’. Πρωτεΐνες-θηράματα που προσδένονται στο DNA ανοδικά των γονιδίων αναφοράς, μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή, χωρίς να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-δόλωμα, ενώ άλλες μπορούν να τροποποιήσουν το μεταβολισμό στη ζύμη, με τρόπο ώστε τα κύτταρα να αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά διαλογής, χωρίς τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς. Όλες οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τη σάρωση, λοιπόν, ελέγχονται για την αλληλεπίδρασή τους με την πρωτεΐνη-δόλωμα, με χρήση μιας στρατηγικής διασταύρωσης. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη-δόλωμα που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική σάρωση, καθώς επίσης και ορισμένα δολώματα-μάρτυρες (LexA-laminC, LexA-p53) μετασχηματίζονται σε στέλεχος αναφοράς τύπου διασταύρωσης α , ενώ οι πρωτεΐνες που έχουν προκύψει από τη σάρωση σε ένα τύπου α στέλεχος αναφοράς. Τα στελέχη διασταυρώνονται σε ένα πλήρες θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια μεταφέρονται σε θρεπτικά υλικά διαλογής. Τα διπλοειδή στελέχη που εκφράζουν την πρωτεΐνη-δόλωμα και θήραμα αναπτύσσονται στο θρεπτικό διαλογής μόνο αν οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν. Μόνο οι πρωτεΐνες-θηράματα που ενεργοποιούν και τα δύο γονίδια αναφοράς, όταν συνεκφράζονται με την πρωτεΐνη-δόλωμα, αλλά όχι με τα δολώματα-μάρτυρες, θεωρούνται αξιόπιστες.

Η δοκιμασία αυτή πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Dualsystems Biotech AG, (Zurich, Switzerland), στο πλαίσιο συνεργασίας με το εργαστήριό μας στο πρόγραμμα “ Pulmotension ” του FP6.

2.4 Παρασκευαστικές Μέθοδοι

2.4.1 Παρασκευή κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού εκχυλίσματος από ανθρώπινο πλακούντα

Ανθρώπινος πλακούντας, αφού πλύθηκε με παγωμένο διάλυμα PBS, ομογενοποιήθηκε, παρουσία διαλύματος 20 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM

DTT και φυγοκεντρήθηκε στις 4.200 g για 30 λεπτά, στους 4°C, προκειμένου να απομακρυνθούν πυρήνες και μιτοχόνδρια. Στο υπερκείμενο προστέθηκε κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (ταμπλέτες Roche) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 100.000 g στους 4°C για 1 ώρα. Το υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης αποτέλεσε το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα 20 mM Hepes, pH:7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA και ομογενοποιήθηκε στον ομογενοποιητή Wheaton, μέχρι να γίνει λεπτόρευστο. Ακολούθησε διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με προσθήκη 1% TritonX-100, ανάδευση για 30 λεπτά στους 4°C και υπερφυγοκέντρηση στα 100.000 g στους 4°C για 1 ώρα. Το υπερκείμενο αποτέλεσε το μεμβρανικό παρασκεύασμα πλακούντα. Το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα υπέστη διαπήδηση, σε παγωμένο διάλυμα 20 mM Hepes, pH:7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, προκειμένου να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια, που πιθανώς επηρεάζουν τη νουκλεοτιδική κατάσταση της Rab27a.

Οι αντίστοιχες παρασκευές από εγκέφαλο και σπλήνα μοσχαριού πραγματοποιήθηκαν, με την ίδια ακριβώς διαδικασία.

2.4.2 Προετοιμασία των κολώνων χρωματογραφίας συγγένειας της Rab27a

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την αναφορά (Christoforidis and Zerial, 2000). Οι χμιαϊκές πρωτεΐνες GST-Rab27a και GST-Rab5a υπερεκφράστηκαν στο βακτήριο *E.coli* BL21(DE3), το οποίο, ύστερα από μετασχηματισμό, έφερε ένα ανασυνδυασμένο pGEX πλασμίδιο. Η πρωτεϊνική έκφραση από αυτό το πλασμίδιο υπόκειται στον έλεγχο του υποκινητή tac (tac promoter), ο οποίος επάγεται χρησιμοποιώντας το ανάλογο της λακτόζης, το IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside). Έτσι, μόλις η βακτηριακή καλλιέργεια αναπτύχθηκε έως O.D._{600 nm}~0,5, στους 21°C, η πρωτεϊνική έκφραση επάχθηκε με 0,05 mM IPTG, για 16 ώρες, στην ίδια θερμοκρασία.

Μετά την επαγωγή, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με παγωμένο διάλυμα PBS, 5 mM MgCl₂, 5 μg/ml DNase, 5 μg/ml RNase, 5 mM β-mercaptoethanol, pepstatin και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (ταμπλέτες Roche). Από εδώ και πέρα, εκτός και αν αναφέρεται αλλιώς, στα διαλύματα περιέχεται νουκλεοτίδιο, GDP ή GTPγS, ανάλογα με την επιθυμητή κατάσταση της Rab. Στη Rab27a χορηγήσαμε GDP ή GTPγS, ενώ στη Rab5a, την οποία χρησιμοποιούμε ως αρνητικό μάρτυρα, χορηγήσαμε GDP. Παρουσία, λοιπόν, 200 μM του εκάστοτε νουκλεοτιδίου, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων, με χρήση της συσκευής French pressure cell

(SIM-AMINCO). Ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση, ενώ το υπερκείμενο καθαρίστηκε με χρήση στήλης γλουταθειόνης (glutathione sepharose beads), που έχει την ιδιότητα να κατακρατεί τις GST-σημασμένες πρωτεΐνες.

Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης, που είχαν κατακρατήσει τις GST-Rabs, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση και ακολούθησαν πλύσεις με PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-Me, 10 μM νουκλεοτίδιο, αρχικά, και στη συνέχεια με PBS, 5 mM β-Me, 10 mM EDTA. Το EDTA απομακρύνει δισθενή κατιόντα από το διάλυμα. Δεδομένου ότι η πρόσδεση του νουκλεοτιδίου από τη Rab είναι μία Mg⁺²-εξαρτώμενη διαδικασία, απομάκρυνση του Mg⁺² απομακρύνει το ήδη προσδεμένο νουκλεοτίδιο από αυτή. Για το λόγο αυτό, μετά τις πλύσεις ακολούθησε επώαση με το παραπάνω EDTA διάλυμα, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εφόσον έχουμε απομακρύνει το ήδη προσδεμένο νουκλεοτίδιο, μπορούμε να χορηγήσουμε το επιθυμητό νουκλεοτίδιο στη Rab. Έτσι, αφού πλύνουμε για να απομακρύνουμε το EDTA, επώασαμε τις κολώνες, για 2 ώρες στους 4°C, με διάλυμα PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-Me και 200 μM από το εκάστοτε νουκλεοτίδιο.

2.4.3 Έκφραση και απομόνωση της SHD περιοχής της πρωτεΐνης Slac-2b

Προκειμένου να εκφράσουμε και να απομονώσουμε την SHD περιοχή (78 αμινοξέα) της πρωτεΐνης Slac-2b, ακολουθήσαμε την παραπάνω διαδικασία (2.4.2), χωρίς, όμως, το στάδιο χορήγησης νουκλεοτιδίου, αφού η πρωτεΐνη αυτή δεν προσδένει νουκλεοτίδια. Η προσδεμένη στη στήλη γλουταθειόνης ανασυνδυασμένη GST-SHD επώαστηκε, στη συνέχεια, με το prescission enzyme, σε αναλογία 1 μg prescission enzyme για κάθε 100 μg πρωτεΐνης, προκειμένου να εκλούσουμε καθαρή μόνο την SHD περιοχή. Η πρωτεάση prescission επιτρέπει την πέψη των GST-συζευγμένων πρωτεϊνών, κόβοντας μεταξύ των καταλοίπων Gln και Gly στην αλληλουχία αναγνώρισης LeuGluValLeuPheGln/GlyPro. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, παρουσία διαλύματος 50 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 5 mM β-Me, 1 mM EDTA. Μετά από φυγοκέντρωση, συλλέχτηκε στο υπερκείμενο η καθαρή SHD, η οποία επώαστηκε με 50 μl καθαρά σφαιρίδια γλουταθειόνης, προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες GST και GST-presc. enzyme, που τυχόν απελευθερώνονται. Ακολούθησε διαπήδηση, όπου ως διάλυμα διαπήδησης χρησιμοποιήθηκε το PBS. Η όλη αυτή παρασκευή πραγματοποιήθηκε από την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα.

2.5 Βιοχημικές μέθοδοι

2.5.1. Προσπάθεια απομόνωσης τελεστών της Rab27a μέσω χρωματογραφίας συγγένειας

Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης, που είχαν προσδέσει τις GST-Rab27α-GDP ή -GTPγS ή τη GST-Rab5α-GDP (βλ.2.4.2), επώαστηκαν στη συνέχεια με το μεμβρανικό ή το κυτταροπλασματικό παρασκεύασμα πλακούντα (βλ.2.4.1), παρουσία του αντίστοιχου νουκλεοτιδίου. Ακολούθησαν πλύσεις, αρχικά παρουσία και, στη συνέχεια, απουσία $MgCl_2$, ενώ η έκλουση πραγματοποιήθηκε, με επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα έκλουσης της ακόλουθης σύστασης: 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM EDTA. Το EDTA απομακρύνει το ήδη προσδεμένο νουκλεοτίδιο από τη Rab, με αποτέλεσμα αυτή να αλλάζει διαμόρφωση, ελευθερώνοντας τους τελεστές που είχε προσδέσει. Προκειμένου να απομακρυνθεί από το έκλουσμα η GST-Rab, που πιθανώς είχε διαρρεύσει από τα σφαιρίδια, πραγματοποιήθηκε επώαση αυτού με σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης, τα οποία απομακρύνθηκαν στη συνέχεια με φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε 3 φορές και χρησιμοποιήθηκε για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-ακρυλαμίδιου, 6% και 15%, για την ανάλυση τόσο των μεγάλου όσο και των μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών. Ακολούθησε χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G και, στη συνέχεια, χρώση νιτρικού αργύρου.

Για τη μελέτη της εξάρτησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ Rab27a και SHD (περιοχή της πρωτεΐνης Slac-2b) από το GTP, πραγματοποιήθηκε επώαση των GST-Rab27α-GDP ή -GTPγS ή GST-Rab5α-GDP, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί στα σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης, με την καθαρή πρωτεΐνη SHD (of Slac-2b) (βλ.2.4.2), όπως και προηγουμένως. Η έκλουση έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα έκλουσης 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM EDTA, ενώ στο δεύτερο, το διάλυμα 100 mM Tris, pH 8.5, 5 mM β-Me, 15 mM γλουταθειόνης (reduced glutathione). Τα κλάσματα για ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-ακρυλαμίδιου, 16% και ακολούθησε χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G.

Η πειραματική αυτή προσέγγιση, λόγω ανεπαρκούς διαμόρφωσης της Rab27a, παρουσίασε αποτελέσματα μειωμένης αξιοπιστίας, που δεν αξιοποιήθηκαν.

2.5.2 Δοκιμασία, *in vivo*, ανοσοκατακρήμνιση

Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με τις DNA κατασκευές myc-Munc13-4 και GFP ή GFP-Rab27a ή GFP-Rab3a ή GFP-Rab15 ή GFP-Rab33a ή GFP-Rab37 ή GFP-Rab5 ή GFP-Rab4 ή GFP-Rab11. 48 ώρες αργότερα, τα κύτταρα λύθηκαν με διάλυμα λύσης που περιείχε: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 μM GTPγS, 0,5% Triton και 1x μίγμα αναστολέων πρωτεασών (EDTA-free) (Roche Applied science, Indianapolis, USA) και φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000g για 5 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρήθηκε στα 100.000 g για 1 ώρα, στους 4°C. Στο υπερκείμενο της υπεφυγοκέντρησης πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, κρατήθηκε ποσότητα 50 μg, ώστε να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών, των οποίων μελετάται η ενδεχόμενη ανοσοκατακρήμνιση, ενώ το υπόλοιπο (1 mg) επώαστηκε με anti-GFP αντίσωμα που ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένο με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, για 2 ώρες στους 4°C, υπό ανάδευση. Ακολούθησε έκπλυση των σφαιριδίων 5 φορές με διάλυμα λύσης και 1 φορά με διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton. Οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διάλυμα γλυκίνης (0,1 M glycine pH 2.5, 0,1% Triton).

Για την ομοιοπολική πρόσδεση των anti-GFP αντισωμάτων στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, 1300 μl anti-GFP ορού (που είχαν εξισορροπηθεί με 65 μl 1 M Tris pH 8) επώαστηκαν με 400 μl σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, για 2 ώρες στους 4°C, υπό ανάδευση. Ακολούθησαν 5 πλύσεις με 1 ml borate-NaOH, pH 8.6 και επώαση με 2 ml 20 mM DMP σε 0,2 M borate-NaOH, για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 2 ml 0,2 M αιθανολαμίνης, pH 8.2, και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις των σφαιριδίων 8 φορές με διάλυμα 0,1 M γλυκίνης pH 2.3, 0,1% Triton, για την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν είχε προσδεθεί ομοιοπολικά στα σφαιρίδια, και τα σφαιρίδια διατηρήθηκαν σε διάλυμα φωσφορικών στους 4°C.

2.5.3. ELISA

Η ELISA είναι μία ποσοτική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εκκρινόμενου vWF από τα ενεργοποιημένα HUVEC. Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την αναφορά. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε τρυβλίο 96-φρεατίων και πραγματοποιήθηκε επώαση 16 ωρών υπό ανάδευση στους 4°C με το 1^ο πολυκλωνικό αντίσωμα (αντί-human vWF, A0082 DakoCytomation), σε αραίωση

1:400 σε διάλυμα PBS. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 200 μl/φρεάτιο με PBS + 0.1% Triton (διάλυμα πλύσης) υπό ανάδευση για 2 λεπτά και έπειτα επώαση με 200 μl/φρεάτιο PBS + 0.1% Triton + 0.2% ζελατίνη (blocking buffer) υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε το αντιγόνο, μέχρι 200μl, από το υλικό που συλλέχτηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο εδάφιο 2.2.4. Ακολούθησε επώαση για μία ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 200 μl, με διάλυμα πλύσης, και μία με blocking buffer. Ακολούθησε επώαση με το 2^ο αντίσωμα (αντί-human vWF, συζευγμένο με τη ραφανιδική υπεροξειδάση, P0226, πολυκλωνικό της εταιρίας DakoCytomation). Κατά τη δεύτερη επώαση το αντίσωμα προσδένεται στο αντιγόνο, που είναι ήδη προσδεμένο στο 1^ο αντίσωμα. Έπειτα από 4 πλύσεις με blocking buffer, πραγματοποιήθηκε αντίδραση υπεροξειδάσης με προσθήκη 200 μl/φρεάτιο κατάλληλου υποστρώματος [25 ml διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών + 0,01 g o-Phenylenediamine (OPD) + 0,01 ml H₂O₂, όπου το διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών, pH 5, αποτελούνταν από 100 mM κιτρικό οξύ και 200 mM Na₂HPO₄, σε αναλογία 1:1,06]. Η προσθήκη 50 μl H₂SO₄ 2N/φρεάτιο τερμάτισε την αντίδραση, καθώς άλλαξε το pH του διαλύματος και απενεργοποίησε την υπεροξειδάση. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 492 nm, το οποίο αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης του χρωμογόνου προϊόντος. Η μετατροπή της οπτικής απορρόφησης σε A.U. (arbitrary units), πραγματοποιήθηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης που συσχέτιζε τα δύο αυτά μεγέθη.

2.5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Για τη μέτρηση συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι BCA (BCATM Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce) και Bradford (αντιδραστήριο Bradford της εταιρίας Biorad), ανάλογα με την ποσότητα απορρυπαντικού που υπήρχε στο κυτταρικό εκχύλισμα.

Ο χημικός μηχανισμός της πρώτης μεθόδου στηρίζεται στην αντίδραση Biuret, σύμφωνα με την οποία ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, που περιέχουν δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς, σε αλκαλικές συνθήκες δημιουργούν σύμπλοκα με ιόντα Cu⁺². Στο αλκαλικό αυτό περιβάλλον τα ιόντα Cu⁺² ανάγονται σε Cu⁺¹. Τα ανηγμένα κατιόντα χαλκού αντιδρούν με το βικινχρωμικό οξύ, παράγοντας ένα έντονο μπλε-πράσινο χρώμα, το οποίο απορροφά στα 540nm.

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 έχει κόκκινο χρώμα, ως ελεύθερη, ενώ ως συνδεδεμένη με πρωτεΐνες έχει μπλε χρώμα, που απορροφά στα 595nm. Δεν επηρεάζεται από τις περισσότερες ενώσεις που δημιουργούν πρόβλημα στη μέθοδο BCA (ουρία, μερκαπτόνες, αντιδραστήρια θειολών, EDTA κ.άλ.), αλλά επηρεάζεται από υψηλές συγκεντρώσεις (1%) απορρυπαντικών, όπως τα Triton X-100 και SDS. Συνοπτικά, κυτταρικό εκχύλισμα αραιώθηκε σε διάλυμα 20% αντιδραστηρίου Bradford σε νερό και φωτομετρήθηκε. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA (2 µg/µl).

2.5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Οι πρωτεΐνες κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, υπό αναγωγικές συνθήκες. Αρχικά, στα κυτταρικά εκχυλίσματα προστέθηκε 1xLaemli sample buffer, σε τελική συγκέντρωση 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2,3% SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, παρουσία 100 mM DTT, για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, και τα δείγματα υπέστησαν βρασμό για 5 λεπτά στους 100°C. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών, με λόγο ένα περίπου μόριο SDS για κάθε δύο αμινοξέα. Το γεγονός αυτό δίνει στο σύμπλοκο πρωτεΐνης/SDS ένα μεγάλο αρνητικό καθαρό φορτίο που είναι σχεδόν ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης και πολύ μεγαλύτερο από το φυσικό φορτίο της, το οποίο έτσι θεωρείται ασήμαντο. Έτσι, στους πόρους του πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου, που λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, οι πρωτεΐνες κινούνται προς το θετικό πόλο και διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους.

Η παρασκευή των πηκτών (πηκτή επιστοίβαξης, πηκτή διαχωρισμού), η σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και οι συνθήκες αυτής, έγιναν σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual.

2.5.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)

Οι πρωτεΐνες, που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45 mm) με ρεύμα 200 mA για 1 ώρα στους 4°C. Το ρυθμιστικό διάλυμα, μέσα στο οποίο έγινε η μεταφορά, περιείχε 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-base και 20% μεθανόλη. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονταν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (0,1% σε οξικό οξύ 1%) για 1 λεπτό και ξεβάφτηκαν με νερό. Οι μεμβράνες

επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western (PBS – 0.1% Tween 20), σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα υπό ανατάραξη, για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών. Ακολούθησε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα είτε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 4°C ολονυχτίως σε διάλυμα Western–2% ζελατίνη. Πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα Western και οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα, συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη, σε διάλυμα Western. Ακολούθησαν οι ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως και παραπάνω, και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Roche.

2.6 Μορφολογικές μέθοδοι

2.6.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες, που είχαν προ-επωαστεί με κολλαγόνο τύπου 1, και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν στις διάφορες συνθήκες, ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Με το πέρας της επεξεργασίας, έγινε πλύση των κυττάρων μία φορά με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3,7% για 20 λεπτά. Το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε με 50 mM NH₄Cl (σε PBS) για 30 λεπτά και ακολούθησε επώαση με Triton 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με 10% FBS (που είχε πριν υπερφυγοκεντρηθεί) για 20 λεπτά, προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, και μετά 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS, έγινε επώαση με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 5%. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Moviol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO της εταιρίας Sigma) και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

2.6.2 Συνεστιακή μικροσκοπία

Χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Leica TCS SP, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561 και λογισμικό Leica TCS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ταυτοποίηση των Rab GTPασών που εντοπίζονται στα WPBs

Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τις Rab GTPάσες που εντοπίζονται στα WPBs, πραγματοποιήσαμε μεθοδολογία σάρωσης όλων των Rab GTPασών του ανθρώπινου γονιδιώματος, Rab1 έως Rab43, τις οποίες υπερεκφράσαμε σε κύτταρα HUVE, συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein – GFP), και διερευνήσαμε, με συνεστιακή μικροσκοπία, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους σε σχέση με τα WPBs. Ως δείκτη των WPBs χρησιμοποιήσαμε το κυρίαρχο φορτίο τους, την πρωτεΐνη vWF. Η υιοθέτηση αυτής της ολιστικής προσέγγισης, δηλαδή της σάρωσης όλων των Rabs, απαντά οριστικά στο ερώτημα των WPB-ειδικών Rab GTPασών. Πρόκειται εξάλλου για μία στρατηγική που είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στα νευροενδοκρινή κύτταρα PC12, για την ταυτοποίηση των Rab GTPασών που ελέγχουν την έκκριση νευροδιαβιβαστών (Tsuboi and Fukuda, 2006), ενώ υπερτερεί έναντι της φασματοσκοπίας μάζας, που είχε χρησιμοποιηθεί ευρέως σε παλαιότερες μελέτες, δεδομένου ότι η απομόνωση ενδοκυττάριων οργανιδίων δεν είναι απόλυτα ειδική και, επιπλέον, δεν είναι πάντα εφικτή η ανίχνευση πρωτεϊνών που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα.

Η παραπάνω συστηματική σάρωση μας επέτρεψε όχι μόνο να ταυτοποιήσουμε τις Rabs των WPBs, αλλά και να χαρτογραφήσουμε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό όλων των Rab GTPασών στα κύτταρα HUVE. Τα αποτελέσματα της χαρτογράφησης αυτής συνοψίζονται στον πίνακα 3.1, στον οποίο επίσης αναφέρεται ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των Rabs σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές. Σύγκριση των αποτελεσμάτων σάρωσης της παρούσας μελέτης (3^η στήλη) με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, όπως αυτά συγκεντρώθηκαν από τον Stenmark (Stenmark, 2009), (2^η στήλη) αποδεικνύει την ορθή ενδοκυτταρική στόχευση των GFP-συζευγμένων Rab GTPασών στα κύτταρα HUVE, αφού στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων η στόχευση που παρατηρήσαμε ήταν σε συμφωνία με αυτή που είχε προηγουμένως αναφερθεί. Να σημειώσουμε, στο σημείο αυτό, πως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη είναι συζευγμένη στο αμινο-τελικό άκρο της αλληλουχίας των Rab, καθώς στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο βρίσκεται το μοτίβο πρενυλίωσης, που είναι υπεύθυνο για τη μεμβρανική τους στόχευση.

Πίνακας 3.1: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των Rab GTPασών σε κύτταρα HUVE. Κύτταρα HUVE, που καλλιιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με τις GFP-Rab (1-43). Μετά από παρέλευση 48 ωρών, μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP και μονοκλωνικό έναντι του vWF. Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπηση. Ο χαρακτηρισμός των ενδοκυττάριων διαμερισμάτων, στα οποία εντοπίστηκαν οι Rabs στα κύτταρα HUVE (3^η στήλη), δεν πραγματοποιήθηκε με χρήση πρωτεϊνών-δεικτών των διαμερισμάτων, αλλά ήταν αποτέλεσμα μορφολογικής παρατήρησης, με εξαίρεση τα WPBs, στα οποία ο εντοπισμός των Rabs ελέγχθηκε με τον δείκτη vWF. Στη 2^η στήλη αναφέρεται ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των Rabs, σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές. Η αρχικά χαρακτηρισμένη ως Rab16 πρωτεΐνη αποδείχθηκε πως αποτελεί μία ισομορφή της υποοικογένειας Rab3, τη Rab3d, με αποτέλεσμα η αρίθμηση να προχωρά από τη Rab15 στη Rab17. Το κενό στη θέση 31 είναι η Rab22b.

Rab GTPάση	Ενδοκυτ. Εντοπ. (H. Stenmark, Nat Rev 2009)	Ενδοκυτ. Εντοπ. στα HUVEC(παρούσα μελέτη)
Rab1	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Ενδοπλασματικό δίκτυο
Rab2	προ-Golgi ενδιάμεσο διαμέρισμα	Ενδοπλασματικό δίκτυο
Rab3	Συναπτικά κυστίδια, Εκκριτικά κοκκία	WPBs
Rab4	Πρώιμα ενδοσώματα, Ενδοσώματα ανακύκλωσης	Ενδοσώματα
Rab5	Πρώιμα ενδοσώματα, Καβεοσώματα, Κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη, Κυτταρ. μεμβράνη	Ενδοσώματα
Rab6	Golgi	Golgi
Rab7	Όψιμα ενδοσώματα	Ενδοσώματα
Rab8	Δίκτυο trans-Golgi, GLUT4 κυστίδια	Ενδοπλασματικό δίκτυο, Περιπτυρηνικά κυστίδια
Rab9	Όψιμα ενδοσώματα	Ενδοσώματα
Rab10	Ενδοπλασματικό δίκτυο, Δίκτυο trans-Golgi, GLUT4 κυστίδια	Golgi
Rab11	Ενδοσώματα ανακύκλωσης	Ενδοσώματα ανακύκλωσης
Rab12	Δίκτυο trans-Golgi, Εκκριτικά κοκκία	Golgi
Rab13	Κυτ. Συνδέσεις (TJs), Πρώιμα ενδοσώματα	Κυτταρ. μεμβράνη
Rab14	Δίκτυο trans-Golgi, Πρώιμα ενδοσώματα	Golgi, Ενδοσώματα
Rab15	Πρώιμα ενδοσώματα, Ενδοσώματα ανακύκλωσης	Ενδοσώματα, WPBs
Rab17	Ενδοσώματα ανακύκλωσης	Ενδοσώματα, Κυτταρ. μεμβράνη
Rab18	Εκκριτικά κυστίδια, Κυτταρ. μεμβράνη, Ενδοπλασματικό δίκτυο	Κυτταρ. μεμβράνη, ορισμένα κυστίδια
Rab19	Golgi	Golgi
Rab20	Ενδοκυττωτικές δομές επιθηλιακών κυττάρων	Ενδοσώματα
Rab21	Πρώιμα ενδοσώματα	Ενδοσώματα
Rab22	Πρώιμα ενδοσώματα, Δίκτυο trans-Golgi	Ενδοσώματα
Rab23	Κυτταρ. μεμβράνη, Πρώιμα ενδοσώματα	Κυτταρ. μεμβράνη, Ενδοσώματα
Rab24	Φαγοςώματα, Πυρηνικά έγκλειστα	Ενδοπλασματικό δίκτυο

Rab25	Ενδοσώματα ανακύκλωσης	Ενδοσώματα
Rab26	Συναπτικά κοκκία	Περιπυρηνικά κυστίδια
Rab27	Συναπτικά κοκκία, Μελανοσώματα, Εκκριτικά κυστίδια	WPBs
Rab28	Μη χαρακτηρισμένος	Περιπυρηνικό διαμέρισμα
Rab29	Μη χαρακτηρισμένος	Περιπυρηνικό διαμέρισμα
Rab30	Golgi	Golgi
Rab32	Μελανοσώματα, Μιτοχόνδρια	Περιπυρηνικά κυστίδια
Rab33	(μέσο) Golgi, Πυκνά κοκκία των PC12 κυττάρων	Golgi, WPBs
Rab34	Κυτταρ. μεμβράνη, Μακροπινοςώματα, Golgi	Κυτταρ. μεμβράνη
Rab35	Κυτταρ. μεμβράνη, Ενδοσώματα ανακύκλωσης	Κυτταρ. μεμβράνη, Ενδοσώματα
Rab36	Μη χαρακτηρισμένος	Περιπυρηνικό διαμέρισμα
Rab37	Εκκριτικά κοκκία ιστιοκυττάρων	WPBs
Rab38	Μελανοσώματα	Περιπυρηνικά κυστίδια
Rab39	Golgi	Ενδοσώματα
Rab40	Golgi	Περιπυρηνικό διαμέρισμα
Rab41	Μη χαρακτηρισμένος	Golgi
Rab42	Μη χαρακτηρισμένος	Κυτταρ. μεμβράνη
Rab43	Golgi	Περιπυρηνικά ενδοσώματα

Από το σύνολο των 41 διαφορετικών Rab GTPασών που εξετάστηκαν, πέντε βρέθηκαν να εντοπίζονται στα WPBs. Πρόκειται για τις **Rab27a, 3a, 15, 33a και 37** (Σχήμα 3.1). Από αυτές, οι Rab27a και 37 εντοπίζονται αποκλειστικά στα WPBs, η Rab3a έχει μία έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, αλλά και σαφή εντοπισμό στα WPBs, ενώ οι Rab15 και 33a, εκτός από τα WPBs, εντοπίζονται και σε ένα δεύτερο περιπυρηνικό ενδοκυττάριο διαμέρισμα. Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει πως η Rab33b εντοπίζεται στη συσκευή Golgi (Zheng et al., 1998), ενώ η Rab15 συνεντοπίζεται με Rab5- και Rab4-θετικά πρώιμα ενδοσώματα, καθώς επίσης και με Rab11-θετικά περιπυρηνικά ενδοσώματα ανακύκλωσης (Zuk and Elferink, 1999).

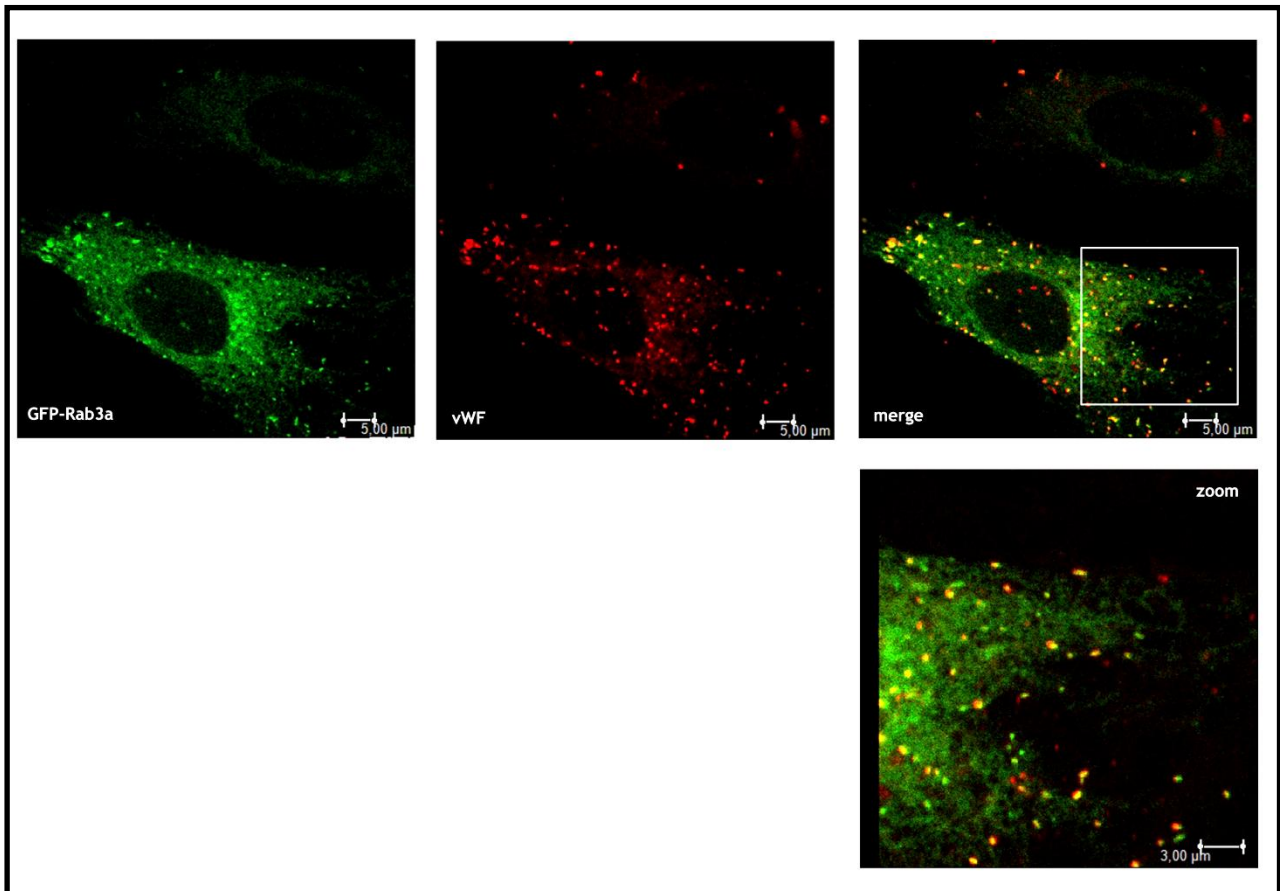
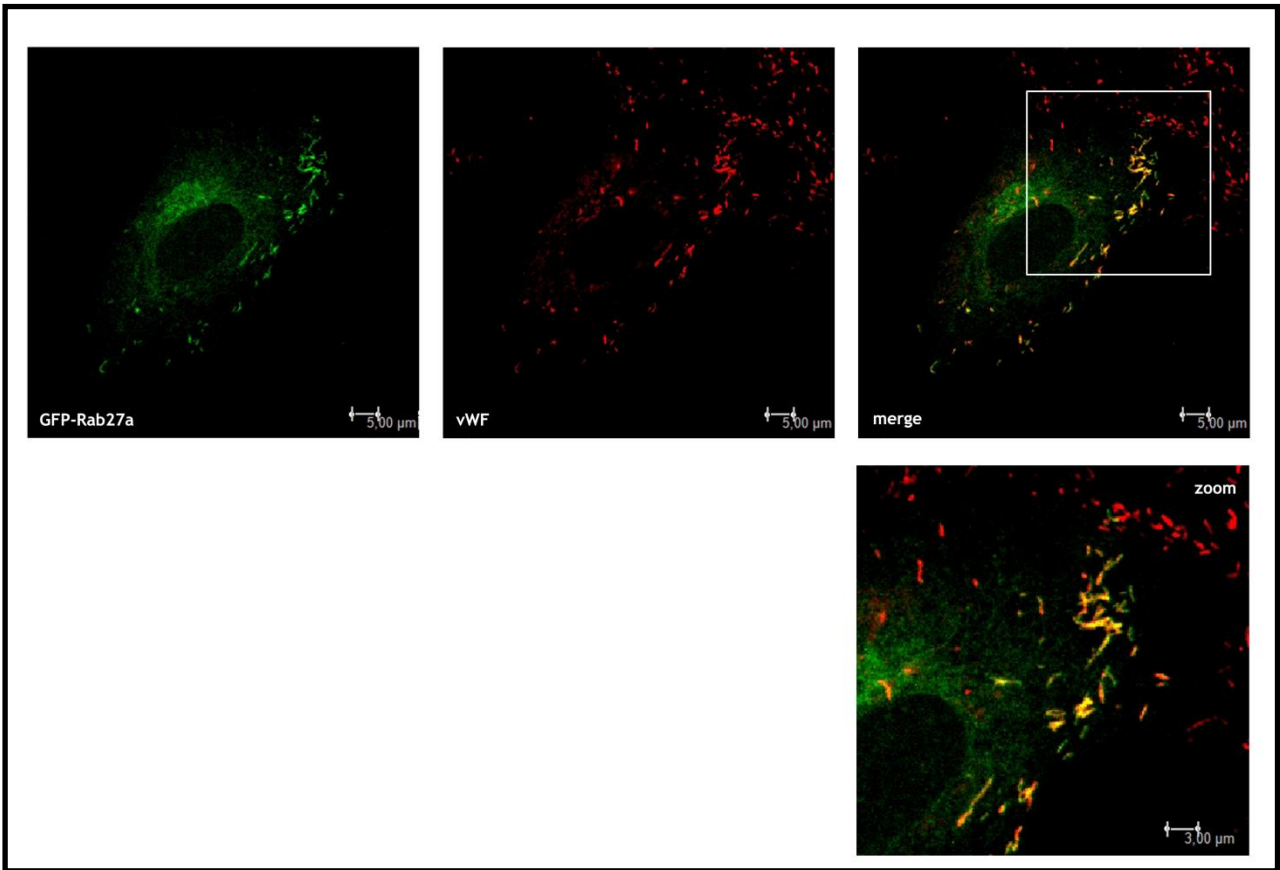
Η ύπαρξη πέντε διαφορετικών Rabs στα WPBs είναι ένα πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα, το οποίο όμως, ακριβώς λόγω του μεγάλου αριθμού των εντοπισθέντων Rabs στα οργανίδια αυτά, θα μπορούσε να γεννήσει ερωτηματικά ως προς την αξιοπιστία της μεθόδου και το κατά πόσο τα αποτελέσματα αυτά είναι ειδικά. Καταρχήν, η συνύπαρξη πολλών διαφορετικών Rabs σε ένα κυτταρικό διαμέρισμα έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Για παράδειγμα, στα πρώιμα ενδοσώματα συνεντοπίζονται οι Rab5, 4, 11, 7, 9, 21, 22 (Sonnichsen et al., 2000) (Barbero et al., 2002) (Simpson et al., 2004). Επιπλέον,

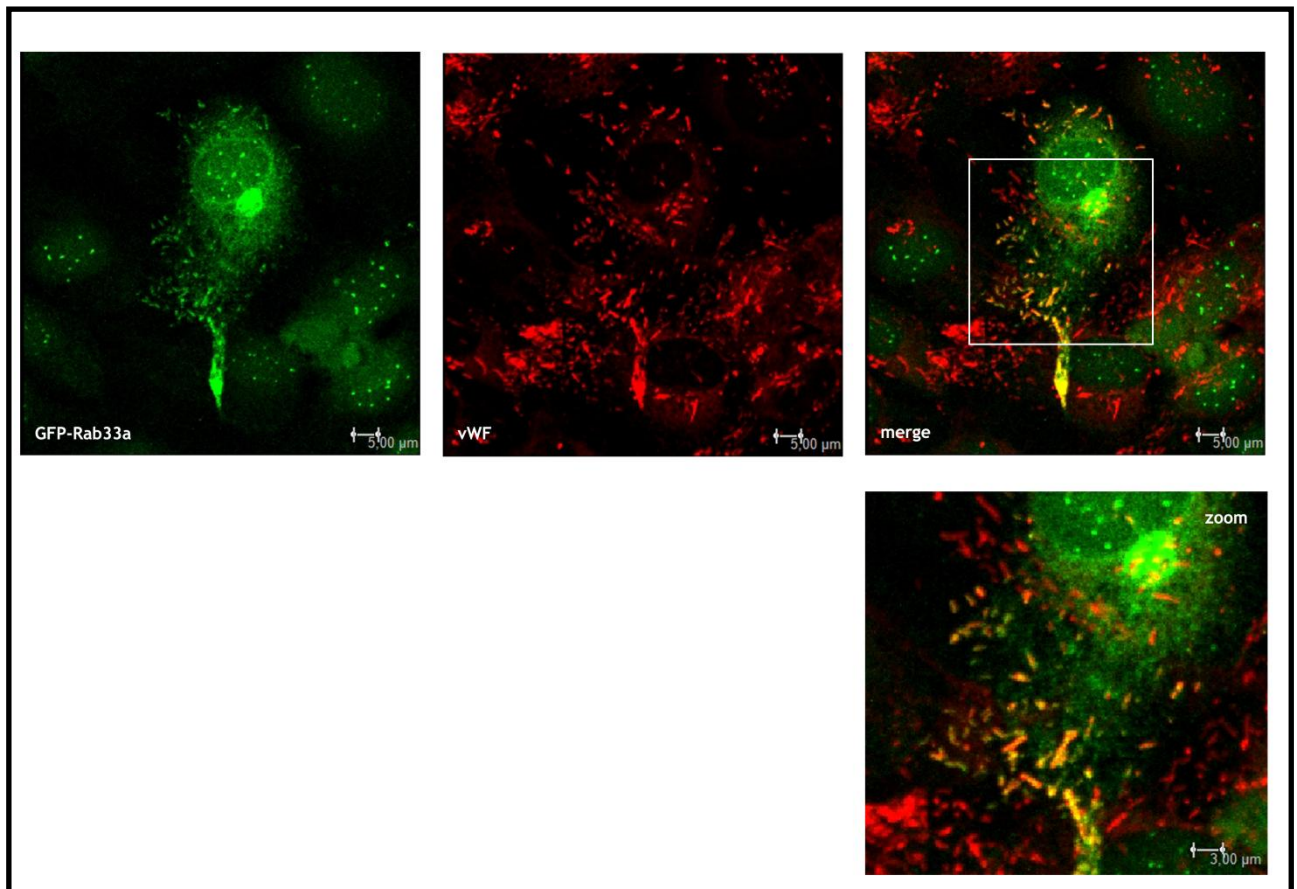
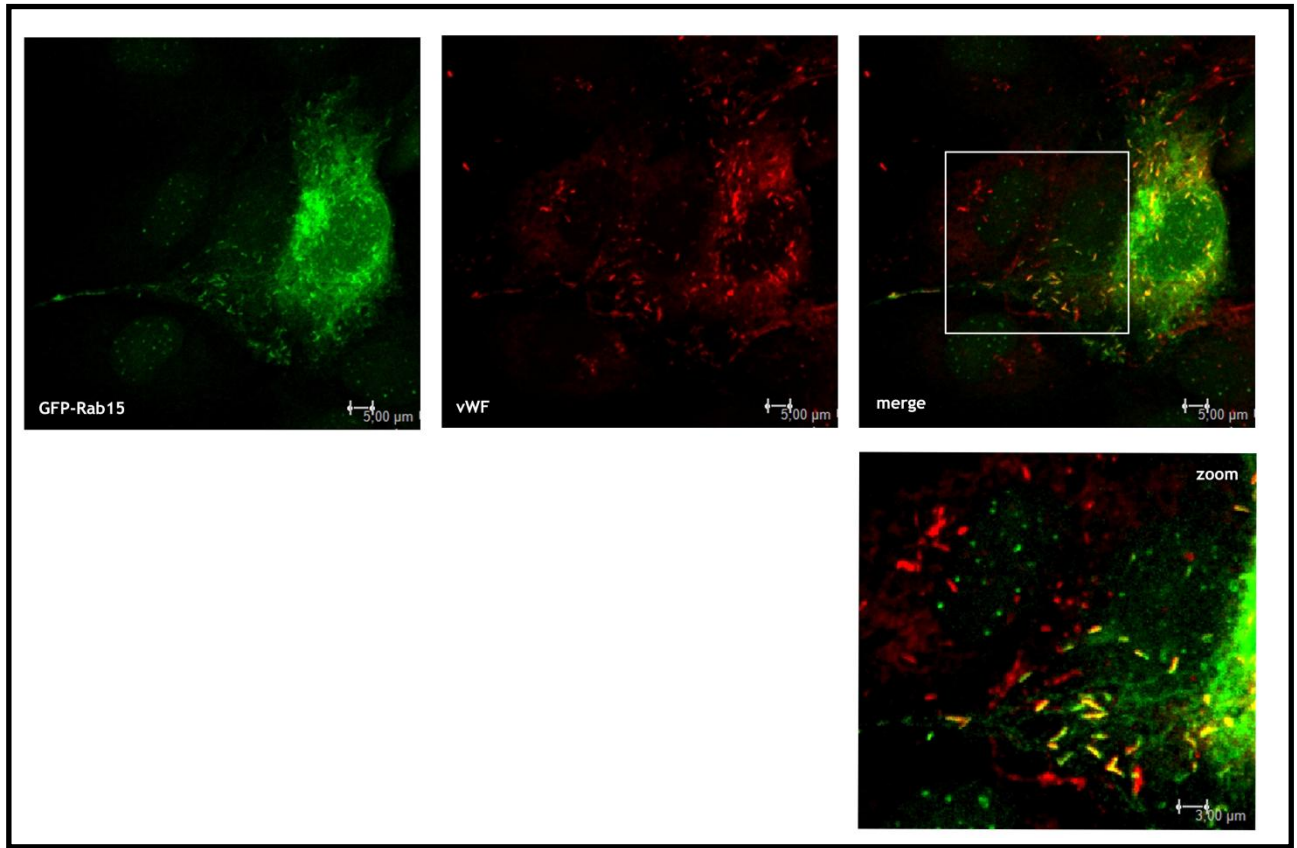
μία σειρά από παρατηρήσεις συνηγορούν υπέρ της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων μας. Πρώτον, τα αποτελέσματά μας ήταν σε συμφωνία με το γνωστό εντοπισμό Rab GTPασών άλλων οργανιδίων (π.χ. Rab1-ER, Rab6-Golgi κ.λ.π. - αρνητικοί μάρτυρες) (Πίνακας 3.1), δεύτερον, επιβεβαιώθηκε ο εντοπισμός στα WPBs των δύο μέχρι σήμερα γνωστών Rabs των οργανιδίων αυτών (Rab27 και Rab3), ενώ, τέλος, για τις Rab37 και Rab33a έχει, από προηγούμενες μελέτες, δείχτει να εντοπίζονται στα εκκριτικά κοκκία των ιστιοκυττάρων (Masuda et al., 2000) και στα πυκνά κοκκία των νευροενδοκρινών PC12 κυττάρων (Tsuboi and Fukuda, 2006), αντίστοιχα. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της σάρωσης εντοπισμού των Rabs στα WPBs κρίνονται ειδικά.

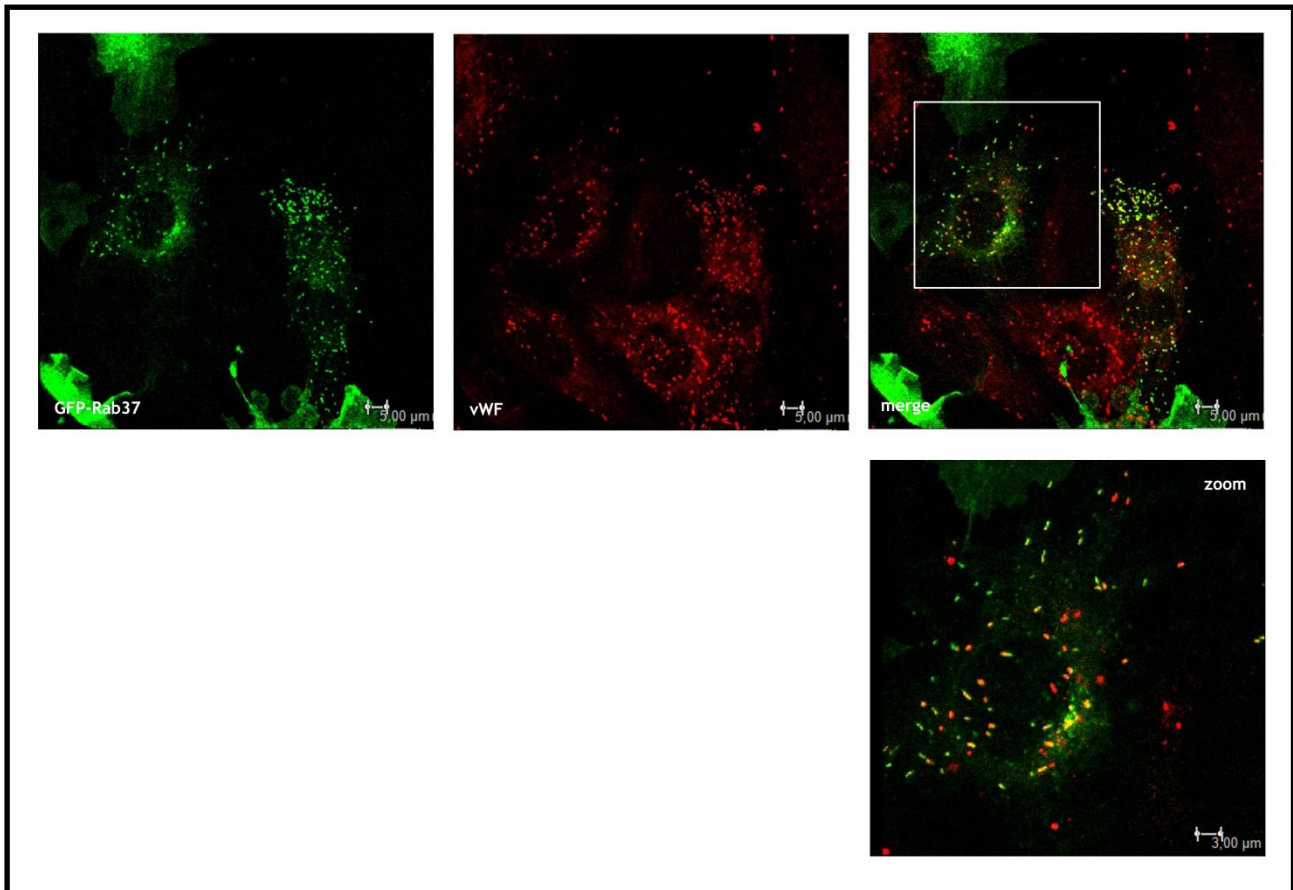
Είναι, επίσης, αξιοσημείωτο ότι ένας μεγάλος αριθμός Rab GTPασών, που έχει μέχρι σήμερα βρεθεί να εντοπίζεται σε εκκριτικά κυστίδια άλλων κυττάρων, δεν εντοπίζεται στα WPBs (Σχήμα 3.2). Το αποτέλεσμα αυτό είναι μεγάλης σημασίας, αφού δείχνει ότι **εκκριτικά οργανίδια διαφορετικών κυττάρων εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τη δυναμική τους στο κύτταρο**. Οι διαφορές αυτές επιβεβαιώνουν την ευρέως διαδεδομένη άποψη ότι το πρωτεϊνικό φορτίο (cargo) που μεταφέρεται στο εσωτερικό των κυστιδίων, καθορίζει το είδος των στρατολογούμενων πρωτεϊνών, που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό, μεταφορά και σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη στόχο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι κάποιες Rabs (κυρίως ενδοσωμικής φύσεως), ενώ δεν είχαν σαφή συνεντοπισμό με την πρωτεΐνη-δείκτη των WPBs, τον vWF, εντούτοις τα διαμερίσματα στα οποία εντοπίζονταν παρουσίασαν μικρής έκτασης επαφές με τα WPBs (Σχήμα 3.3). Από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η περίπτωση της Rab9, μιας Rab υπεύθυνης για την κυστιδιακή μεταφορά από τα όψιμα ενδοσώματα στο δίκτυο trans-Golgi.

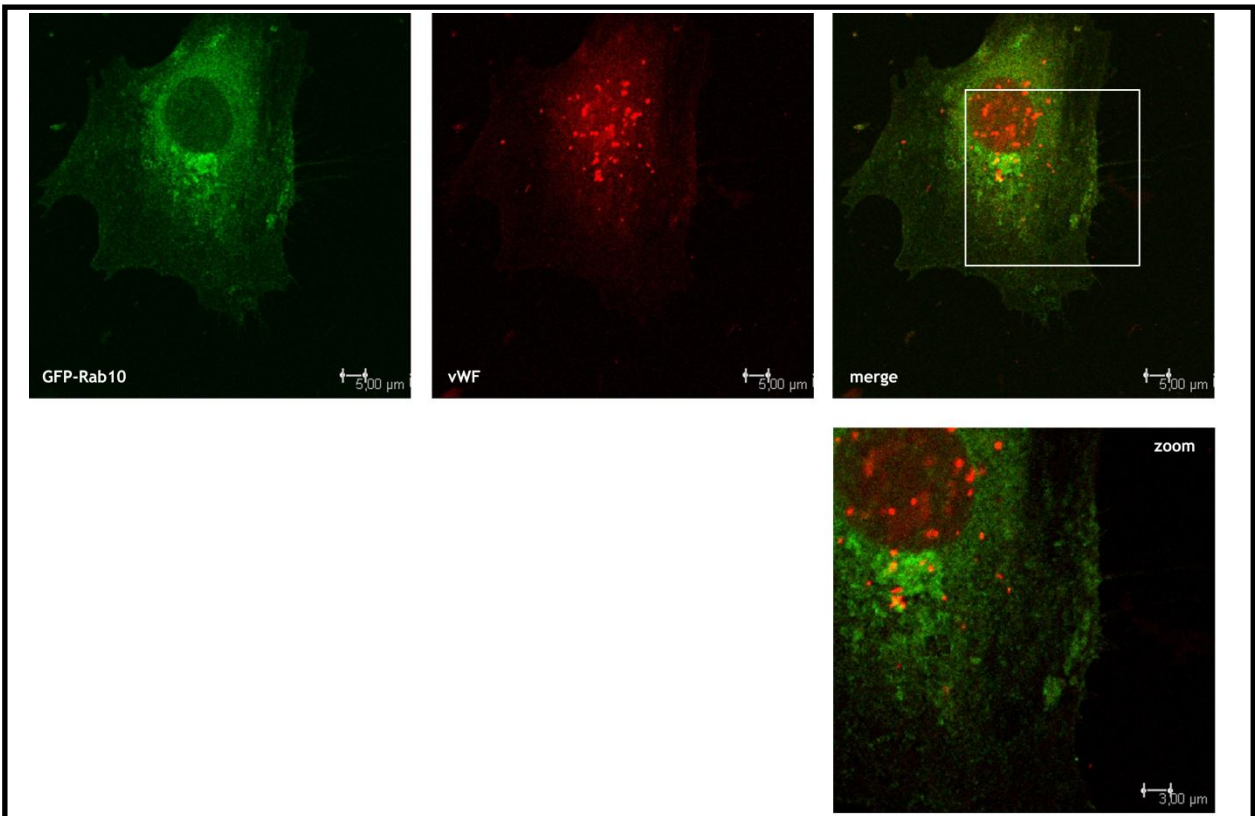
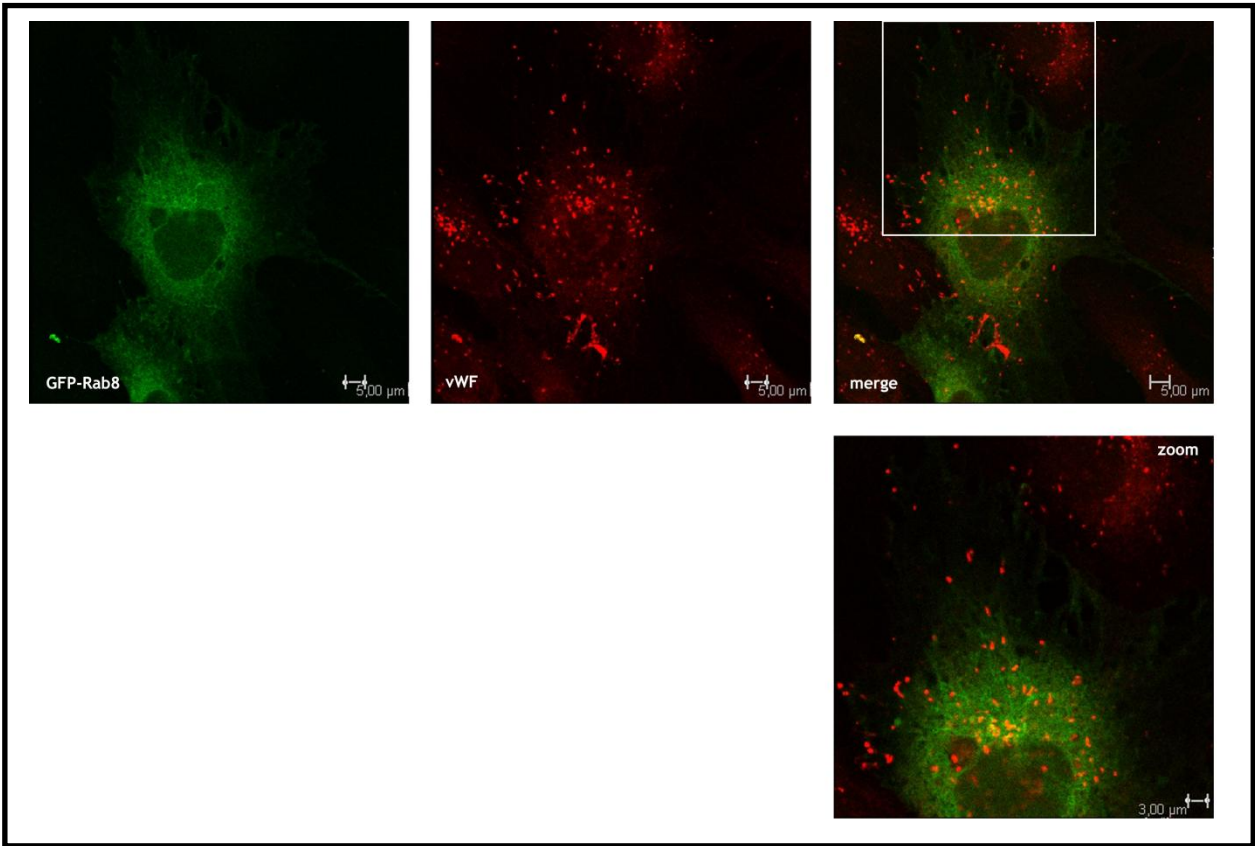
Συμπερασματικά, από το σύνολο των 41 Rab GTPασών, πέντε Rabs, **οι Rab27a, 3a, 15, 33a και 37**, εντοπίζονται στα WPBs. Από αυτές τις πέντε, οι Rab27a και Rab3 είναι γνωστές Rabs των WPBs από προηγούμενες εργασίες (Hannah et al., 2003) (Knop et al., 2004), ενώ για τις Rab15, 33a και 37, η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη μελέτη που δείχνει ότι οι Rabs αυτές εντοπίζονται στα οργανίδια αυτά.

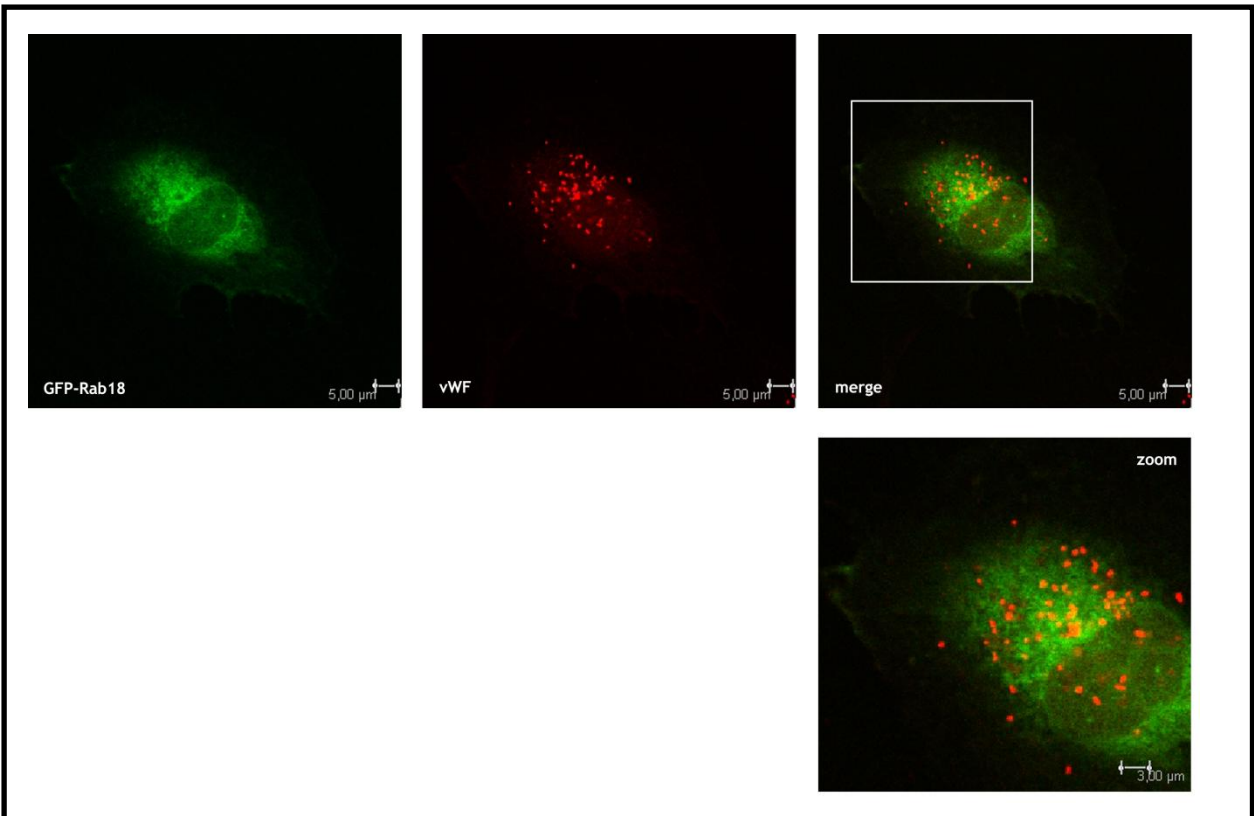
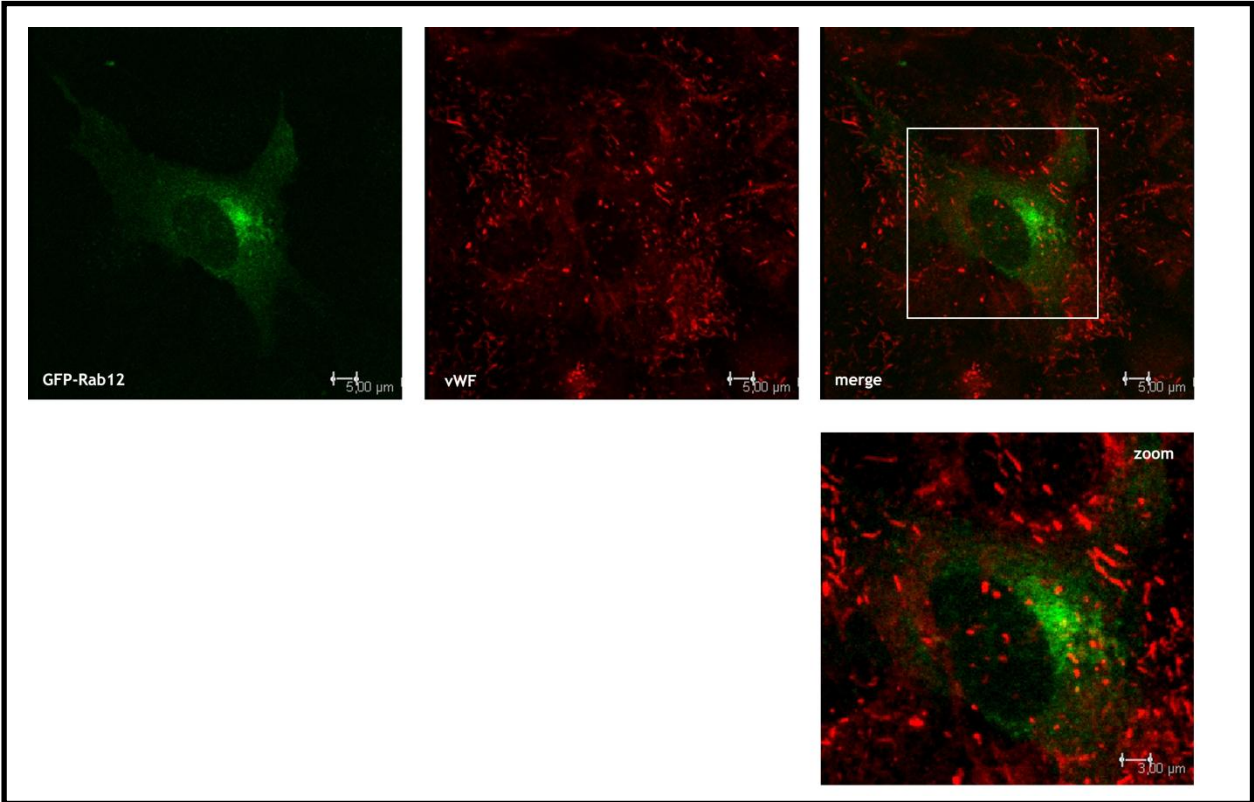


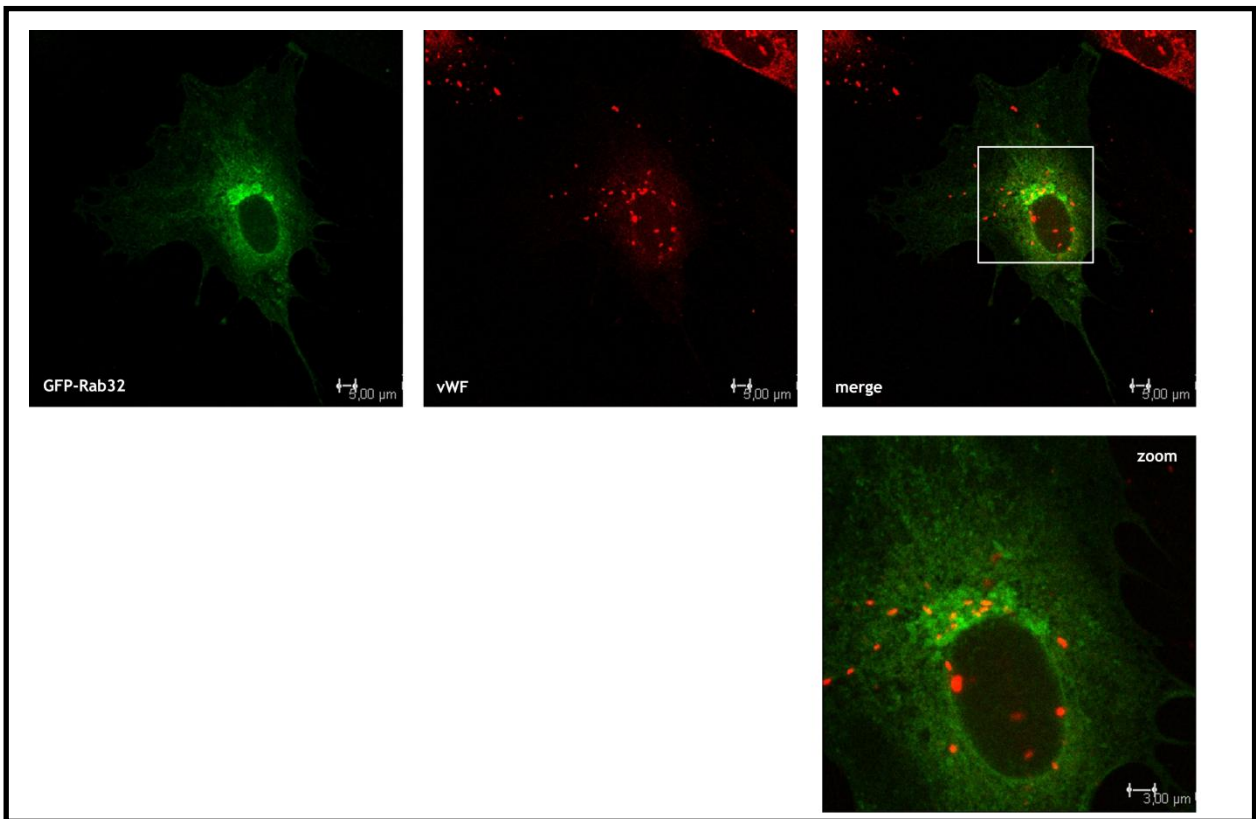
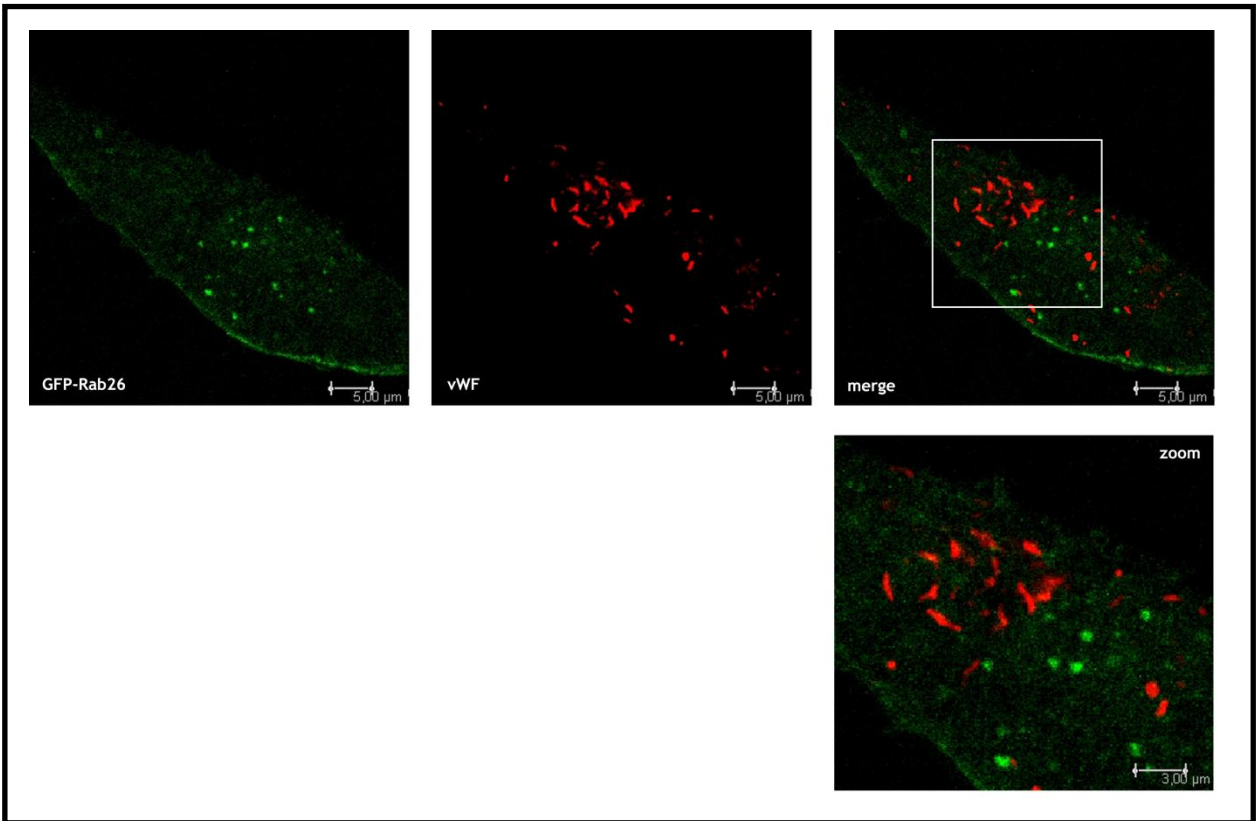


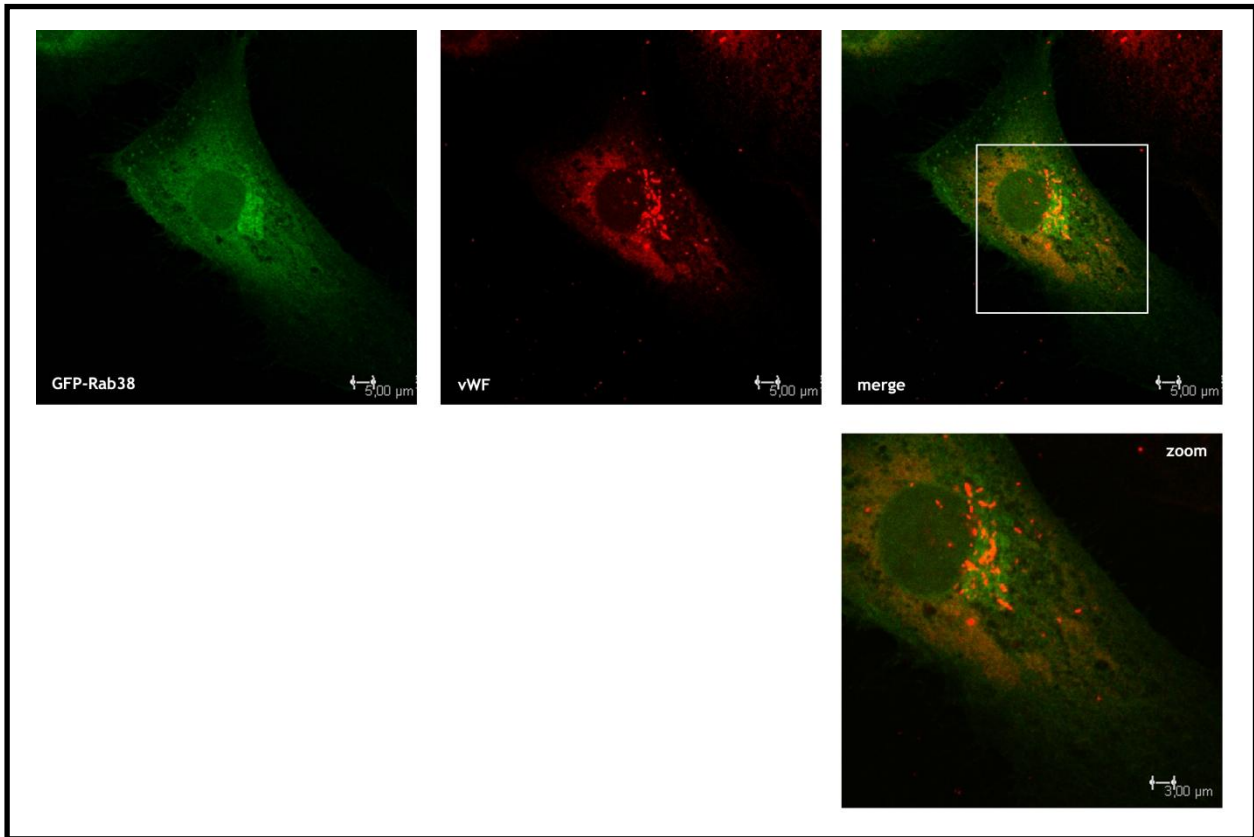


Σχήμα 3.1: Οι Rab-27a, -3a, -15, -33a και -37 εντοπίζονται στα WPBs. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με τις GFP-Rab (1-43). Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP (προς ενίσχυση του σήματος) και μονοκλωνικό έναντι του vWF. Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι Rabs που εντοπίζονται στα WPBs.

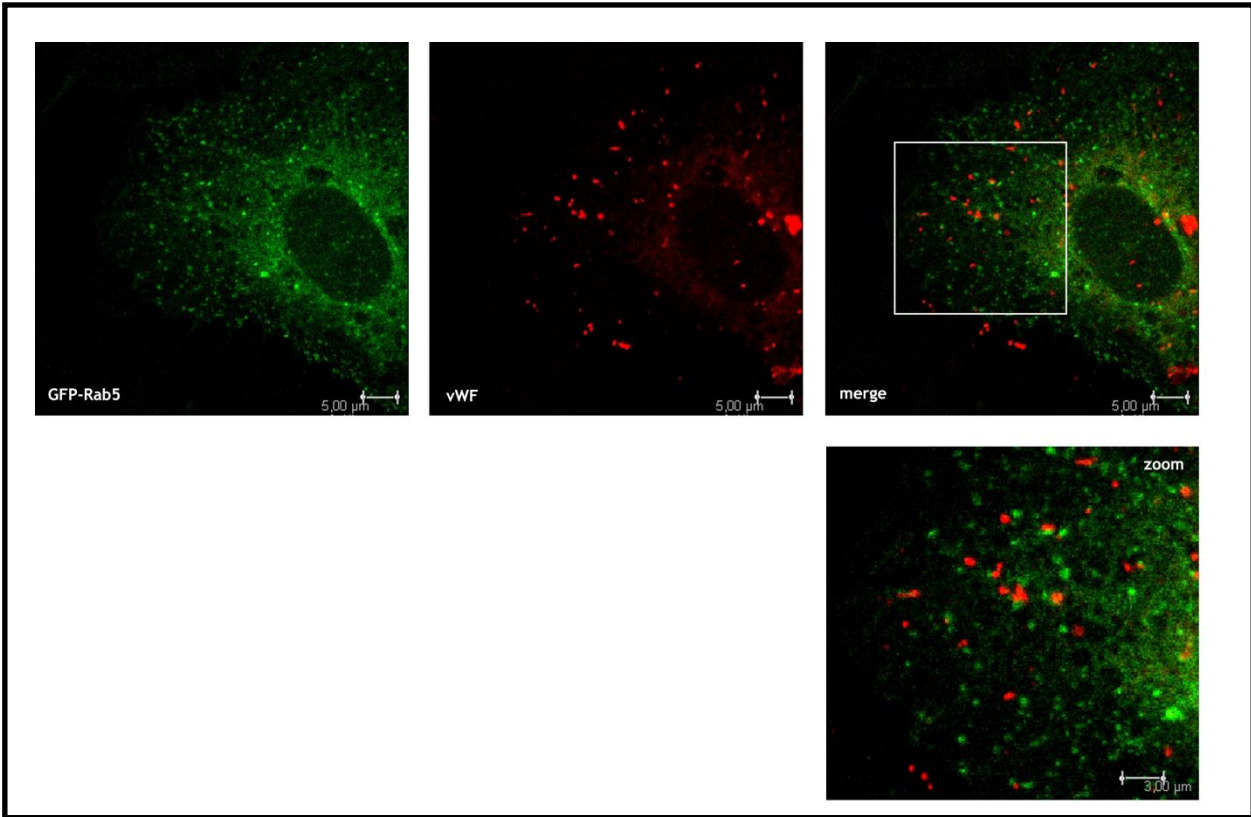
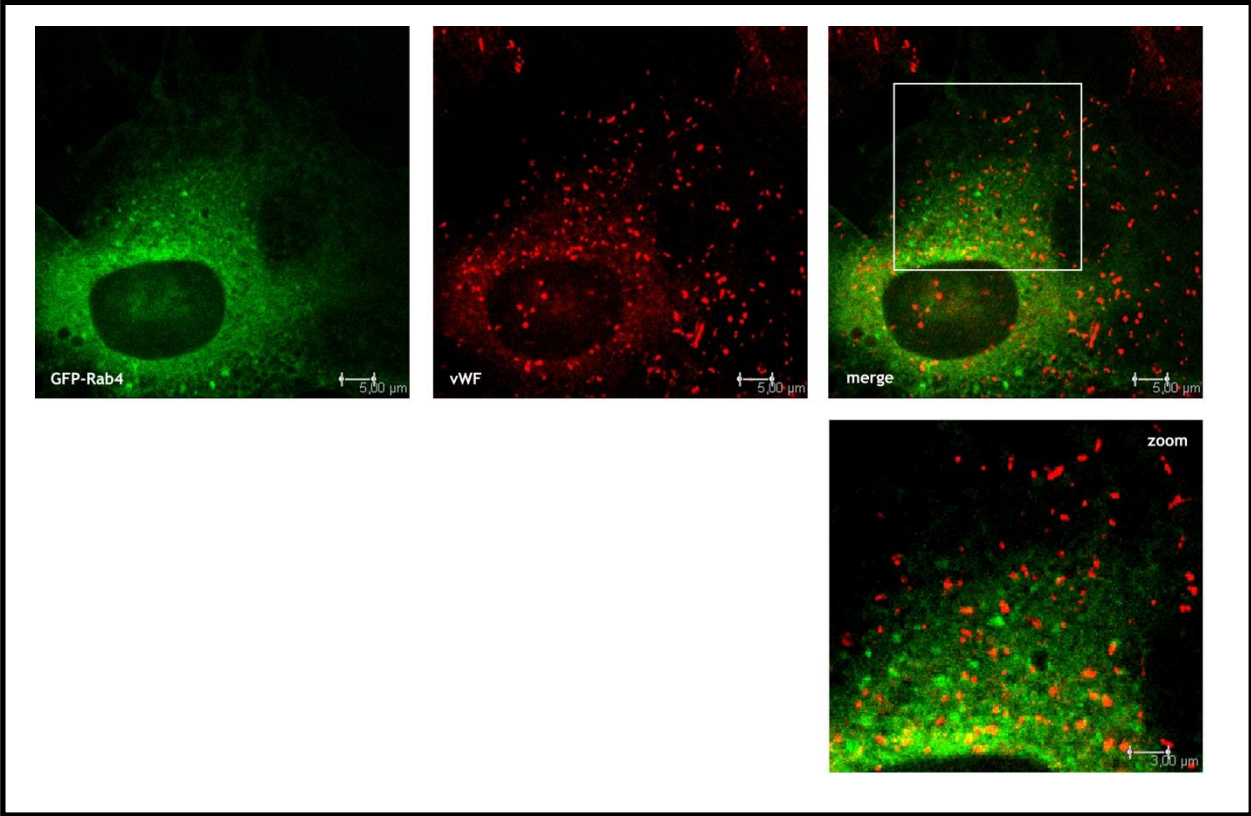


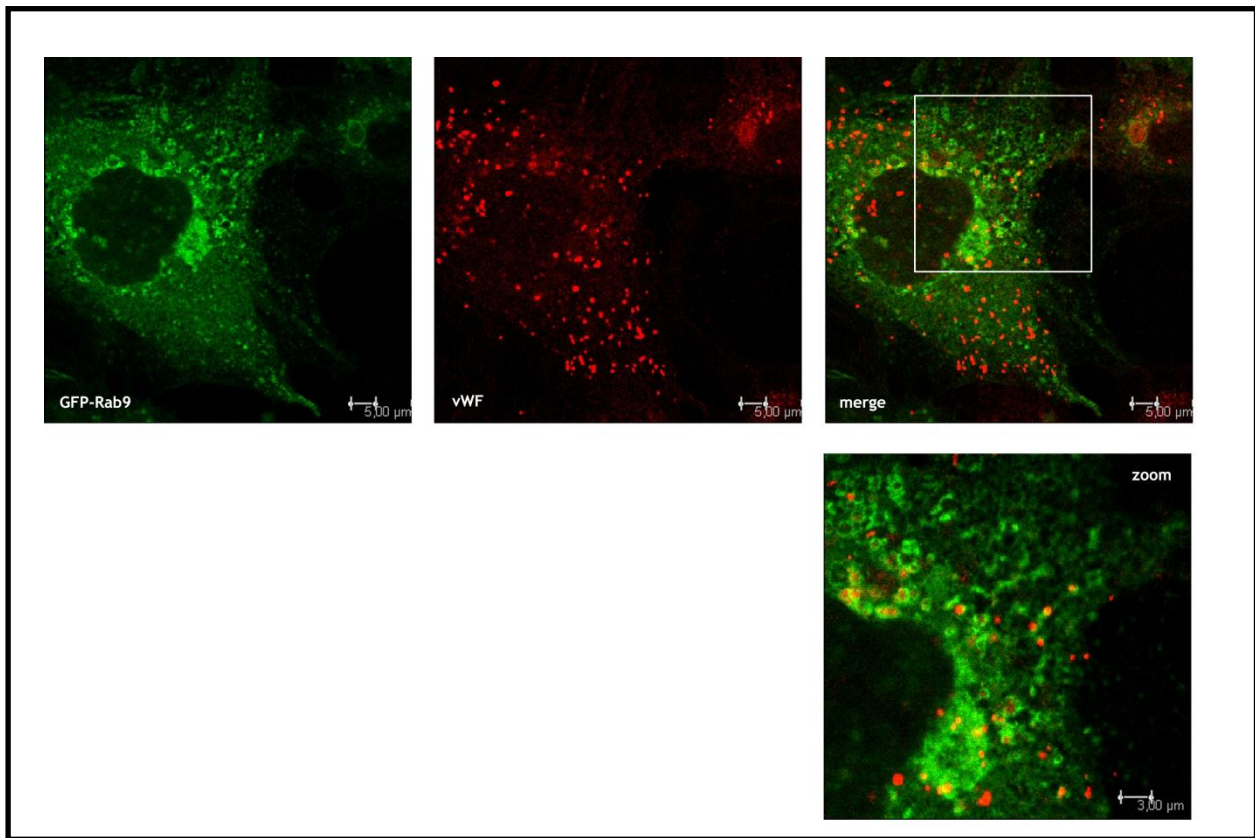
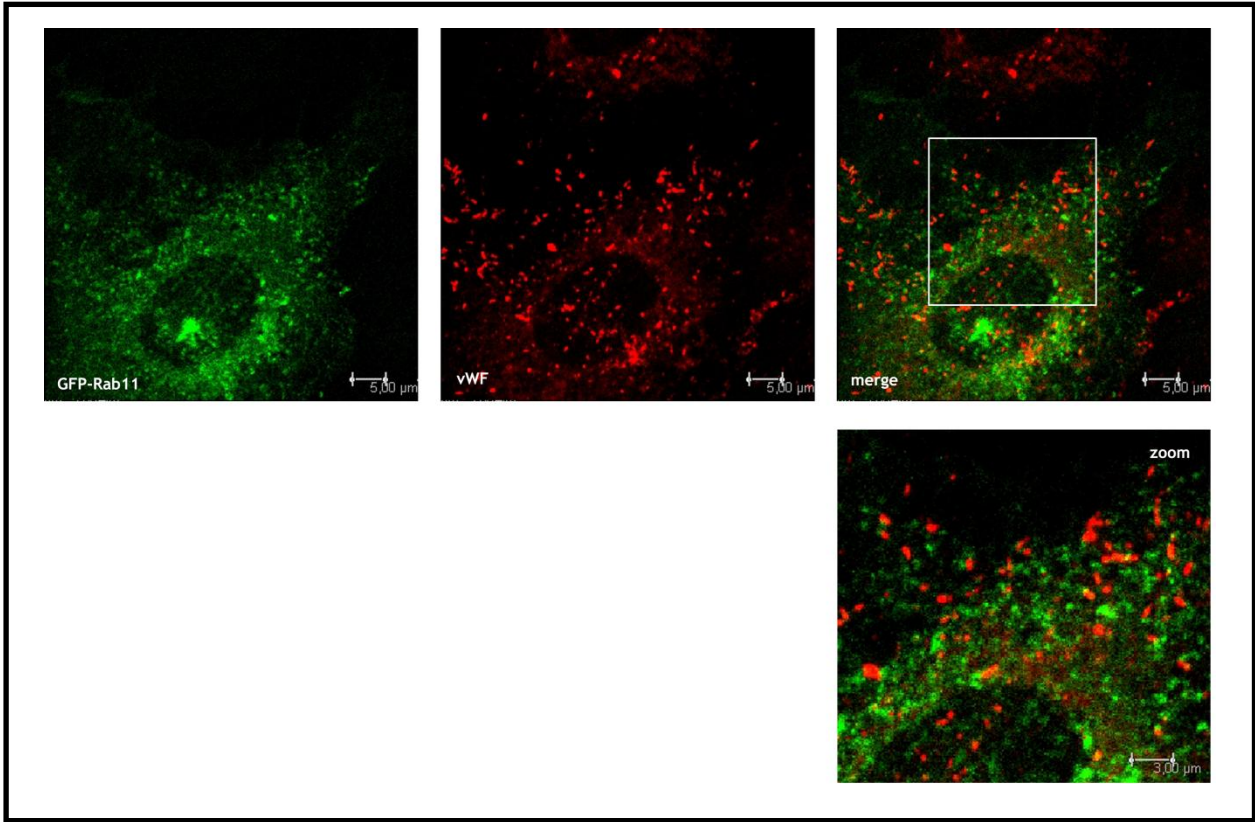


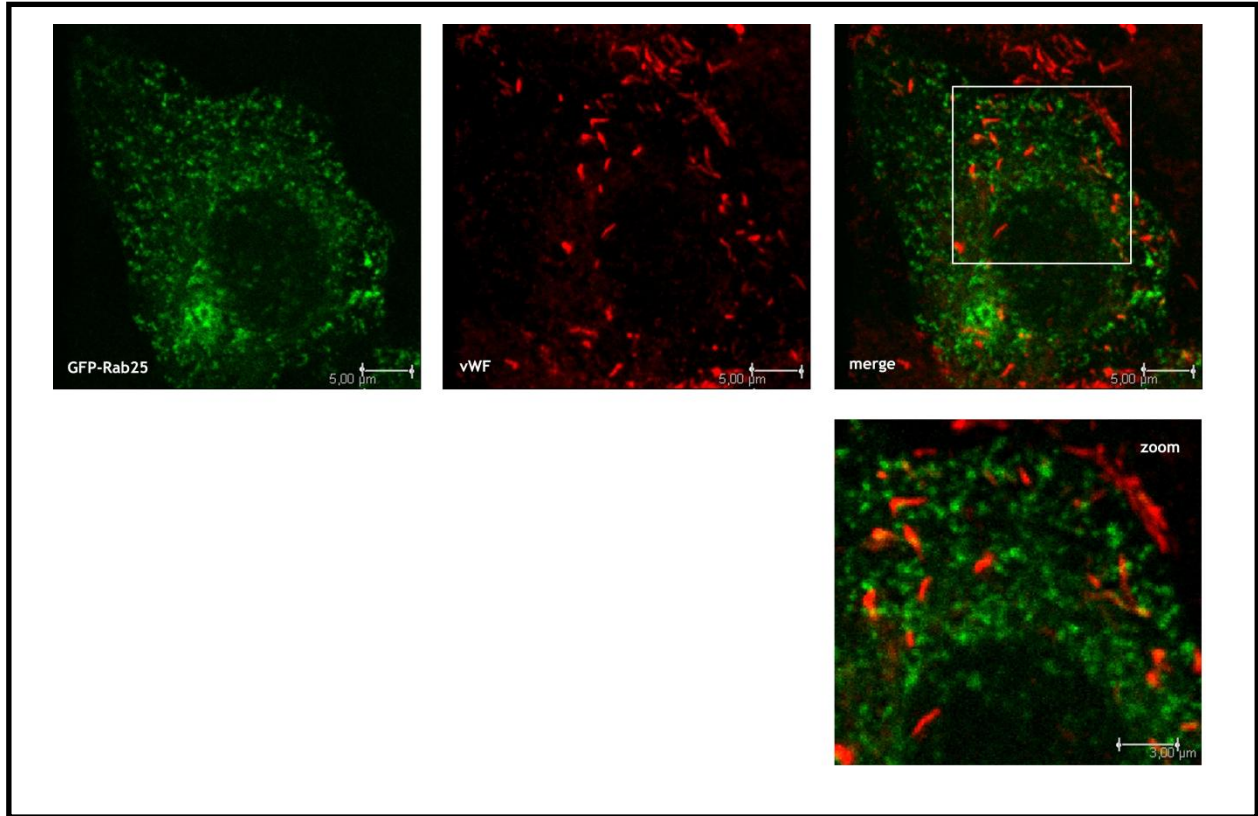




Σχήμα 3.2: Rab GTPάσες που έχει μέχρι σήμερα βρεθεί να εντοπίζονται σε άλλου τύπου εκκριτικά κυστίδια, δεν εντοπίζονται στα WPBs. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με τις GFP-Rab8/10/12/18/26/32/38. Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP και το μονοκλωνικό έναντι του vWF και τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση.



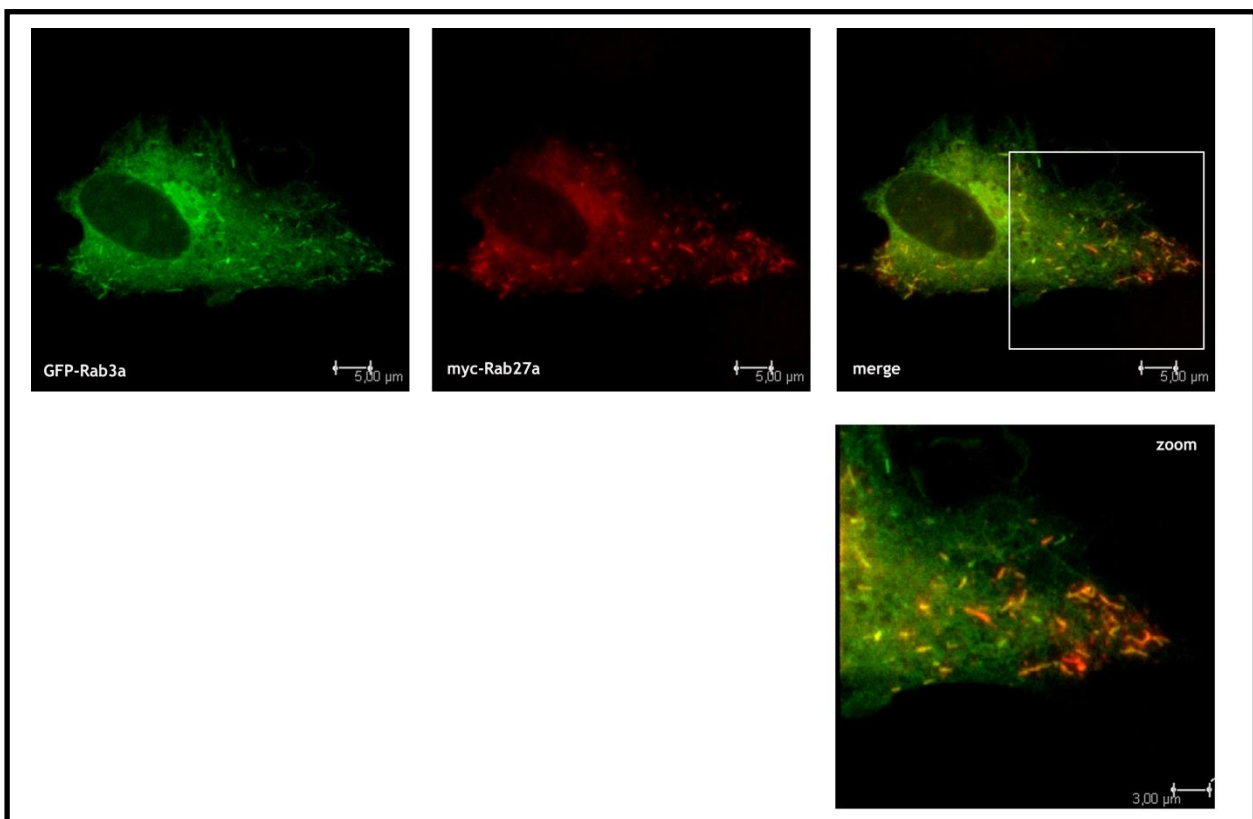


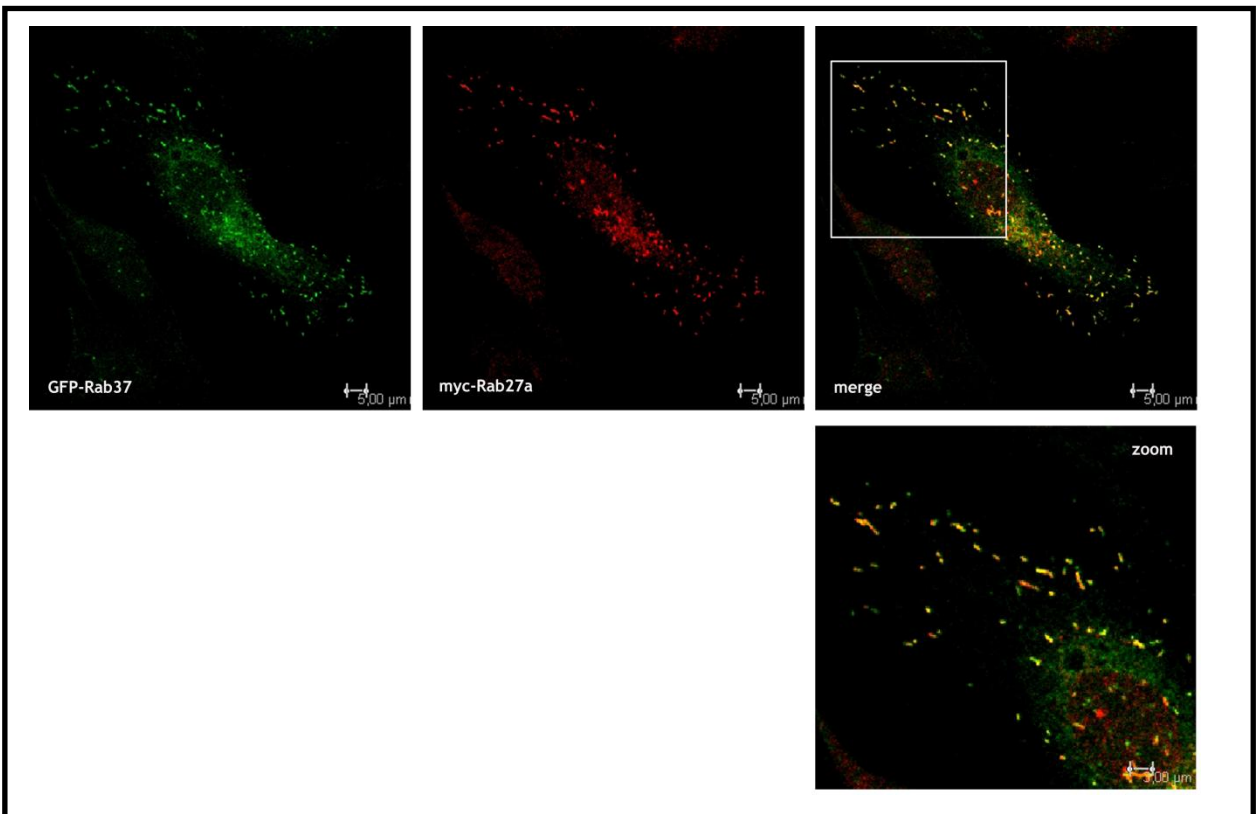
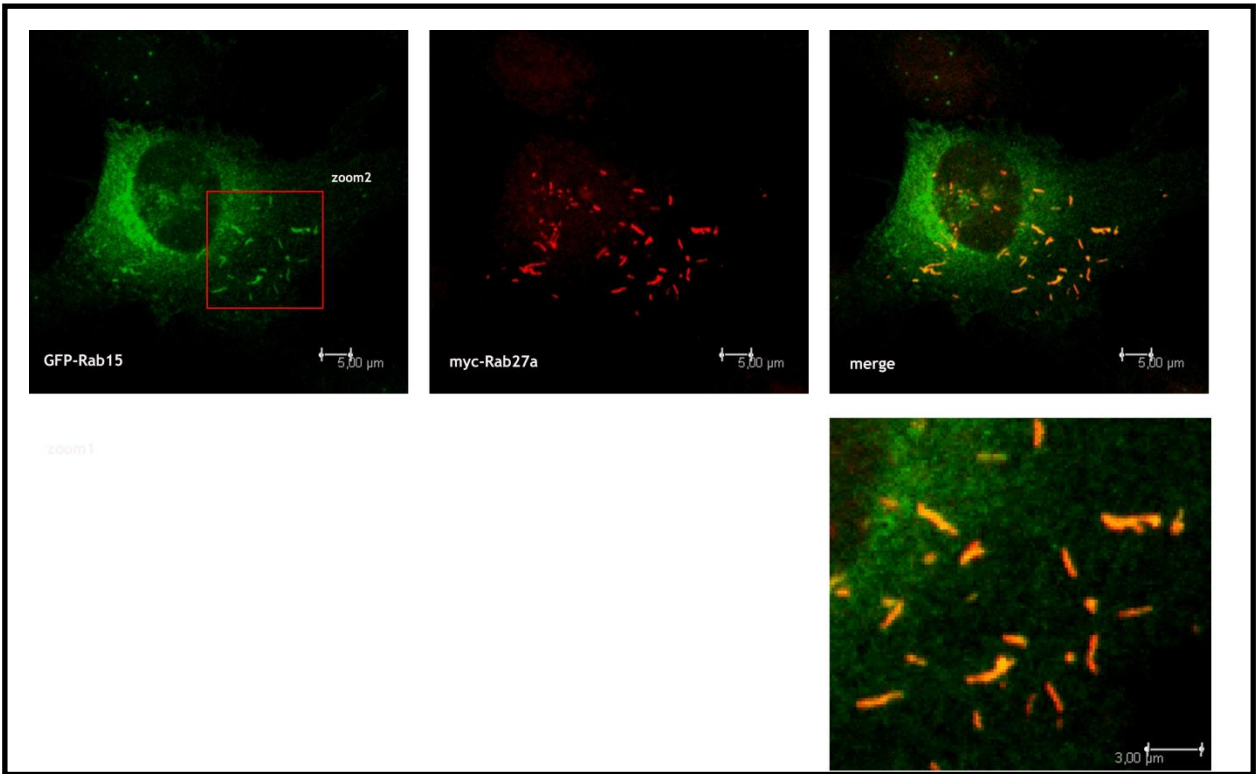


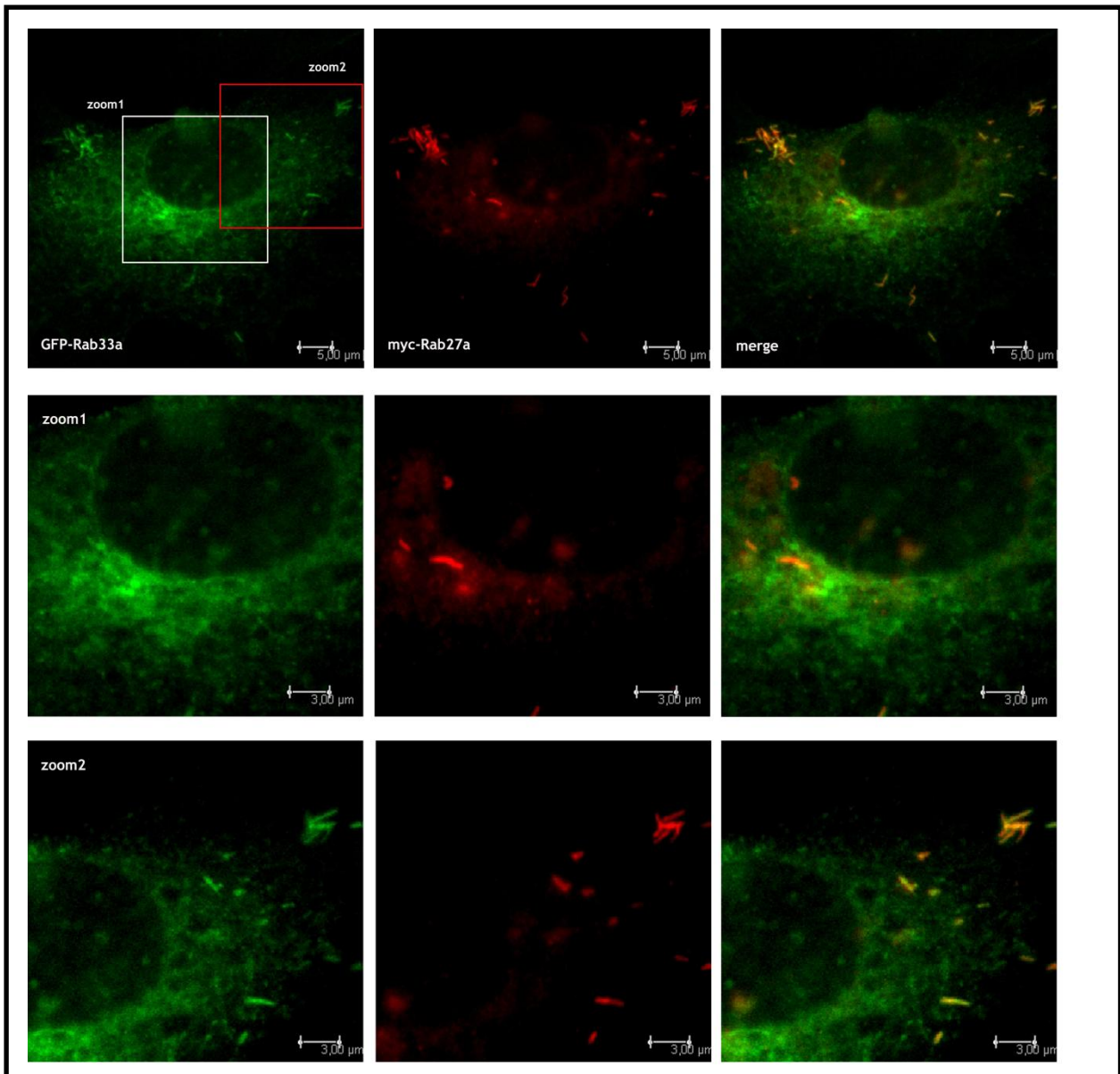
Σχήμα 3.3: Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενδοσωμικών Rabs, που δεν εντοπίζονται στα WPBs και με τις οποίες παρατηρείται μικρής έκτασης επαφή με τα WPBs. Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με τις GFP-Rab (1-43). Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP και μονοκλωνικό έναντι του vWF. Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση. Στο σχήμα παρουσιάζονται τα ενδοσωμικά διαμερίσματα με τα οποία παρατηρήθηκε μικρής έκτασης επαφή με τα WPBs.

3.2 Οι Rab-27, -3, -15, -33 και -37 εντοπίζονται στα ίδια WPBs

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη πως για κάθε μία από τις πέντε διαφορετικές Rabs που ταυτοποιήσαμε παρατηρήθηκε ένας αριθμός WPBs που ήταν αρνητικός για την εκάστοτε Rab, σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα που προτείνουν διάκριση των WPBs σε υποπληθυσμούς ανάλογα με το φορτίο τους (βλ. Εισαγωγή 1.2.4), θελήσαμε να ελέγξουμε την πιθανότητα οι GTPάσες αυτές να εντοπίζονται σε διαφορετικά WPBs. Ταυτόχρονη διαμόλυνση HUVEC με τις myc-Rab27a και GFP-Rab3a ή GFP-Rab15 ή GFP-Rab33a ή GFP-Rab37 απέδειξε πως οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στα ίδια WPBs (Εικόνα 3.4), αφού σχεδόν όλα τα Rab27a-θετικά επιμήκη οργανίδια εμφανίζονται επίσης να είναι θετικά και για κάθε μία από τις υπόλοιπες τέσσερις Rabs. Σε ορισμένες περιπτώσεις, σε ένα ή δύο WPBs ανά κύτταρο, δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός μεταξύ των δύο διαφορετικών Rabs. Η πειραματική αυτή προσέγγιση, βέβαια, δεν παρέχει τη δυνατότητα να διακρίνουμε αν τα WPBs που βρέθηκαν θετικά ως προς μία μόνο GTPάση δεν αποκτούν ποτέ τις άλλες ή τις αποκτούν σε κάποιο άλλο στάδιο της ωρίμανσής τους. Συμπερασματικά, λοιπόν, στην πλειονότητα των WPBs υπάρχει συνεντοπισμός και των πέντε Rab GTPασών, ενώ μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό οργανιδίων έφερε εξειδικευμένα μία μόνο GTPάση από τα ζεύγη των Rab που ελέγχθηκαν.







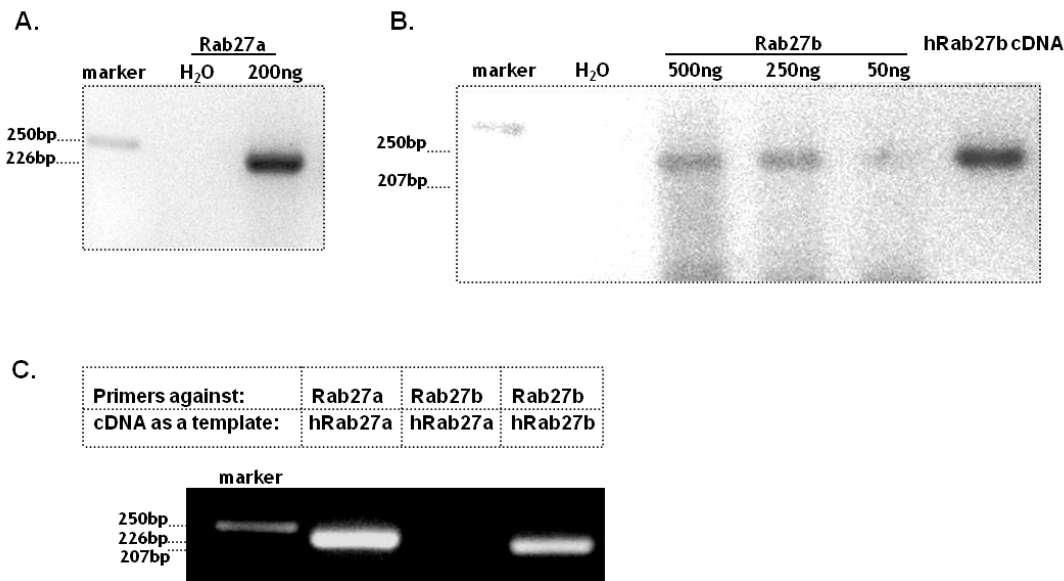
Σχήμα 3.4: Οι Rab-27a, -3a, -15, -33a και -37 συνεντοπίζονται στα ίδια οργανίδια. Ταυτόχρονη διαμόλυνση HUVEC με την ανασυνδυασμένη myc-Rab27a και τις GFP-Rab3a, GFP-Rab37, GFP-Rab15 και GFP-Rab33a. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP και μονοκλωνικό έναντι του επιτόπου myc.

3.3 Οι Rab-27a/b, -3a/b/d, -15, -33a/b και -37 εκφράζονται στα κύτταρα HUVE

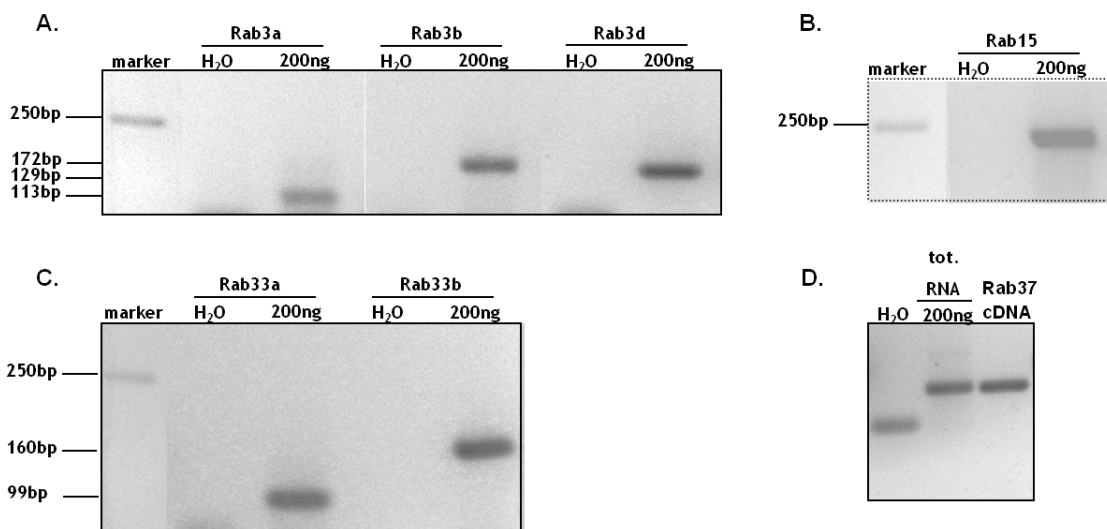
Επειδή η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, μέχρι στιγμής, περιελάμβανε υπερέκφραση των πρωτεϊνών, η ταυτοποίηση των πέντε Rab GTPασών στα WPBs θα είχε σημασία μόνο εάν οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται ενδογενώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η χρήση αντισωμάτων για την ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών με ανοσοαποτύπωση κατέστη δυνατή μόνο για τις Rab27a και Rab3d (βλ. Σχήμα 3.7C, στα πλαίσια πειραμάτων αποσιώπησης), ενώ απουσιάζουν αντισώματα για τις υπόλοιπες Rabs. Όμως, ακόμη και για την περίπτωση των Rab27a και Rab3d, τα αντισώματα δεν ήταν κατάλληλα για χρώση σε πειράματα ανοσοφθορισμού, ώστε να ελεγχθεί ο εντοπισμός των ενδογενών Rabs στα WPBs. Συνεπώς, προκειμένου να διερευνηθεί η ενδογενής έκφραση των πέντε Rabs επιλέξαμε τη μεθοδολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time RT-PCR). Επιπλέον, επειδή για μερικές Rabs υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές, που μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική ιστοειδική έκφραση, πραγματοποιήθηκε RT-PCR για εννιά διαφορετικές Rab ισομορφές (Rab-27a/b, -3a/b/d, -15, -33a/b και -37). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι στη συστηματική σάρωση των Rab GTPασών σε κύτταρα HUVE, που παρουσιάστηκε πιο πριν, δεν χρειάστηκε ο έλεγχος όλων των ισομορφών των Rab. Κι αυτό γιατί έχει παρατηρηθεί ότι, κατά βάση, οι διάφορες ισομορφές μιας Rab πρωτεΐνης εντοπίζονται στο ίδιο ενδοκυττάριο διαμέρισμα. Για παράδειγμα, όλες οι ισομορφές της Rab5 (Rab5a, b, c) εντοπίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα (Bucci et al., 1995).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για κάθε Rab εκκινητές, οι οποίοι σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού DnaStar. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε καμπύλη τήξης, προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα των προϊόντων, ενώ τα τελικά προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης, προκειμένου να ελεγχθεί η ορθότητα του μεγέθους τους. Όπως δείχνεται στο σχήμα 3.5A/B, εκτός από τη Rab27a, τα HUVEC εκφράζουν και τη Rab27b. Η ειδικότητα των εκκινητών έναντι της Rab27b σε σχέση με τη Rab27a ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας, σε απλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, τους εκκινητές έναντι της Rab27b και το cDNA της hRab27a ως εκμαγείο (Σχήμα 3.5C). Με αντίστοιχη στρατηγική ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε η έκφραση και των υπολοίπων επτά Rab GTPασών (Rab-3a/b/d, -15, -33a/b και -37) (Σχήμα 3.6). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των προϊόντων της RT-PCR, που παρατηρείται στα σχήματα 3.5 και 3.6, οφείλεται στο ότι για κάθε Rab πολλαπλασιάστηκαν διαφορετικού μεγέθους τμήματα, ανάλογα με τη θέση υβριδισμού των εκκινητών. Τα τμήματα αυτά ποίκιλαν από 100 μέχρι 250 bp, περίπου. Συνεπώς, συνολικά εκφράζονται εννιά μετάγραφα των Rab GTPασών των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE.



Σχήμα 3.5: Έλεγχος έκφρασης των Rab27a και Rab27b σε HUVEC. (A) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης της Rab27a σε HUVEC, χρησιμοποιώντας 200 ng ολικό εκχύλισμα HUVEC (tot. RNA) ή H₂O (αρνητικός μάρτυρας). (B) Ομοίως με (A) για τη Rab27b. Στην τελευταία διαδρομή τρέχει το προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές της Rab27b και το cDNA της ανθρώπινης Rab27b, ως εκμαγείο. (C) Έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης της ειδικότητας των εκκινητών έναντι της Rab27b.



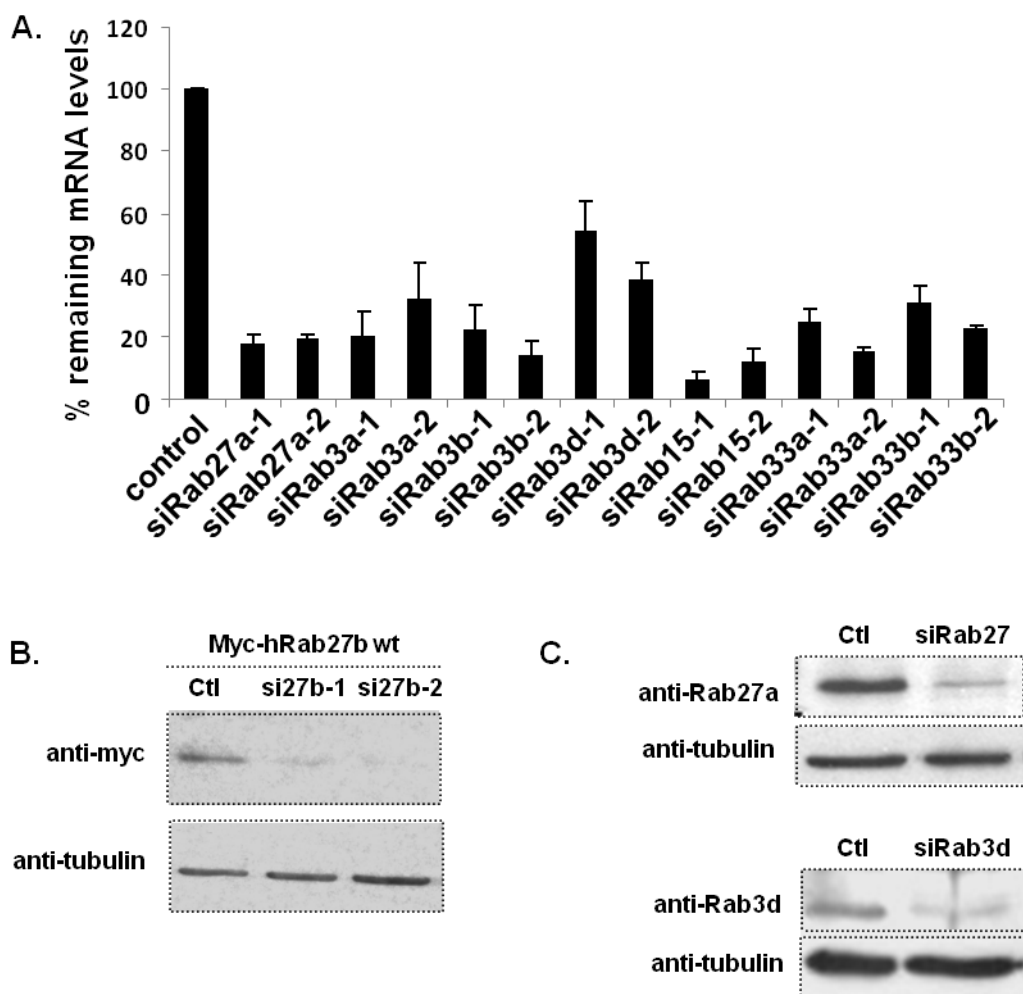
Σχήμα 3.6: Έλεγχος έκφρασης των Rab3A/B/D, Rab15, Rab33A/B και Rab37 σε HUVEC με RT-PCR. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης των Rab -3a, -3b, -3d (A), -15 (B), -33a, -33b (C) και -37 (D) σε HUVEC, χρησιμοποιώντας 200 ng ολικό εκχύλισμα HUVEC (tot. RNA) ή H₂O (αρνητικός μάρτυρας). Στην περίπτωση της Rab37 (D), στην τελευταία διαδρομή τρέχει το προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές της Rab37 και το cDNA της Rab37.

3.4 Οι Rab27a, 3a, 3d και 15 ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs

Τα προηγούμενα αποτελέσματα εγείρουν το ερώτημα σχετικά με τη σημασία των πέντε αυτών Rabs (Rab27a/b, Rab3a/b/d, Rab15, Rab33a/b, Rab37) στην έκκριση των WPBs. Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό, αποσιωπήσαμε με εξειδικευμένα siRNA ολιγονουκλεοτίδια μία προς μία τις πρωτεΐνες αυτές και μετρήσαμε την επίπτωση στην επαγόμενη έκκριση του vWF.

Έναντι κάθε μιας Rab χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά εξειδικευμένα siRNAs, η λειτουργικότητα των οποίων ελέγχθηκε με ποσοτική RT-PCR (Σχήμα 3.7A). Επιπλέον, στις περιπτώσεις που υπήρχαν διαθέσιμα αντισώματα (Rab27a και Rab3d), επιβεβαιώθηκε πως η μείωση σε επίπεδο μεταγράφου συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση σε επίπεδο πρωτεΐνης (Σχήμα 3.7C). Στην περίπτωση της Rab27b η μικρή ανιχνευτική ικανότητα του μεταγράφου, μέσω RT-PCR, δεν μας επέτρεπε την ποσοτικοποίηση της λειτουργικότητας των siRNAs. Ελέγξαμε, λοιπόν, με ανοσοαποτύπωση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ανθρώπινης myc-Rab27b wt, μετά από ταυτόχρονη διαμόλυνση κυττάρων HEK293 με το cDNA της (h)myc-Rab27b και τα αντίστοιχα siRNAs έναντι της Rab27b (Σχήμα 3.7B). Το σύνολο των πιο πάνω πειραμάτων έδειξε πως όλα τα siRNAs που εξετάστηκαν ήταν λειτουργικά, αφού προκαλούσαν μείωση που κυμαινόταν από 50-90% ανά περίπτωση.

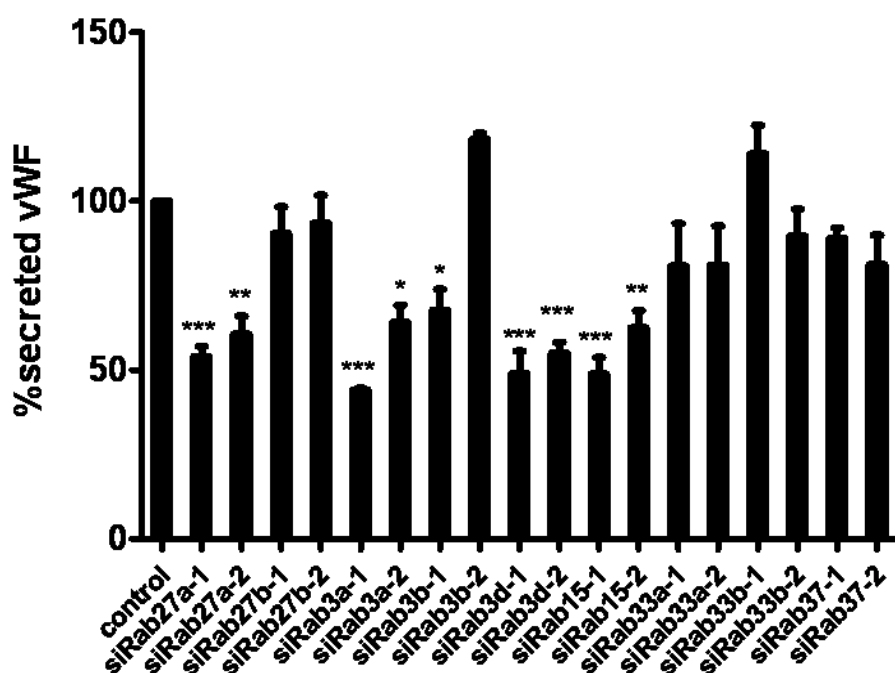
Η επίδραση της αποσιώπησης των γονιδίων αυτών στην επαγόμενη έκκριση των WPBs παρουσιάζεται στο σχήμα 3.8. Η μέθοδος μέτρησης της έκκρισης στηρίζεται σε μία μεθοδολογία τύπου ELISA, στην οποία προσδιορίζεται ποσοτικά ο vWF που εκκρίνεται, από τα WPBs, στον εξωκυτταρικό χώρο. Η έκκριση προκλήθηκε με ενεργοποίηση κυττάρων HUVE με το συνδυασμό παραγόντων ATP/bFgf/VEGF. Το κοκτέιλ των τριών αυτών ενεργοποιητών βρέθηκε, από προηγούμενα, μη δημοσιευμένα, πειράματα του εργαστηρίου μας, πως αποτελεί τον ισχυρότερο ενεργοποιητή της έκκρισης, συγκριτικά με άλλους συνδυασμούς ή μεμονωμένους παράγοντες (δοκιμάστηκαν μεμονωμένα ή συνδυασμοί των εξής: θρομβίνη, ATP, VEGF, bFgf, PMA) (Σχήμα 3.10A). Μία τελευταία παράμετρος των πειραμάτων της έκκρισης είναι πως πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE που βρίσκονταν σε κατάσταση συρροής, καθώς παρατηρήσαμε πως το παράθυρο ενεργοποίησης αυξανόταν σημαντικά με τη συρροή (Σχήμα 3.10B).



Σχήμα 3.7: Έλεγχος της λειτουργικότητας των siRNAs έναντι των Rab27a/b, Rab3a/b/d, Rab15 και Rab33a/b. (A) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM) έναντι των Rab27a, Rab3a, Rab3b, Rab3d, Rab15, Rab33a και Rab33b. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, απομονώθηκε ολικό RNA και με ποσοτική RT-PCR αναλύθηκαν τα επίπεδα των αντίστοιχων μεταγράφων, τα οποία και εκφράστηκαν ως % ποσοστά των επιπέδων των κυττάρων μαρτύρων. Για την ομαλοποίηση των τιμών χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα του μεταγράφου της GAPDH. (B) Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει την myc-hRab27b wt. Μετά από παρέλευση 6 ωρών, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με τα ολιγονουκλεοτίδια (25 nM). Μετά από 72 ώρες, συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με το anti-myc αντίσωμα (για την ανίχνευση της myc-Rab27b). Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη. (C) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM) έναντι των Rab27a και Rab3d. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη.

Αποσιώπηση της Rab27a είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της επαγόμενης έκκρισης κατά 50-60%. Παρόμοια ποσοστά μείωσης της έκκρισης του vWF προέκυψαν και κατόπιν αποσιώπησης της Rab3a, της Rab3d και της Rab15. Αξίζει να σημειωθεί πως ενδεικτικό της ειδικότητας του πειράματος αποτελεί το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν παρόμοια

ποσοστά μείωσης της έκκρισης και με τα δύο siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε Rab, σε συμφωνία με τα πειράματα μέτρησης της αποσιώπησης των αντίστοιχων μεταγράφων.



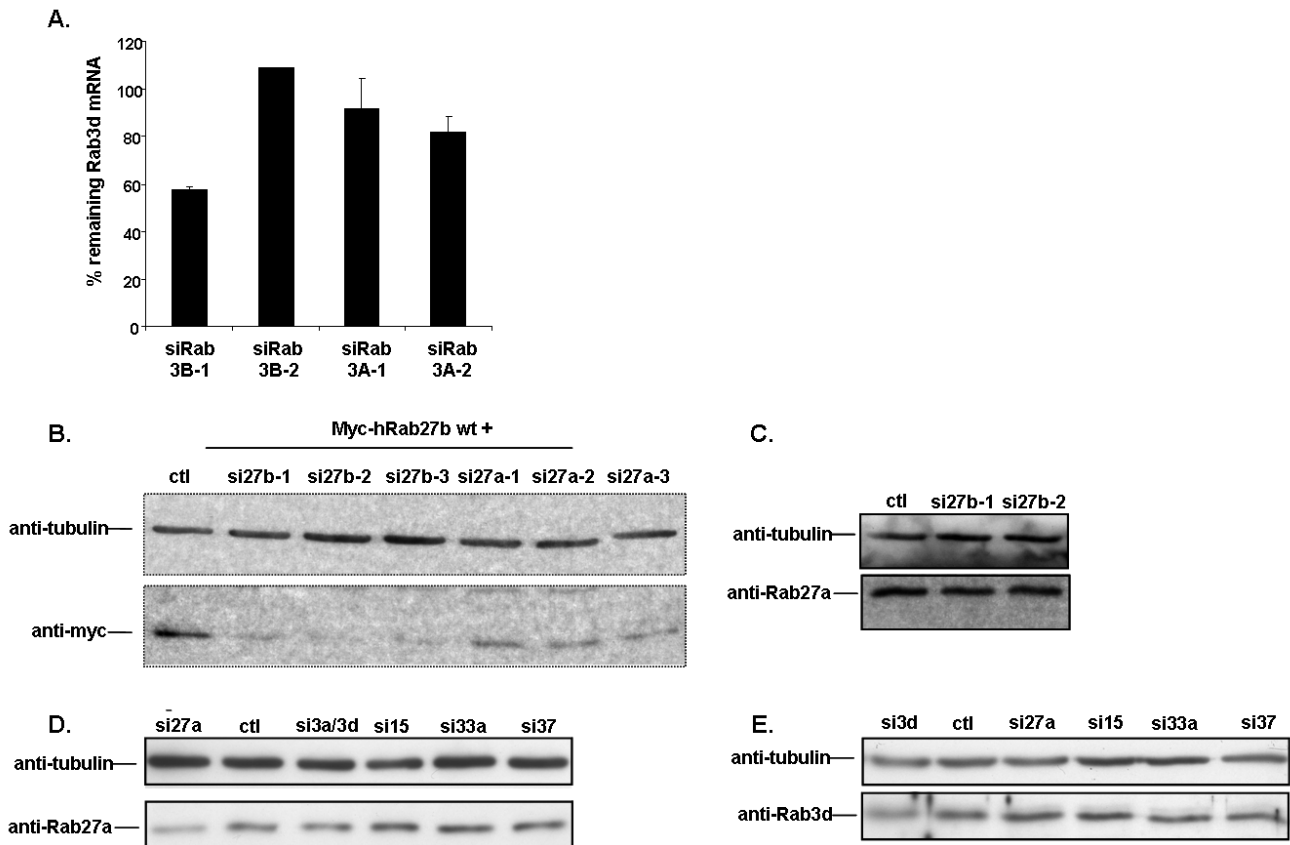
Σχήμα 3.8: Έλεγχος της επίδρασης της αποσιώπησης των Rab27a, Rab27b, Rab3a, Rab3b, Rab3d, Rab15, Rab33a, Rab33b και Rab37 στην επαγόμενη έκκριση του vWF. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM) έναντι των Rab27a, Rab27b, Rab3a, Rab3b, Rab3d, Rab15, Rab33a, Rab33b και Rab37. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με το συνδυασμό παραγόντων ATP (100 μM)-bFgf (15 ng/ml)-VEGF (50 ng/ml), σε διάλυμα HBSS-0,1% BSA, για 30 λεπτά. Ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA. Για τη διόρθωση μικρών διακυμάνσεων στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών φρεατίων, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Οι τιμές έκκρισης εκφράστηκαν ως % ποσοστό της τιμής των κυττάρων-μαρτύρων. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές (η κάθε συνθήκη σε διπλότυπα). Οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. *P<0,005, **P<0,001, ***P<0,0001.

Εξαίρεση από την παραπάνω παρατήρηση αποτέλεσαν τα siRNAs έναντι της Rab3b. Ενώ, δηλαδή, και τα δύο αποσιωπούσαν τη Rab3b σε παρόμοια ποσοστά, το πρώτο επέφερε μείωση της έκκρισης του vWF κατά 35%, ενώ το δεύτερο μία μικρή, στατιστικώς μη σημαντική, αύξηση. Ελέγξαμε, λοιπόν, την ειδικότητα των siRNAs αυτών και παρατηρήσαμε πως, ενώ το siRab3b-2 ήταν ειδικό έναντι της Rab3b, το siRab3b-1 αποσιωπούσε επίσης τη Rab3d, κατά $34,78 \pm 3,74$ % (Σχήμα 3.9A). Δεδομένου, λοιπόν, ότι το εξειδικευμένο siRNA έναντι της Rab3b (siRab3b-2) δεν επηρέαζε σημαντικά την

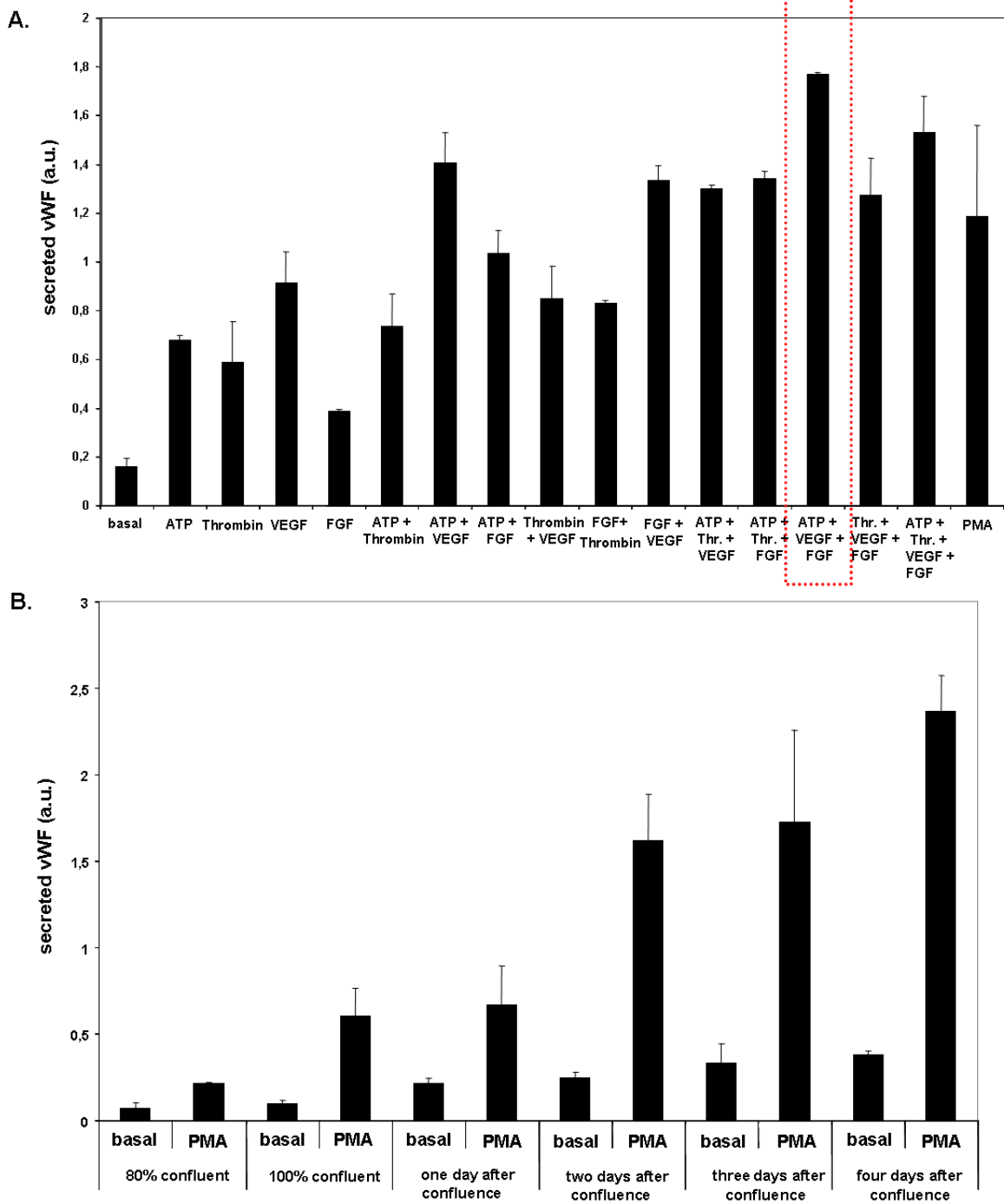
έκκριση του vWF, συμπεράναμε πως η πρωτεΐνη αυτή δεν αποτελεί ρυθμιστή του εκκριτικού μονοπατιού των WPBs.

Τέλος, αποσιώπηση των Rab27b, Rab33a, Rab33b και Rab37 δεν επηρέασε σημαντικά την έκκριση του vWF. Τα διαφορετικά siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν, σε κάθε περίπτωση, έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα.

Δεν μπορούμε, όμως να παραβλέψουμε, πως εγείρεται θέμα αναφορικά με την εξειδίκευση των siRNAs, κυρίως μεταξύ παραλόγων, που παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά αμινοξικής ομοιότητας μέσα στην οικογένεια των Rab. Ελέγξαμε, λοιπόν, με ανοσοαποτύπωση την επίδραση των siRNAs της Rab27b στα επίπεδα της Rab27a και το αντίστροφο. Παρατηρήσαμε πως, ενώ τα siRNAs έναντι της Rab27b δεν αποσιωπούσαν μη ειδικά τη Rab27a (Σχήμα 3.9C), τα siRNAs έναντι της Rab27a αποσιωπούσαν την υπερεκφρασμένη myc-hRab27b (Σχήμα 3.9B). Το αποτέλεσμα αυτό δεν επηρεάζει, όμως, την ερμηνεία των πειραμάτων της έκκρισης, εφόσον η Rab27b, από μόνη της, δε φαίνεται να επηρεάζει την εκκριτική διαδικασία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, ελέγξαμε με ποσοτική RT-PCR την επίπτωση της αποσιώπησης της Rab3a στα επίπεδα του μεταγράφου της Rab3d. Και τα δύο siRNAs της Rab3a κρίθηκαν ειδικά (Σχήμα 3.9A). Δεν πραγματοποιήσαμε έλεγχο της ειδικότητας των siRNAs έναντι των Rab33a και Rab33b, εφόσον οι πρωτεΐνες αυτές δεν επηρέασαν την έκκριση των WPBs. Τέλος, ελέγξαμε με ανοσοαποτύπωση την επίδραση της αποσιώπησης των Rab3, Rab15, Rab33 και Rab37 στην έκφραση της Rab27a, καθώς και την επίδραση της αποσιώπησης των Rab27a, Rab15, Rab33 και Rab37 στην έκφραση της Rab3d (Σχήμα 3.9D-E). Δεν παρατηρήσαμε αλλαγές στα επίπεδα των Rab27a και Rab3d κατόπιν αποσιώπησης των υπόλοιπων Rab. Συνολικά, τα πειράματα αυτά δείχνουν πως από τις πέντε Rabs που εντοπίζονται στα WPBs, οι Rab3, 15 και 27 εμπλέκονται στο μηχανισμό της έκκρισης.



Σχήμα 3.9: Έλεγχος της ειδικότητας των siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα έκκρισης. (A) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM) έναντι των Rab3a και Rab3b. 72 ώρες αργότερα απομονώθηκε ολικό RNA και με ποσοτική RT-PCR αναλύθηκαν τα επίπεδα των αντίστοιχων μεταγράφων, τα οποία και εκφράστηκαν ως % ποσοστά των επιπέδων των κυττάρων μαρτύρων. Για την ομαλοποίηση των τιμών χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα του μεταγράφου της GAPDH. (B) Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει την myc-hRab27b wt και 6 ώρες αργότερα με τα ολιγονουκλεοτίδια έναντι των Rab27a και Rab27b, σε τελική συγκέντρωση 25nM. Μετά από 72 ώρες, συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με το anti-myc αντίσωμα (για την ανίχνευση της myc-Rab27b). Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη. (C) Έλεγχος της επίδρασης της αποσίωπησης της Rab27b στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Rab27a. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη. (D-E) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25nM το καθένα) όπως αναφέρονται. Μετά από 72 ώρες, συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση και χρήση των αντισωμάτων a-Rab27a (D) και a-Rab3d(E).



Σχήμα 3.10: Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών ενεργοποίησης των WPBs.

(A) Κύτταρα HUVE, σε συρροή για 2 μέρες, ενεργοποιήθηκαν για 1 ώρα με τους παράγοντες ATP (100 μM), Thrombin (1 U/ml), VEGF (50 ng/ml), bFgf (15 ng/ml) και PMA (100 ng/ml), μόνους τους ή σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς και ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA και εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες. Με κόκκινο περίγραμμα έχει επισημανθεί ο συνδυασμός που επάγει τη βέλτιστη έκκριση. (B) Κύτταρα HUVE, σε αυξανόμενα επίπεδα οπτικής πυκνότητας, ενεργοποιήθηκαν για 1 ώρα με PMA (100 ng/ml). Η ποσοτικοποίηση της βασικής και επαγόμενης έκκρισης του vWF πραγματοποιήθηκε με ELISA και εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες. Τα πειράματα είναι

αντιπροσωπευτικά τριών (A) και δύο (B) ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τυπική απόκλιση.

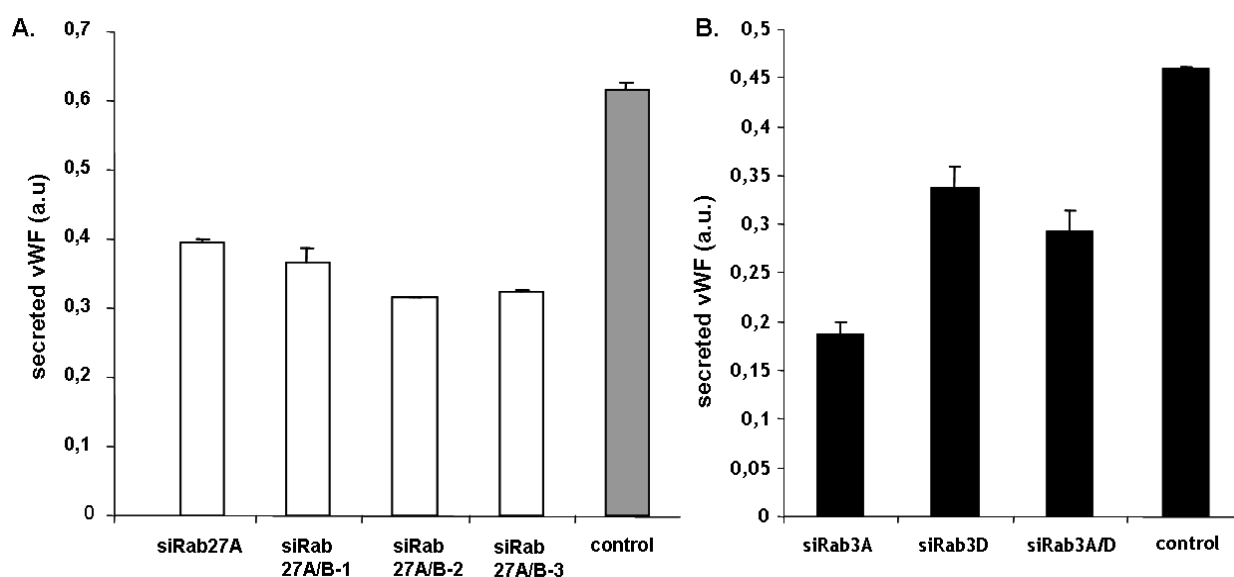
3.5 Ενορχηστρωμένη δράση των Rab27a, 3 και 15 απαιτείται για την έκκριση των WPBs

Τρεις Rabs (Rab27/3/15), λοιπόν, φαίνεται να ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs. Καμία από αυτές, όμως, μετά από αποσιώπησή της, δεν προκάλεσε μείωση της έκκρισης περισσότερο από 50%. Η υποοικογένεια της Rab27 αποτελείται από δύο μέλη (Rab27a/b), εκ των οποίων και τα δύο εκφράζονται στα HUVEC. Η υποοικογένεια, από την άλλη, της Rab3 αποτελείται από τέσσερα μέλη (Rab3a/b/c/d), εκ των οποίων τα δύο (Rab3a/d), ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs. Δεδομένου του υψηλού ποσοστού αμινοξικής ομοιότητας μεταξύ των μελών των υποοικογενειών των Rab, καθώς επίσης και του ότι αλληλεπιδρούν με τα ίδια μόρια-τελεστές, θελήσαμε να ελέγξουμε την υπόθεση το ένα μέλος της υποοικογένειας να αναπληρώνει μέρος της δράσης του άλλου στην έκκριση των WPBs.

Ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27a και Rab27b δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση της έκκρισης, από αυτή που προκαλούσε η αποσιώπηση της Rab27a από μόνη της (Σχήμα 3.11A). Άρα, από τις ισομορφές της Rab27, η Rab27a ελέγχει την έκκριση των WPBs, ενώ η Rab27b δε φαίνεται να συμμετέχει. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης της Rab27b έναντι της Rab27a (Σχήμα 3.5). Εναλλακτικά, μπορεί να οφείλεται στην μη ειδικότητα των siRNAs έναντι της Rab27a, αφού μπορούν να αποσιωπούν ως ένα βαθμό και τη Rab27b (Σχήμα 3.9C). Παρομοίως, ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab3a και Rab3d δεν οδήγησε σε διαφορετικό μοτίβο έκκρισης, από αυτό που προκαλούσε η αποσιώπηση κάθε μιας από τις παραπάνω πρωτεΐνες ξεχωριστά (Σχήμα 3.11B).

Σε ενδογενείς ποσότητες, λοιπόν, καμία από τις ισομορφές των Rab27 και Rab3 δε φαίνεται να παίζει το ρόλο μηχανισμού εφεδρείας για την άλλη ισομορφή και, επομένως, καμία από τις τρεις Rabs που ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs δεν έχει κυρίαρχο ρόλο στην έκκριση αυτή. Μήπως, λοιπόν, η πλήρης έκκριση των WPBs απαιτεί, την ενορχηστρωμένη δράση και των τριών Rabs; Προκειμένου να μελετήσουμε τη συσχέτιση των δράσεών τους στη φυσιολογική έκκριση των WPBs, αποσιωπήσαμε, σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς, τις τρεις αυτές πρωτεΐνες και μετρήσαμε την επίδραση στην επαγόμενη έκκριση του vWF. Παρατηρήσαμε πως ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27a

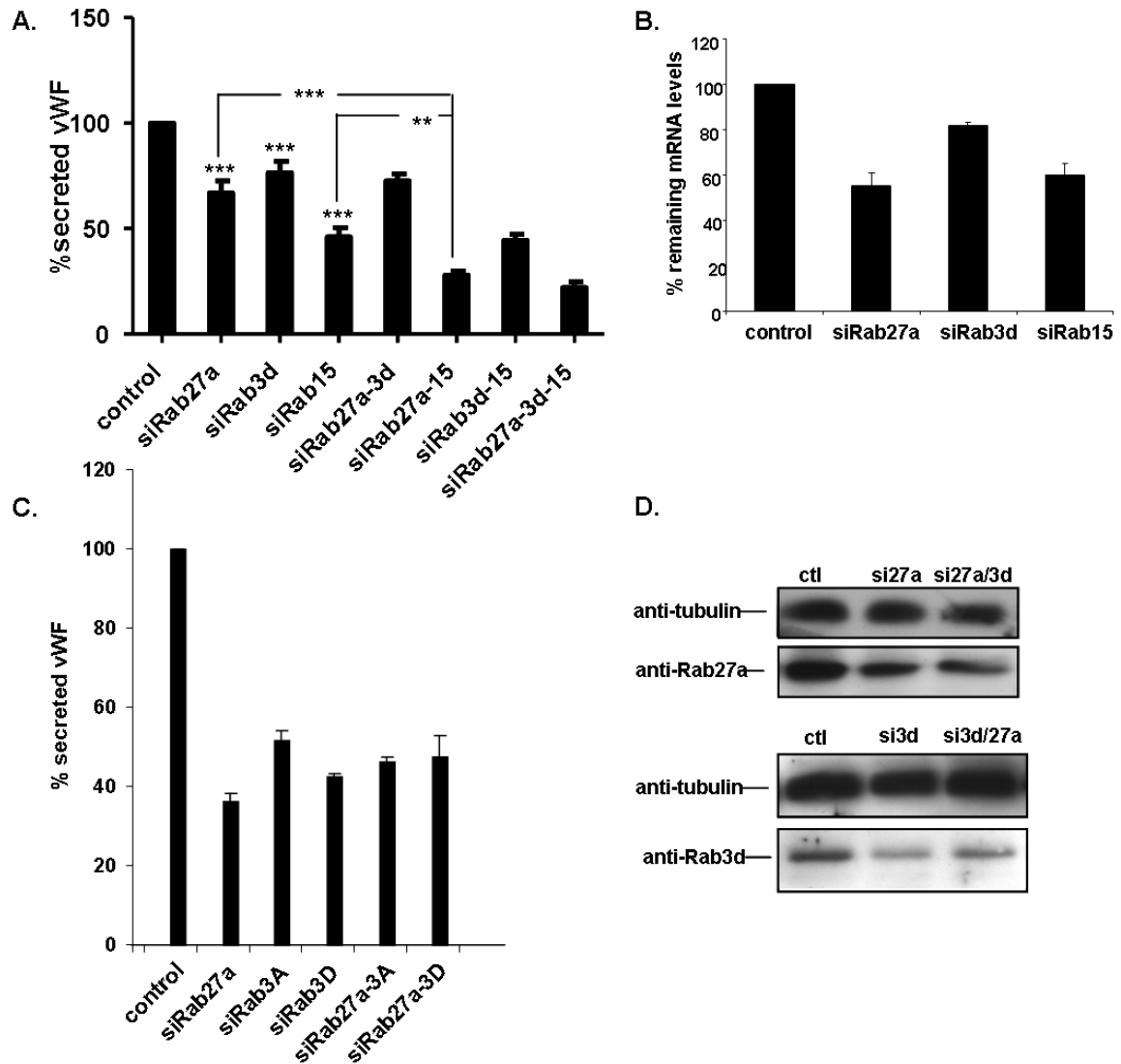
και Rab15 μειώνει σημαντικά περισσότερο την έκκριση σε σχέση με την αποσιώπηση κάθε μιας εκ των δύο αυτών πρωτεϊνών από μόνη της. Αντίθετα, στην περίπτωση της ταυτόχρονης αποσιώπησης των Rab27a και Rab3 δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση της έκκρισης συγκριτικά με την επίδραση που είχε η αποσιώπηση κάθε Rab ξεχωριστά. Τέλος, στην περίπτωση των Rab3 και Rab15, η ταυτόχρονη αποσιώπηση τους δε μειώνει την έκκριση περισσότερο από τα επίπεδα της μονής αποσιώπησης της Rab15 (Σχήμα 3.12A). Οι δύο αυτές Rabs, σε ενδογενείς πάντα ποσότητες, φαίνεται να ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs με ανεξάρτητους μηχανισμούς.



Σχήμα 3.11: Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM το καθένα) έναντι των Rab27a, Rab27b (A) και Rab3a, Rab3d (B), σε συνδυασμούς των δύο. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με το συνδυασμό παραγόντων ATP (100 μM)-bFgf (15 ng/ml)-VEGF (50 ng/ml), σε διάλυμα HBSS-0,1% BSA, για 30 λεπτά. Ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA. Για τη διόρθωση μικρών διακυμάνσεων στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών φρεατίων, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο ανεξάρτητες φορές (η κάθε συνθήκη σε διπλότυπα). Οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τυπική απόκλιση.

Η μικρότερη επίδραση στην έκκριση, που παρατηρήθηκε στο πείραμα του σχήματος 3.12A, σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα, όπου αποσιωπούσαμε κάθε μία Rab ξεχωριστά, οφείλεται στη μικρότερη αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Rabs, λόγω της ταυτόχρονης αποσιώπησης τριών μορίων (η αποσιώπηση των Rab27 και Rab15 δεν ξεπέρασε το 50%, ενώ η αντίστοιχη της Rab3d έφτασε μόλις το 20%) (Σχήμα 3.12B). Το γεγονός αυτό είναι, πιθανώς, αποτέλεσμα του

ανταγωνισμού μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων ως προς το σχηματισμό συμπλόκου με το κατιονικό λιπίδιο, καθώς στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε τριπλάσια ποσότητα συνολικού siRNA, λόγω της τριπλής αποσιώπησης, συγκριτικά με τα πειράματα απλής αποσιώπησης.



Σχήμα 3.12: (A) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM το καθένα) έναντι των Rab27a, Rab3d και Rab15 σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με το συνδυασμό παραγόντων ATP (100 μM)-bFgf (15 ng/ml)-VEGF (50 ng/ml), σε διάλυμα HBSS-0,1% BSA, για 30 λεπτά. Ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA. Για τη διόρθωση μικρών διακυμάνσεων στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών φρεατιών, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Οι τιμές έκκρισης εκφράστηκαν ως % ποσοστό της τιμής των κυττάρων-μαρτύρων. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο ανεξάρτητες φορές (η κάθε συνθήκη σε διπλότυπα). Οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. $^{**}P < 0,001$, $^{***}P < 0,0001$. (B) Έλεγχος της αποσιώπησης των Rab27a, Rab3d και Rab15 του πειράματος (A) με RT-PCR πραγματικού χρόνου. (C) Ομοίως με (A), αλλά με χρήση siRNA ολιγονουκλεοτιδίων (25 nM το καθένα) έναντι των Rab27a και Rab3a ή Rab3d. Οι μπάρες

στο γράφημα αντιπροσωπεύουν την τυπική διασπορά. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης της ταυτόχρονης αποσιώπησης των Rab27a και Rab3 στην έκκριση των WPBs, κάτω από συνθήκες μεγαλύτερης αποσιώπησης σχετικά με αυτές του πειράματος (A). (D) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (25 nM το καθένα) έναντι των Rab27a και Rab3d. Μετά από 72 ώρες, συλλέχτηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση και χρήση αντισωμάτων.

Προκειμένου να αποκλείσουμε την περίπτωση η έλλειψη περαιτέρω μείωσης της έκκρισης μετά από ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27a και Rab3d, να οφείλεται είτε στο μικρό ποσοστό αποσιώπησης της Rab3d, που παρατηρήθηκε στα πειράματα τριπλής αποσιώπησης, είτε στο ότι είναι η Rab3a, λόγω πιθανής διακριτής δράσης από τη Rab3d, αυτή που συνεργάζεται με τη Rab27a, πραγματοποιήσαμε πειράματα διπλής αποσιώπησης, είτε των Rab27a και Rab3d, είτε των Rab27a και Rab3a. Και πάλι, όμως, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της αναστολής σε κανέναν από τους συνδυασμούς των Rab που αποσιωπήθηκαν (Σχήμα 3.12C). Σε όλα, λοιπόν, τα πειράματα η αποσιώπηση είτε της Rab27 είτε της Rab3 έδινε παρόμοια επίδραση στην έκκριση, ενώ η ταυτόχρονη αποσιώπησή τους δεν προκαλούσε περαιτέρω επίδραση στην έκκριση. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν στο ίδιο μονοπάτι ρύθμισης της έκκρισης των WPBs και μάλιστα διαδοχικά, και κατά συνέπεια, όποια από τις δύο κι αν αποσιωπηθεί το μονοπάτι αυτό ρύθμισης τερματίζεται. Μέσω αυτού του μονοπατιού ρυθμίζεται το 50% της έκκρισης των WPBs.

3.6 Η Munc13-4 ρυθμίζει την έκκριση των WPBs

Προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό έκκρισης των WPBs, προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες-τελεστές των Rab GTPασών που δείξαμε να εντοπίζονται στα οργανίδια αυτά. Πιο συγκεκριμένα, εργαστήκαμε με τη Rab27a, η οποία είναι η πρώτη Rab που βρέθηκε να εντοπίζεται στα WPBs. Για να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες-τελεστές της Rab27a στα ενδοθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του συστήματος των δύο υβριδίων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Να σημειώσουμε, στο σημείο αυτό, πως μέχρι σήμερα τέσσερις από τους τελεστές της Rab27a (οι Slp1, Slp2, Slp4 και η melanophilin) έχουν ταυτοποιηθεί με την ίδια τεχνική, από βιβλιοθήκη κερατινοκυττάρων και λευκοκυττάρων (Strom et al., 2002) (McAdara Berkowitz et al., 2001). Η παρούσα σάρωση ήταν προσφορά της εταιρίας Dualsystems Biotech AG, (Zurich, Switzerland), στα πλαίσια συνεργασίας σε κοινό ερευνητικό πρόγραμμα. Ως δώλωμα χρησιμοποιήθηκε η hRab27aQ78L (GTP-locked μορφή) και ως θήραμα τα προϊόντα έκφρασης μιας cDNA

βιβλιοθήκης από ανθρώπινο πλακούντα. Η επιλογή του ιστού στηρίχτηκε στο γεγονός πως πρόκειται για έναν ιστό πλούσιο σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η έκφραση της Rab27a σε αυτόν είναι σημαντικά μεγαλύτερη, αναφορικά με τις ποσότητες που παρατηρήθηκαν στο σπλήνα και στον εγκέφαλο (Σχήμα 3.13B).

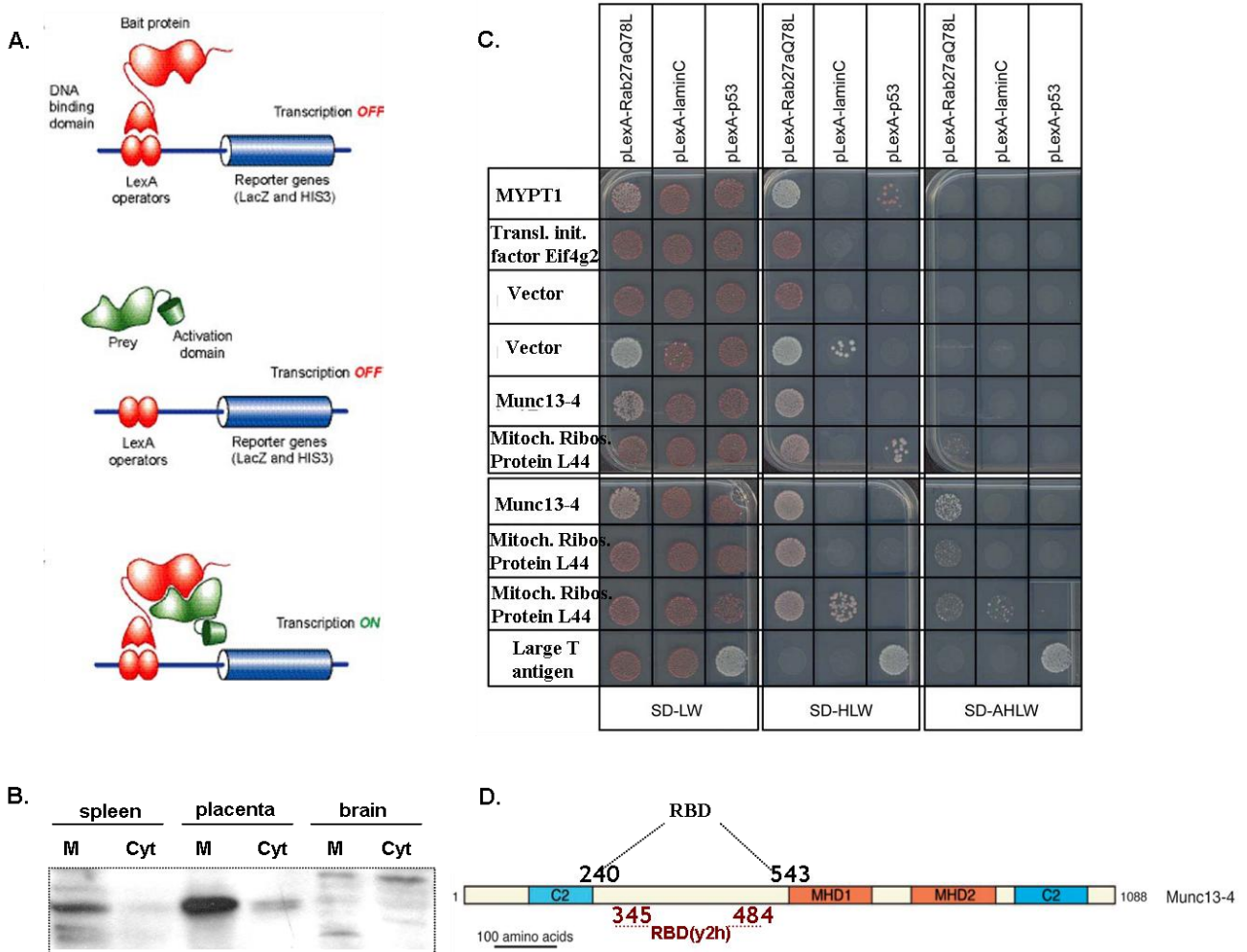
Ταυτοποιήθηκαν, με την τεχνική αυτή, τέσσερις πρωτεΐνες, οι οποίες δυνητικά αλληλεπιδρούν με τη Rab27a. Τα αποτελέσματα του ελέγχου εξάρτησης της αλληλεπίδρασης από το δόλωμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), παρουσιάζονται στο σχήμα 3.13C. Από αυτά προκύπτει πως η πιο αξιόπιστη αλληλεπίδραση είναι με τη Munc13-4 (2 κλώνοι), δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς, όταν συνεκφράζεται με τα δολώματα-μάρτυρες (LexA-laminC, LexA-p53), και τα μετασηματισμένα κύτταρα ζύμης που τη φέρουν αναπτύσσονται στο πιο αυστηρό υλικό διαλογής (Σχήμα 3.13C).

Η Munc13-4 είναι ένας από τους γνωστούς τελεστές της Rab27a (Shirakawa et al., 2004). Η περιοχή της Munc13-4 που βρέθηκε από τη σάρωση να είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τη Rab27a εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 345-484 (Σχήμα 3.13D).

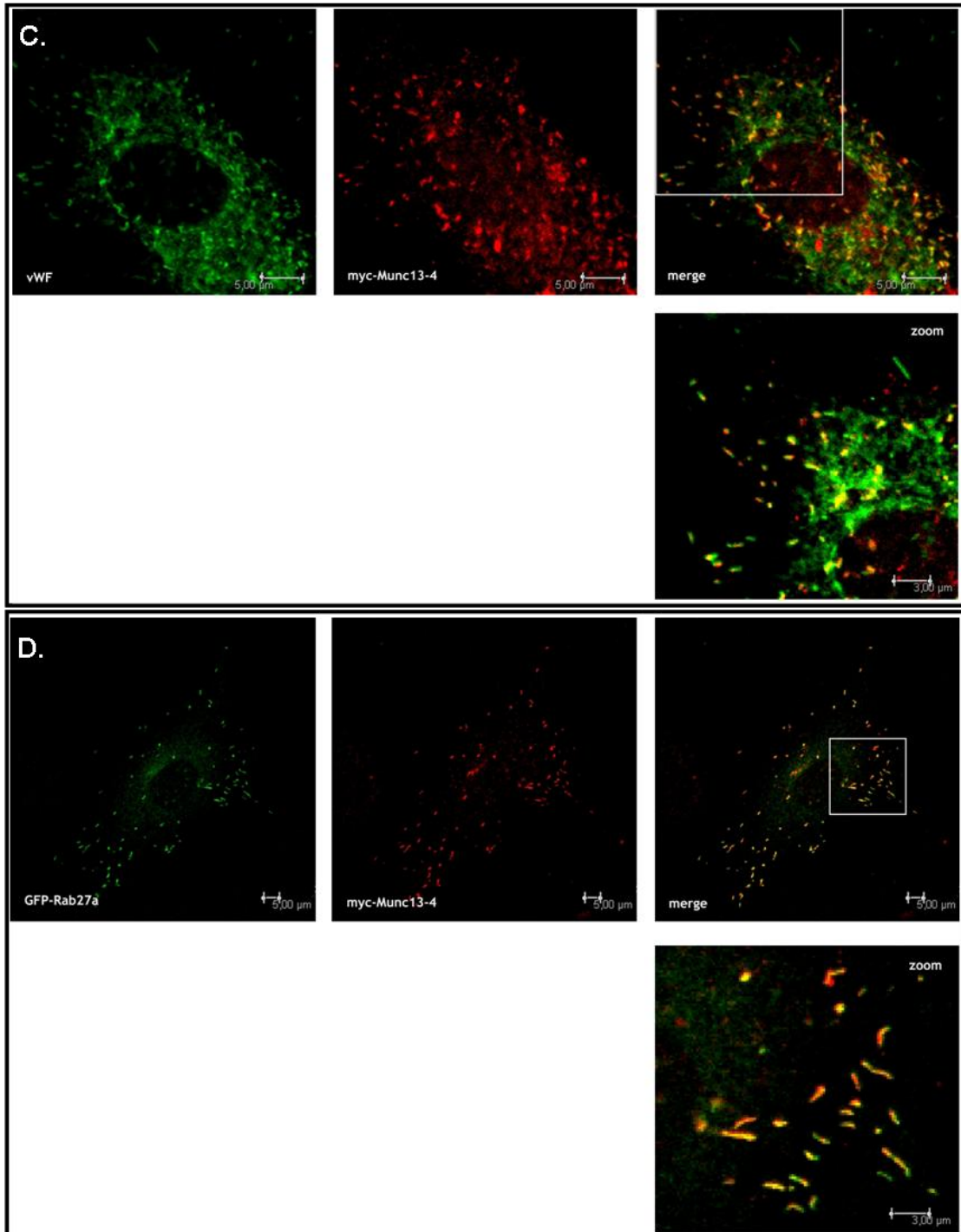
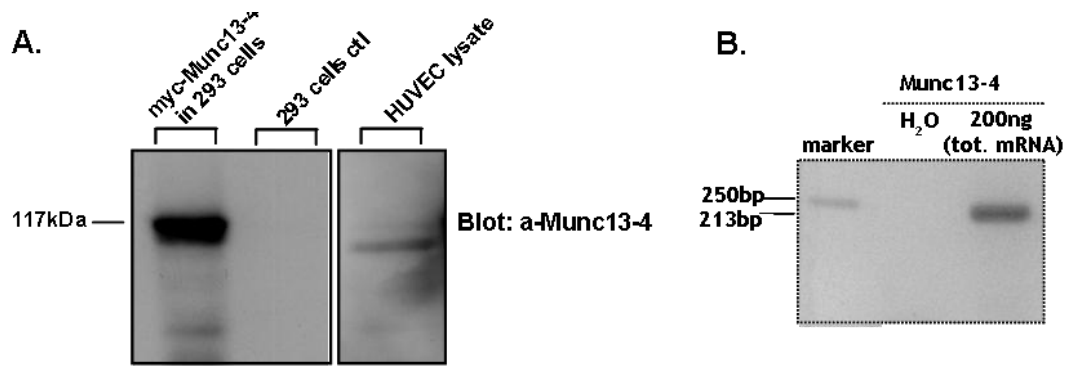
Συμπληρωματικά με την τεχνική αυτή, προσπαθήσαμε να καταβυθίσουμε πρωτεΐνες-τελεστές από εκχύλισμα ανθρώπινου πλακούντα, μετά από επώαση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-Rab27a, η οποία είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί με GDP ή GTPγS. Τα πειράματα αυτά δεν απέδωσαν, αντίθετα με την περίπτωση άλλων Rabs (Christoforidis and Zerial, 2000), πιθανά λόγω ελλιπούς διαμόρφωσης της Rab27a, που μπορεί να οφείλεται στη βακτηριακή έκφραση (βλ. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ, σελ.106-Ενότητα Σ3) (Κρίθηκε σκόπιμο να παρουσιαστούν μερικά πειράματα σε ξεχωριστή ενότητα, ως «Συμπληρωματικά Αποτελέσματα», σελίδες 102-112, μετά την ενότητα «Αποτελέσματα», προκειμένου να διευκολυνθεί η ροή των κύριων αποτελεσμάτων).

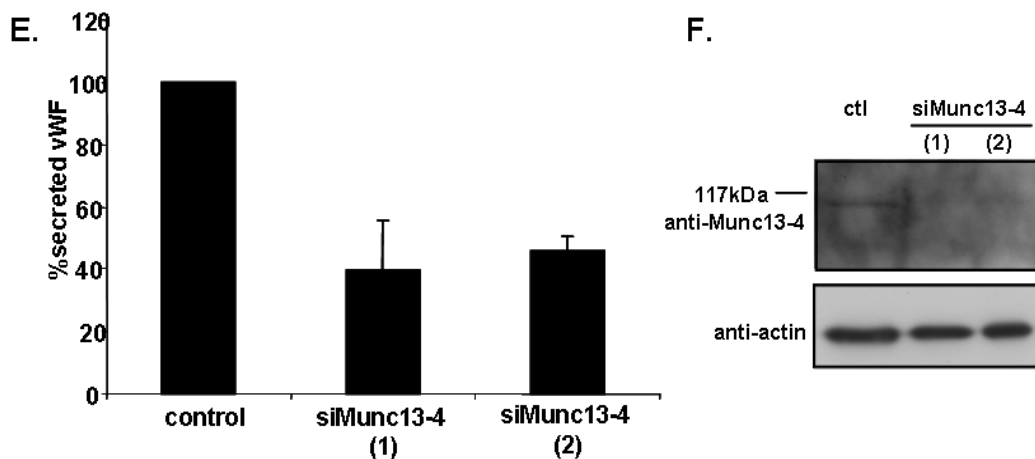
Η πρωτεΐνη Munc13-4, που προέκυψε από τη σάρωση, έχει βρεθεί, μέχρι σήμερα, να εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς. Η πρόσδεσή της στη ενεργό μορφή της GTPάσης αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα στο μηχανισμό εξωκυττάρωσης των αιμοποιητικών κυττάρων (Neeft et al., 2005). Ελέγξαμε, αρχικά, αν η Munc13-4 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Με χρήση ειδικού αντισώματος η Munc13-4 ανιχνεύτηκε σε εκχύλισμα HUVEC (Σχήμα 3.14A). Παράλληλα, με RT-PCR και χρήση εξειδικευμένων εκκινητών ανιχνεύσαμε το μετάγραφο της σε ολικό RNA από HUVEC (Σχήμα 3.14B). Η καμπύλη τήξης επιβεβαίωσε την ειδικότητα του προϊόντος της RT-PCR,

ενώ ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης έδειξε την ορθότητα του μεγέθους του. Από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε πως η Munc13-4 εκφράζεται στα κύτταρα HUVE.



Σχήμα 3.13: (A) Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής του συστήματος των δύο υβριδίων. (B) Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Rab27a σε μεμβράνες και κυτταρόπλασμα σπλήνα, πλακούντα και εγκεφάλου. (C) Τα αποτελέσματα του ελέγχου εξάρτησης της αλληλεπίδρασης από το δόλωμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Στην αριστερή στήλη εμφανίζονται οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική των δύο υβριδίων. (D) Σχηματική αναπαράσταση της δομής της Munc13-4. Η περιοχή 240-543 είναι η ήδη δημοσιευμένη περιοχή της Munc13-4, που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τη Rab27a, ενώ η περιοχή 345-484 είναι η αντίστοιχη που προέκυψε από τη σάρωση.





Σχήμα 3.14: (A) Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ενδογενούς Munc13-4 σε κύτταρα HUVE (30 μg συνολικού κυτταρικού εκχυλίσματος). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολικό εκχύλισμα HEK-293 κυττάρων που υπερέκφραζαν την myc-Munc13-4. (B) Έλεγχος της έκφρασης της Munc13-4 με RT-PCR. Το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε 2% πηκτή αγαρόζη. (C) Κύτταρα HUVE, που καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένες με κολλαγόνο γυάλινες καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή myc-Munc13-4. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF και μονοκλωνικό έναντι του επιτόπου myc. (D) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με τις πλασμιδιακές κατασκευές GFP-Rab27a και myc-Munc13-4. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP και μονοκλωνικό έναντι του επιτόπου myc. Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση. (E) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (50 nM) έναντι της Munc13-4. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με το συνδυασμό παραγόντων ATP (100 μM)-bFgf (15 ng/ml)-VEGF (50 ng/ml), σε διάλυμα HBSS-0,1% BSA, για 30 λεπτά. Ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA. Για τη διόρθωση μικρών διακυμάνσεων στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών φρεατίων, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Οι τιμές έκκρισης εκφράστηκαν ως % ποσοστό της τιμής των κυττάρων-μαρτύρων. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο ανεξάρτητες φορές (η κάθε συνθήκη σε διπλότυπα). Οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. (F) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια (50 nM) έναντι της Munc13-4. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποσιώπησης με ανοσοαποτύπωση και χρήση ειδικού αντισώματος. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της πρωτεΐνης σε κύτταρα HUVE. Η ανίχνευση της ενδογενούς Munc13-4 με ανοσοφθορισμό δεν κατέστη δυνατή. Πειράματα υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης myc-Munc13-4 σε κύτταρα HUVE ανέδειξαν μία διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, αλλά και ξεκάθαρο εντοπισμό στα WPBs (παρατήρηση μετά από ταυτόχρονη χρώση έναντι του vWF) (Σχήμα 3.14C). Εξετάσαμε, στη συνέχεια, την επίδραση της Rab27a στον εντοπισμό της myc-Munc13-4. Υπερέκφραση της Rab27a αύξησε τον εντοπισμό της Munc13-4 στα WPBs (όπου

συνεντοπιζόταν με τη Rab27a), μειώνοντας από την άλλη πλευρά τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της (Σχήμα 3.14D).

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Munc13-4 στην έκκριση των WPBs, πραγματοποιήσαμε πειράματα αποσιώπησης, με χρήση εξειδικευμένων ολιγονουκλεοτιδίων και προσδιορίσαμε την επίδρασή της στην ATP/bFgf/VEGF-επαγόμενη έκκριση των WPBs. Αποσιώπηση της Munc13-4 οδήγησε σε μείωση της έκκρισης των WPBs κατά ένα ποσοστό της τάξης του 60% (Σχήμα 3.14E). Συμπερασματικά, λοιπόν, η Munc13-4 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE, εντοπίζεται στα Rab27a-θετικά WPBs (εντόπιση που ενισχύεται κατόπιν υπερέκφρασης της Rab27a) και είναι απαραίτητη για την έκκρισή τους. Αποτελεί, έτσι, έναν τουλάχιστον από τους τελεστές που μεσολαβούν τη θετική ρυθμιστική δράση της Rab27a στην έκκριση των WPBs.

3.7 Η Munc13-4 αλληλεπιδρά με τη Rab15

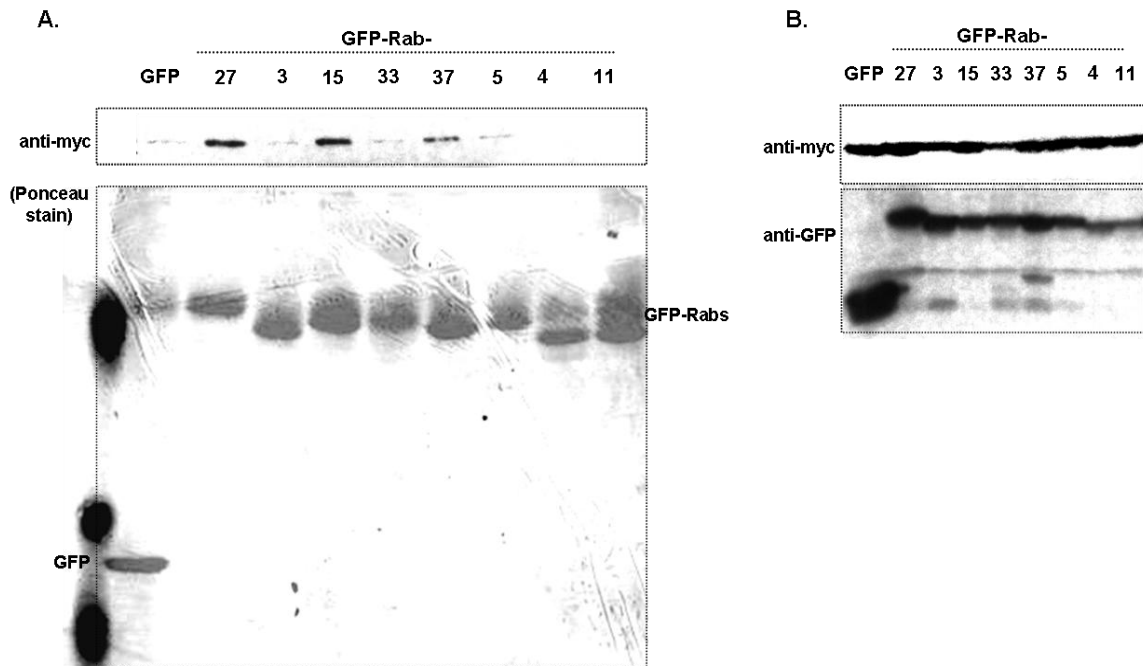
Μέχρι σήμερα, η μόνη Rab GTPάση που είναι γνωστό πως αλληλεπιδρά με τη Munc13-4 είναι η Rab27a. Στα WPBs, όμως, εντοπίζονται τέσσερις επιπλέον Rab GTPάσες. Ελέγξαμε, λοιπόν, αν η Munc13-4 αλληλεπιδρά με κάποια από αυτές. Μέχρι σήμερα, εξάλλου, έχουν περιγραφεί αρκετοί τελεστές που αλληλεπιδρούν με περισσότερες της μιας Rabs (Fukuda et al., 2008). Επιπλέον, στα ιστιοκύτταρα και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, η Munc13-4 εντοπίζεται, εκτός από τα Rab27a-θετικά εκκριτικά κυστίδια των κυττάρων αυτών, και σε ενδοσωμικά διαμερίσματα, στα οποία δεν υπάρχει η Rab27a (Menager et al., 2007) (Neef et al., 2005). Οι παραπάνω μελέτες υποδηλώνουν πως και άλλες πρωτεΐνες, εκτός της Rab27a, είναι υπεύθυνες για τη μεμβρανική στόχευση της Munc13-4.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοκαταβύθισης ελέγξαμε την αλληλεπίδραση της myc-Munc13-4 με τις σημασμένες GFP-Rab27a, GFP-Rab3a, GFP-Rab15, GFP-Rab33a, GFP-Rab37, καθώς επίσης και με τις GFP-Rab5, GFP-Rab4 και GFP-Rab11. Ουσιαστικά, δηλαδή, ελέγξαμε όλες τις Rabs, που βρήκαμε να εντοπίζονται στα WPBs, αν αλληλεπιδρούν με τη Munc13-4. Επίσης, επειδή μέχρι σήμερα η Rab15 έχει αναφερθεί ως αποκλειστικά ενδοσωμική Rab, η οποία συνεντοπίζεται με τις Rab5, Rab4 και Rab11, συμπεριλάβαμε τις τρεις τελευταίες στον έλεγχο. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.15, η μόνη άλλη Rab GTPάση που παρατηρήθηκε να δεσμεύεται, στον ίδιο βαθμό με τη Rab27a, στη

Munc13-4, είναι η Rab15, ενώ μία μικρή, αλλά μη επαναλήψιμη αλληλεπίδραση, παρατηρήθηκε και με τη Rab37.

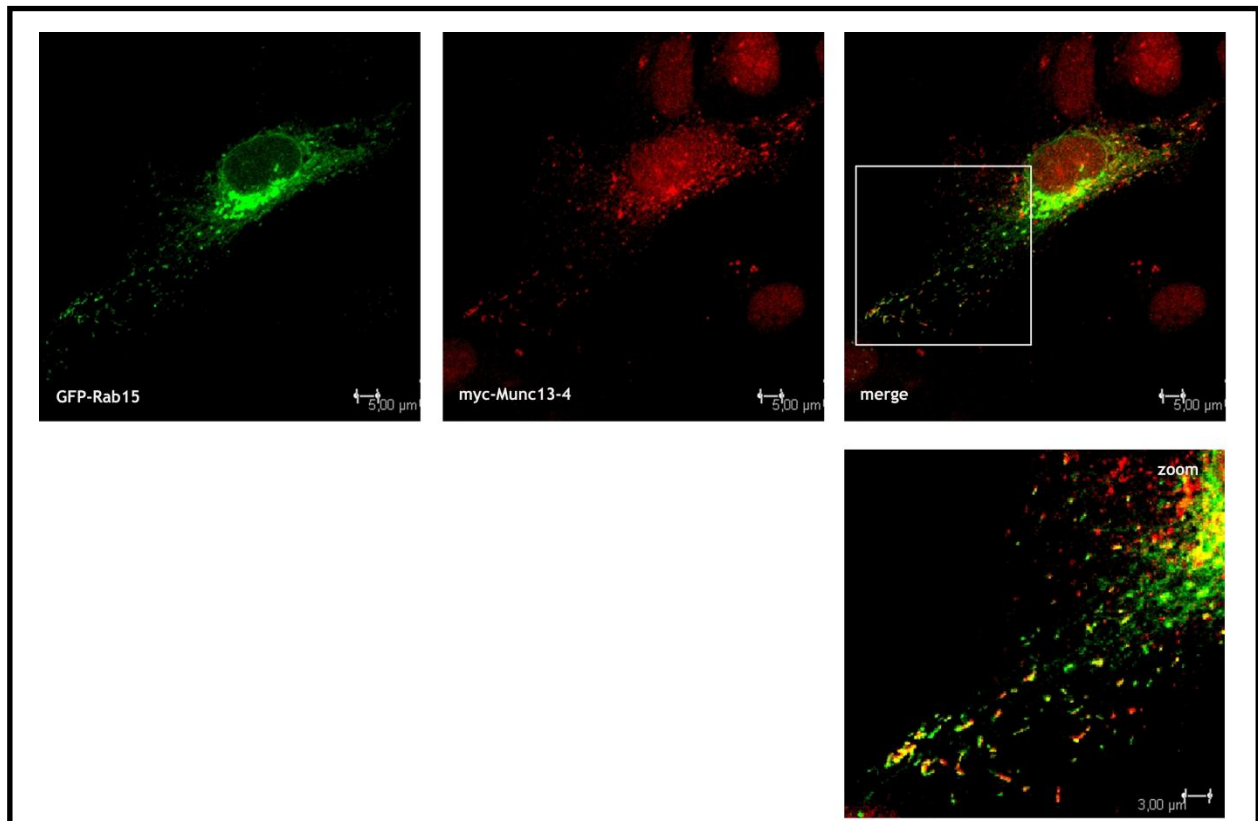
Προκειμένου, τέλος, να εντοπίσουμε το ενδοκυττάριο διαμέρισμα, στο οποίο μπορεί να πραγματοποιείται αυτή η αλληλεπίδραση, δεδομένου ότι τόσο η Munc13-4 όσο και η Rab15 εντοπίζονται και σε άλλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, διακριτά των WPBs, υπερεκφράσαμε σε κύτταρα HUVE τις myc-Munc13-4 και GFP-Rab15 και παρατηρήσαμε σαφή συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών σε οργανίδια που φέρουν το χαρακτηριστικό σχήμα των WPBs (Σχήμα 3.16).

Συμπερασματικά, λοιπόν, η Rab15 αλληλεπιδρά με τη Munc13-4, μία αλληλεπίδραση που δυνητικά παρέχει τη μηχανιστική βάση της αθροιστικής επίδρασης που έχει η ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27 και Rab15 στην έκκριση των WPBs.



Σχήμα 3.15: Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ των Rab15 και Munc13-4.

(A) Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με τις DNA κατασκευές myc-Munc13-4 και GFP ή GFP-Rab27a ή GFP-Rab3a ή GFP-Rab15 ή GFP-Rab33a ή GFP-Rab37 ή GFP-Rab5 ή GFP-Rab4 ή GFP-Rab11. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα λύθηκαν παρουσία 100 μ M GTP γ S και 0,5% Triton και φυγοκεντρήθηκαν στα 100.000 g για 1 ώρα, στους 4°C. 1 mg εκχυλίσματος επώαστηκε με anti-GFP αντίσωμα που ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένο με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα γλυκίνης (0,1 M glycine pH 2,5). Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με χρήση του anti-myc αντισώματος, ενώ με ponceau χρώση ελέγχθηκε η ανοσοκαταβύθιση των GFP-Rab. (B) 50 μ g του αρχικού εκχυλίσματος, πριν την ανοσοκαταβύθιση, αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση και χρήση αντισωμάτων έναντι των myc και GFP επιτόπων.

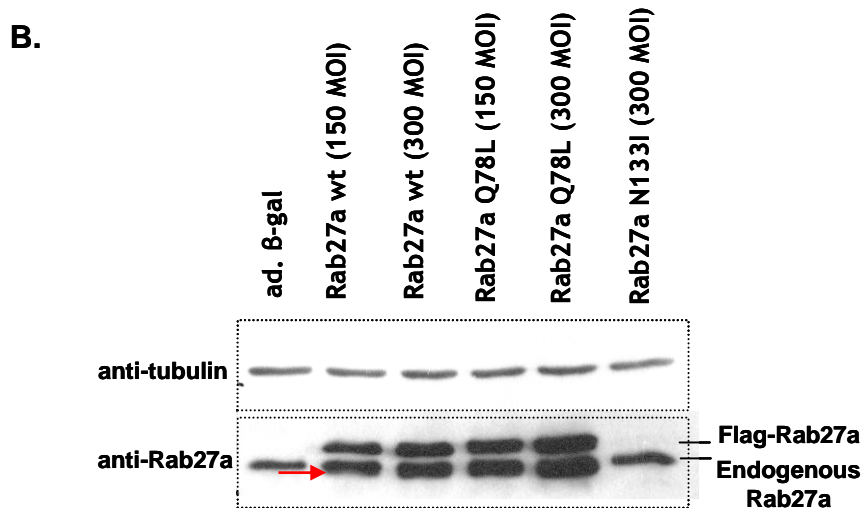
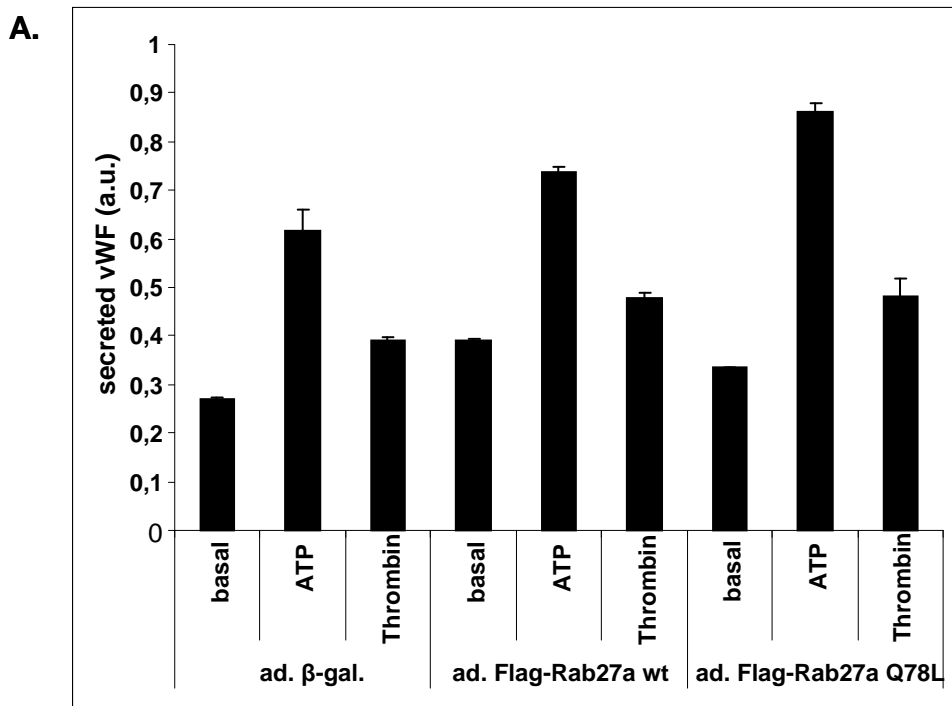


Σχήμα 3.16: Οι Munc13-4 και Rab15 συνεντοπίζονται σε οργανίδια που φέρουν το χαρακτηριστικό σχήμα των WPBs. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με τις πλασμιδιακές κατασκευές GFP-Rab15 και myc-Munc13-4. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GFP και μονοκλωνικό έναντι του επιτόπου myc. Τα δείγματα αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση.

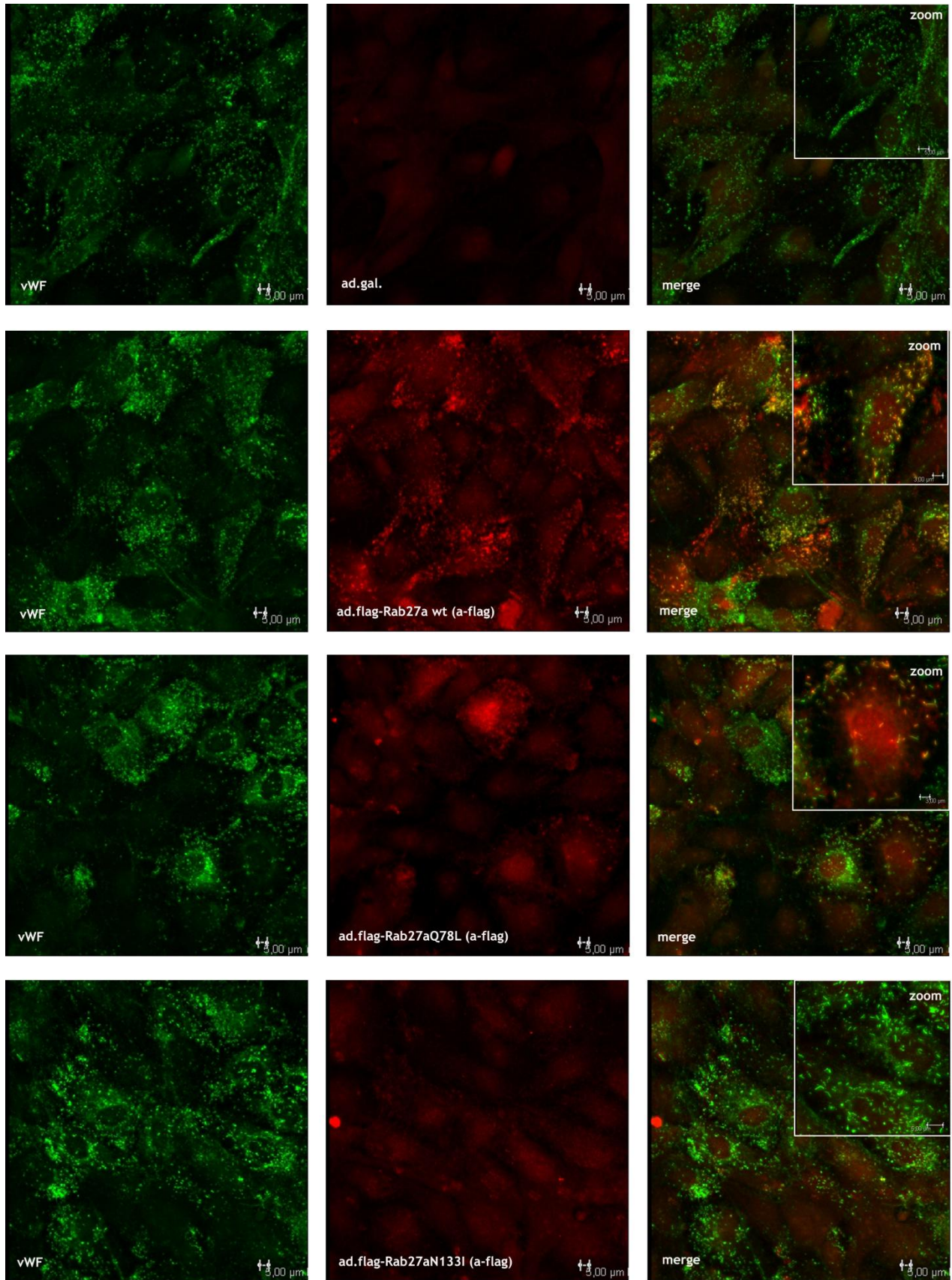
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σ.1 Υπερέκφραση της Rab27a αυξάνει την επαγόμενη έκκριση των WPBs

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία έδειξε πως η αποσιώπηση της Rab27a αυξάνει την επαγόμενη έκκριση των WPBs (Nightingale et al., 2009). Επειδή το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις δικές μας παρατηρήσεις, χρησιμοποιήσαμε μία συμπληρωματική μεθοδολογία για να ελέγξουμε περαιτέρω το ρόλο της Rab27a. Υπερεκφράσαμε, λοιπόν, με το σύστημα των αδενοϊών τόσο την αγρίου τύπου μορφή της Rab27a (ad Flag-Rab27a wt), όσο και τη διαρκώς ενεργή ad Flag-Rab27a Q78L (GTP-locked) σε κύτταρα HUVE. Η υπερέκφραση της Rab27a wt οδήγησε σε αύξηση της επαγόμενης έκκρισης κατά 20% περίπου, ενώ στην περίπτωση υπερέκφρασης της διαρκώς ενεργούς μορφής της Rab27a (Rab27a Q78L) η ATP-επαγόμενη έκκριση αυξήθηκε κατά 40% (Σχήμα Σ.1Α). Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων της flag-Rab27a, τόσο της αγρίου τύπου, όσο και της διαρκώς ενεργούς μορφής, με ανοσοαποτύπωση, έδειξε πως σε κάθε περίπτωση εμφανιζόταν μία ζώνη μεγαλύτερης ηλεκτροφορητικής ταχύτητας από την αναμενόμενη, που πιθανά αποτελεί πρωτεολυτικό προϊόν (Σχήμα Σ.1Β). Στην περίπτωση μόλυνσης των HUVEC με MOI (multiplicity of infection) 150 το πρωτεολυτικό αυτό προϊόν ήταν αμελητέο, ενώ η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη ήταν σε επίπεδα παρόμοια της ενδογενούς και επομένως η συνθήκη αυτή επιλέχθηκε για τα περάματα έκκρισης. Το 60-70% των κυττάρων είχαν μολυνθεί, κάτω από τις συνθήκες αυτές και οι αδενοϊκά υπερεκφρασμένες Flag-Rab27a wt και Flag-Rab27a Q78L εντοπίζονταν στη μεμβράνη των WPBs (Σχήμα Σ.2). Προσπαθήσαμε επίσης να υπερεκφράσουμε τη Flag-Rab27a N133I (διαρκώς ανενεργή μορφή της Rab27a) σε κύτταρα HUVE, χωρίς όμως επιτυχία (Σχήμα Σ.1Β, Σ.2). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς οφείλεται σε υψηλό βαθμό πρωτεόλυσης της μεταλλαγμένης αυτής μορφής της Rab27a, όπως έχει ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά (Ramalho et al., 2002).



Σχήμα Σ.1: Η υπερέκφραση της Rab27a επάγει την έκκριση του vWF. (A) Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς Flag-Rab27a wt και Flag-Rab27a Q78L, σε 150 MOI, και 48 ώρες αργότερα, ενεργοποιήθηκαν με ATP (100 μM), ή Thrombin (1 U/ml), σε διάλυμα HBSS-0,1% BSA, για 30 λεπτά. Ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA. (B) Ανοσοαιotyπωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των αδενοϊκά υπερεκφρασμένων μορφών της Rab27a, μετά από μόλυνση κυττάρων HUVE σε διαφορετικά MOI. Εκτός από την υπερεκφρασμένη και την ενδογενή Rab27a, παρατηρείται μία ζώνη ελάχιστα μεγαλύτερης ηλεκτροφορητικής ταχύτητας από αυτή της ενδογενούς (σημειώνεται με κόκκινο βέλος), πιθανό πρωτεολυτικό προϊόν της υπερεκφρασμένης μορφής. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη.

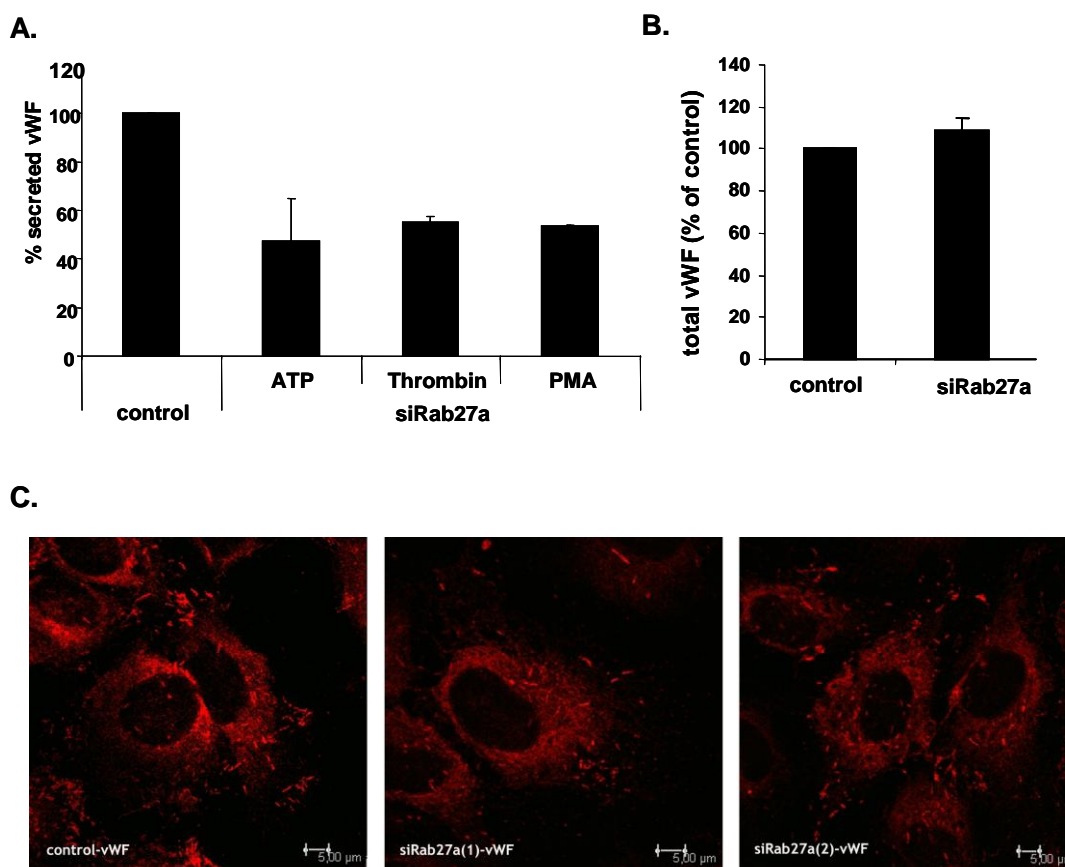


Σχήμα Σ.2: Εντοπισμός των αδενοϊκά εκφρασμένων μορφών της Rab27a. Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς β-gal., Flag-Rab27a wt, Flag-Rab27a Q78L και Flag-

Rab27a N133I, σε 150 MOI. Μετά από παρέλευση 48 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του flag επιτόπου και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF.

Σ.2 Ο ρόλος της Rab27a στην έκκριση των WPBs είναι ανεξάρτητος του ενεργοποιητή

Στην ενότητα αυτή, ελέγξαμε κατά πόσο ο ρόλος της Rab27a στην έκκριση των WPBs εξαρτάται από τη φύση του ενεργοποιητή. Ως ενεργοποιητές χρησιμοποιήθηκαν το ATP (οδηγεί σε αύξηση ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου και κυκλικού AMP), η θρομβίνη (οδηγεί σε αύξηση ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου) και το PMA (ανάλογο της DAG που ενεργοποιεί την PKC). Σε όλες της περιπτώσεις παρατηρήσαμε μείωση της έκκρισης, μετά από αποσιώπηση της Rab27a (Σχήμα Σ.3A). Να σημειωθεί στο σημείο αυτό, πως η αποσιώπηση της Rab27a δεν επηρεάζει τα συνολικά επίπεδα ενδοκυττάριας vWF (Σχήμα Σ.3B), ούτε τη μορφολογία των WPBs (Σχήμα Σ.3C).



Σχήμα Σ.3: Ο ρόλος της Rab27a στην έκκριση του vWF είναι ανεξάρτητος του ενεργοποιητή. (A) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδιο (25 nM) έναντι της Rab27a. Μετά από παρέλευση 72 ωρών, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με τους παράγοντες ATP (100 μM), Thrombin (1 U/ml) και PMA (100 ng/ml), σε διάλυμα HBSS-

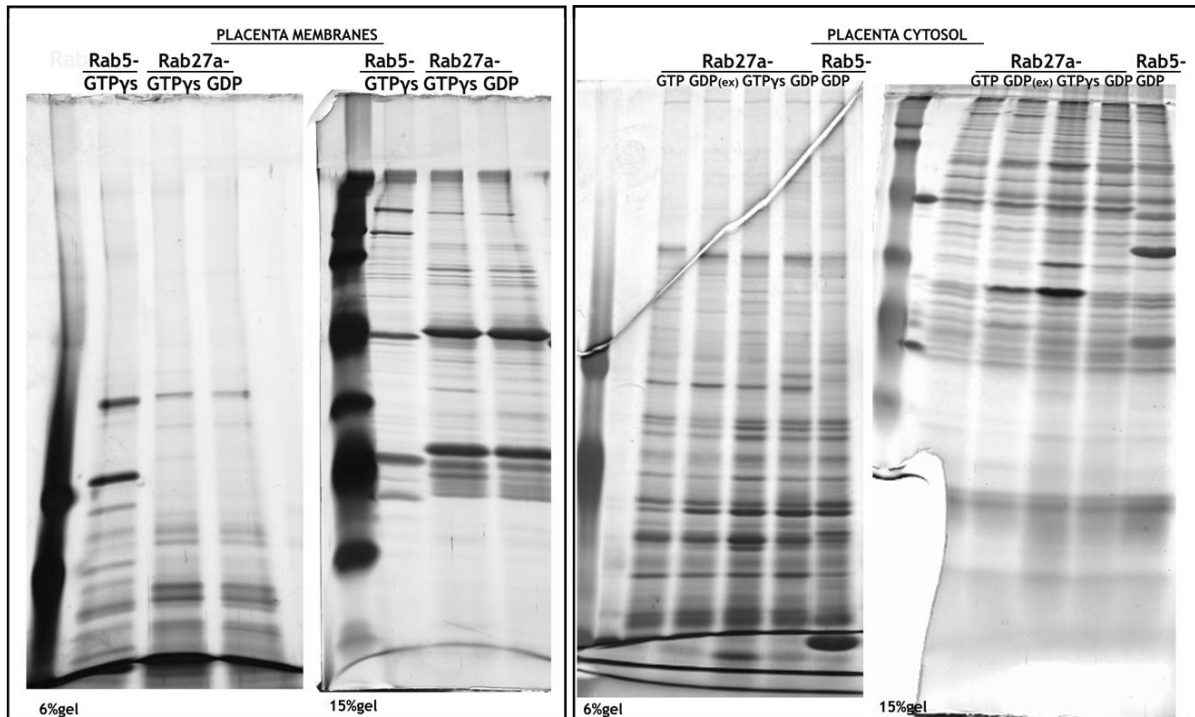
0,1% BSA, για 30 λεπτά. Ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA. Για τη διόρθωση μικρών διακυμάνσεων στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών φρεατίων, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Οι τιμές εκφράστηκαν ως % ποσοστό της τιμής των κυττάρων-μαρτύρων. Τα πειράματα είναι αντιπροσωπευτικά τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, ενώ οι μπάρες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τυπική απόκλιση. (B) Ποσοτικοποίηση του ολικού vWF σε κυτταρικό εκχύλισμα HUVEC, μετά από αποσιώπηση της Rab27a, με ELISA. (C) Παρατήρηση των WPBs, σε συνθήκες αποσιώπησης της Rab27a.

Συμπερασματικά, λοιπόν, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθοδολογίες, αποσιώπηση και υπερέκφραση της Rab27a, παρατηρήσαμε πως η GTPάση αυτή είναι απαραίτητη για την έκκριση των WPBs και, επιπλέον, η δράση της είναι ανεξάρτητη του ενεργοποιητή.

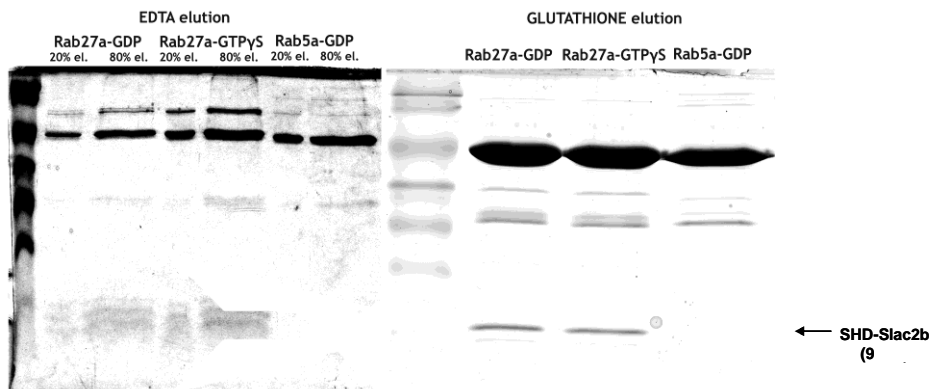
Σ.3 Προσπάθεια καταβύθισης πρωτεϊνών-τελεστών της Rab27a από ανθρώπινο πλακούντα, μετά από επώαση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-Rab27a.

Στην προσπάθειά μας να καταβυθίσουμε πρωτεΐνες-τελεστές από εκχύλισμα ανθρώπινου πλακούντα, μετά από επώαση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-Rab27a, η οποία είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί με GDP ή GTPγS, παρατηρήσαμε ότι η Rab27a καταβύθιζε τις ίδιες πρωτεΐνες, είτε της χορηγούσαμε GDP είτε GTPγS (Σχήμα Σ.4), ενώ είναι γνωστό πως οι Rab GTPάσες αλληλεπιδρούν με τους τελεστές τους στην ενεργό, GTP-προσδεμένη, διαμόρφωσή τους. Ελέγξαμε, στη συνέχεια, τη λειτουργικότητα της ανασυνδυασμένης GST-Rab27a, σταθεροποιημένη είτε με GDP είτε με GTPγS, χορηγώντας της τμήμα της πρωτεΐνης Slac2b (SHD-Slac2b, πρόκειται για τη συντηρημένη περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο της Slac2b, γνωστού τελεστή της Rab27a, υπεύθυνης για την πρόσδεση του τελεστή στη GTPάση). Παρατηρήσαμε πως η SHD περιοχή της Slac2b αλληλεπιδρούσε τόσο με τη GDP- όσο και με τη GTPγS- Rab27a (Σχήμα Σ.5 glutathione elution). Η αλληλεπίδραση, λοιπόν, συνέβαινε ανεξάρτητα του προσδεμένου νουκλεοτιδίου, δηλαδή ανεξάρτητα από τη θεωρητικά διαφορετική διαμόρφωση της Rab27a όταν προσδένει GDP σε σχέση με GTP, γεγονός που ενισχυόταν από την παρατήρηση πως η χορήγηση EDTA, που απομακρύνει το νουκλεοτίδιο από τη Rab27a, καθώς η σύνδεση των νουκλεοτιδίων είναι Mg^{+2} -εξαρτώμενη, δεν ελευθερώνει τον τελεστή Slac2b (Σχήμα Σ.5 EDTA elution). Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, υποθέτουμε πως η ελλειπής διαμόρφωση της Rab27a μπορεί να οφείλεται στη βακτηριακή έκφραση και καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η παραπάνω μεθοδολογία δεν μας

επιτρέπει να εξάγουμε αξιόπιστα αποτελέσματα όσον αφορά την ταυτοποίηση τελεστών της Rab27a



Σχήμα Σ.4: Προσπάθεια ταυτοποίησης τελεστών της Rab27a από εκχύλισμα ανθρώπινου πλακούντα. Οι βακτηριακά εκφρασμένες GST-Rab27a και GST-Rab5a, οι οποίες είχαν σταθεροποιηθεί με GDP, GTP ή GTPγS, επωάστηκαν με μεμβρανικό ή κυτταροπλασματικό εκχύλισμα ανθρώπινου πλακούντα. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα συγκέντρωσης 20 mM EDTA. Το έκλουσμα συμπυκνώθηκε 3 φορές και χρησιμοποιήθηκε για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-ακρυλαμιδίου, 6% και 15%, για την ανάλυση τόσο των μεγάλου όσο και των μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών. Ακολούθησε χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie και, στη συνέχεια, χρώση νιτρικού αργύρου, την οποία και παρατηρούμε στην εικόνα. Να σημειώσουμε πως στην επώαση με το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, μόνο σε μία περίπτωση η Rab27a σταθεροποιήθηκε με GDP (GDP_(ex)), ενώ στις άλλες πραγματοποιήθηκε απλώς χορήγηση του νουκλεοτιδίου.



Σχήμα Σ.5: Μελέτη της αλληλεπίδρασης της Rab27a με την SHD περιοχή της Slac2b. Οι βακτηριακά εκφρασμένες GST-Rab27a και GST-Rab5a, οι οποίες είχαν σταθεροποιηθεί με GDP ή GTPγS, επωάστηκαν με την επίσης βακτηριακά εκφρασμένη

SHD περιοχή της Slac2b. Η έκλυση έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα έκλυσης 20 mM Hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM EDTA, ενώ στο δεύτερο, το διάλυμα 100 mM Tris, pH 8,5, 5 mM β-Me, 15 mM γλουταθειόνης (reduced glutathione). Τα κλάσματα για ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-ακρυλαμίδιου, 16% και ακολούθησε χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G.

Σ.4 Στοιχίση των αλληλουχιών εκκριτικών και ενδοσωμικών Rabs

Η κοινή δράση των τριών διαφορετικών Rabs στην έκκριση των WPBs υποδηλώνει την ύπαρξη κοινών τελεστικών ή ρυθμιστικών μορίων μεταξύ των διακριτών Rabs. Με τη σειρά της, η αλληλεπίδραση με κοινά μόρια μπορεί να οφείλεται σε κάποιο βαθμό συντήρησης μεταξύ των μορίων. Για τις Rab27 και Rab3 είναι γνωστό πως αλληλεπιδρούν με κοινά τελεστικά και ρυθμιστικά μόρια, ενώ παρουσιάζουν 42% αμινοξική ομοιότητα. Στοιχίση των αλληλουχιών με τη Rab15 έδειξε πως το ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας της Rab15 με την Rab27 ήταν 31,5%, ενώ το αντίστοιχο με τη Rab3 ήταν 36,5%, ποσοστά κοντά στο μέσο όρο αμινοξικής ομοιότητας μεταξύ των μελών της οικογένειας των Rab (Πίνακας 3.2). Ανάλυση, όμως, των κρυσταλλικών δομών των Rab27 και Rab3, σε μορφή συμπλόκου με κάποιο τελεστή τους, έχει φανερώσει τη σημασία των RabSF περιοχών των Rab (βλ.Εισαγωγή 1.4.1) για τις αλληλεπιδράσεις αυτές. Συγκεκριμένα, οι RabSF I, III και IV είναι στραμμένες προς τη μία πλευρά του μορίου και συμμετέχουν στις μέχρι σήμερα γνωστές αλληλεπιδράσεις, ενώ η RabSF II είναι στραμμένη προς την αντίθετη πλευρά του μορίου και πιθανώς μεσολαβεί την πρόσδεση σε άλλους τελεστές. Οι περιοχές αυτές έχουν σημειωθεί στις στοιχισμένες αλληλουχίες του σχήματος Σ.6. Εφόσον οι περιοχές αυτές συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις των Rab27 και Rab3 με τους τελεστές τους, υπολογίσαμε το ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας μέσα σε αυτές, μεταξύ των Rab27/3/15/33/37 (που εντοπίζονται στα WPBs) καθώς και των Rab11/7/9/5/4 (Rabs ενδοσωμικών διαμερισμάτων) και Rab2 (Golgi-Rab). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Φαίνεται από αυτά, η Rab27 να παρουσιάζει τα ίδια ποσοστά αμινοξικής ομοιότητας, σε τρεις από τις τέσσερις αυτές περιοχές, με τη Rab3 και με τη Rab15. Επιπλέον, από τις Rabs που εξετάστηκαν, η Rab15 εμφανίζει υψηλά ποσοστά αμινοξικής ομοιότητας σε δύο από τις τέσσερις RabSF περιοχές με τη Rab27. Η ομοιότητα στις περιοχές αυτές θα μπορούσε να αποτελεί τη δομική βάση της ύπαρξης κοινού τελεστή μεταξύ των Rab27 και Rab15.

		190	200	210	
	$\alpha 4$	$\beta 6$		$\alpha 5$	
135	E A F A R E H G L I F M E T S A K T - - - A S N V E E A F I				Rab2a.pro
151	R Q L A D H L G F E F F E A S A K D - - - N I N V K Q T F E				Rab3a.pro
70	S - - - - - - - I I K T T R K K - - - - - - - - Y K				Rab4a.seq
149	Q S Y A D D N S L L F M E T S A K T - - - S M N V N E I F M				Rab5a.pro
141	A W C Y S K N N I P Y F E T S A K E - - - A I N V E Q A F Q				Rab7a.pro
140	A W C R D N G D Y P Y F E T S A K D - - - A T N V A A A F E				Rab9a.pro
140	R A F A E K N G L S F I E T S A L D - - - S T N V E A A F Q				Rab11a.pro
137	Q Q L A K E Y G M D F Y E T S A C T - - - N L N I K E S F T				Rab15.pro
149	I A L A E K Y G I P Y F E T S A A N - - - G T N I S Q A I E				Rab27a.pro
167	L K F A D A H N M L L F E T S A K D P K E S Q N V E S I F M				Rab33a.pro
152	E T L A R E Y G V P F L E T S A K T - - - G M N V E L A F L				Rab37.pro
		220	230	240	
	$\alpha 5$				
162	N T A K E I Y E K I Q E G V F D I N N E A N G I K I G P Q H				Rab2a.pro
178	R L V D V I C E K M S E S L D T A D P A V T G A K Q G P Q L				Rab3a.pro
103	I M K T R A K A R K T K N A				Rab4a.seq
176	A I A K K L P K N E - P Q N P G A N S A R G R G V D L T E P				Rab5a.pro
168	T I A R N A L K Q E T E V E L Y N E F P - E P I K L D K N D				Rab7a.pro
167	E A V R R V L A T E D R S D H L I Q T - - D T V N L H R - -				Rab9a.pro
167	T I L T E I Y R I V S Q K Q M S D R R E - N D - - M S P S N				Rab11a.pro
164	R L T E L V L Q A H R K E L E G L R M R A S N E L A L A E L				Rab15.pro
176	M L L D L I M K R M E R C V D K S W I P E G V V R S N G H A				Rab27a.pro
197	C L A C R L K A Q K S L L Y R D A E R Q Q G K V Q K L E F P				Rab33a.pro
179	A I A K E L K Y R A G H Q A D E P S F Q I R D Y V E S Q K K				Rab37.pro
		250	260		
192	A A T N A T H A G N Q G G Q Q A G G G C C				Rab2a.pro
208	S D Q - - - Q V P P H Q D - - - - C A C				Rab3a.pro
142					Rab4a.seq
205	T Q P T R N Q C C S N				Rab5a.pro
197	R A K A S A E S C S C				Rab7a.pro
193	K P K P S S S C C				Rab9a.pro
194	N V V - P I H V P P T T E N K P K V Q C C Q N I				Rab11a.pro
194	E E E - - - E G K P E G P A N S S K T C W C				Rab15.pro
206	S T D - - - Q L S E E K E K G A - C G C				Rab27a.pro
227	Q E A N S K T S C P C				Rab33a.pro
209	R S S - - - C S F M				Rab37.pro

Σχήμα Σ.6: Στοιχισή αλληλουχιών 11 Rab GTPασών. Η στοιχισή πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό CLUSTAL W, Στο σχήμα έχουν σημειωθεί σε έγχρωμα πλαίσια οι περιοχές RabSF I-IV και Switch I-II, στο πάνω μέρος των αλληλουχιών έχουν σημειωθεί οι β-πτυχωτές επιφάνειες και οι α-έλικες, ενώ, τέλος, στη δομή της Rab27a έχουν σημειωθεί κάποια σημαντικά κατάλοιπα για την αλληλεπίδρασή της με τον τελεστή Slac2-a.

Πίνακας 3.2: Ποσοστά αμινοξικής ομοιότητας μεταξύ των RabSF περιοχών 11 Rab GTPασών. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ποσοστά που είναι πάνω από το μέσο όρο που παρατηρείται μεταξύ των μελών της οικογένειας των Rab.

	Complete sequence (%)	RabSF I (%)	RabSFII (%)	RabSF III (%)	RabSF IV (%)
Rab family average identity	32,7	34,2	28,6	23	14,4
Rab27a-Rab3a	41,75% *	50% *	38,9% *	21,7%	30,8% *
-Rab15	31,5%	50% *	38,9% *	21,22%	7,7%
-Rab33	28,15%	16,7%	22,22%	30,4% *	-
-Rab37	38,34% *	33,33%	33,3% *	26,2%	7,7%
-Rab11	33,98% *	83,3% *	22,22%	39,1% *	7,7%
-Rab9	30,5%	33,3%	22,22%	34,7% *	7,7%
-Rab7	32,5%	33,3%	33,3% *	8,7%	7,7%
-Rab5	27,18	16,7%	16,7%	26,1%	7,7%
-Rab4	3%	-	11,1%	11,1%	7,7%
-Rab2	31%	50% *	27,8%	16,7%	7,7%
Rab3a-Rab27a		50% *	38,9% *	22,22%	30,8% *
-Rab15		33,33%	33,33% *	11,11%	7,7%
-Rab33		33,33%	22,22%	5,5%	7,7%
-Rab37		16,7%	33,33% *	22,22%	7,7%
-Rab11		66,7% *	22,22%	16,7%	15,38% *
-Rab9		33,33%	22,22%	9,1%	7,7%
-Rab7		16,7%	22,22%	9,1%	7,7%
-Rab5		33,33%	22,22%	5,6%	-
-Rab4		-	-	5,6	-
-Rab2		50% *	22,22%	22,22%	30,7% *

	Complete sequence (%)	RabSF I (%)	RabSF II (%)	RabSF III (%)	RabSF IV (%)
Rab family average identity	32,7	34,2	28,6	23	14,4
Rab15-Rab27a		50% *	38,9% *	22,22%	7,7%
-Rab3a		33,33%	33,33% *	11,11%	7,7%
-Rab33		16,7%	33,33% *	27,7%	-
-Rab37		33,33%	33,33% *	27,7%	-
-Rab11		66,7% *	50% *	11,11%	-
-Rab9		33,33%	27,7%	27,3%	15,4%
-Rab7		33,33%	16,7%	18,18%	7,7%
-Rab5		16,7	33,33% *	27,7%	7,7%
-Rab4		-	-	11,11%	7,7%
-Rab2		50% *	44,4% *	16,7%	-

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκε το πλήρες εύρος των Rab GTPασών που εντοπίζονται στη μεμβράνη των εξειδικευμένων εκκριτικών κυστιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των WPBs. Πέντε μέλη της οικογένειας αυτής και πιο συγκεκριμένα, οι Rab3, Rab15, Rab27, Rab33 και Rab37 βρέθηκαν να εντοπίζονται στη μεμβράνη των οργανιδίων αυτών. Και οι πέντε αυτές GTPάσες συνεντοπίζονται στα ίδια WPB, όπως απέδειξαν πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων HUVE, μετά από ταυτόχρονη διαμόλυνση με τις myc-Rab27a και GFP-Rab3a ή GFP-Rab15 ή GFP-Rab33a ή GFP-Rab37.

Η ύπαρξη πολλών Rabs στο ίδιο εκκριτικό κυστίδιο δε θα πρέπει να μας προκαλεί εντύπωση. Μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης άλλων εκκριτικών κυστιδίων έχουν αποκαλύψει ένα πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών Rabs στις μεμβράνες αυτών (ίσως μεγαλύτερο από τον πραγματικό – βλέπε Εισαγωγή 1.5). Αλλά και σε ενδοσωμικής φύσεως κυστίδια έχει βρεθεί να συνυπάρχουν περισσότερες της μίας Rabs (ένας υποπληθυσμός ενδοσωμάτων περιέχει τις Rab4, 5, 11 (Sonnichsen et al., 2000), ενώ επιπλέον, στα ενδοσώματα έχουν βρεθεί οι Rab7, 9, 21, 22 (Barbero et al., 2002; Simpson et al., 2004)). Η σημασία της ύπαρξης διαφορετικών Rabs στο ίδιο οργανίδιο έχει αποδοθεί στο ότι αυτές είναι υπεύθυνες για διαφορετικές λειτουργίες των οργανιδίων. Μάλιστα, σε κάποιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι οι διαφορετικές Rabs συγκροτούν διαφορετικές υπό-περιοχές στη μεμβράνη του οργανιδίου. Οι διαφορετικές αυτές υπό-περιοχές παρουσιάζουν διαφορετική λειτουργία και διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω αλληλεπιδράσεων με επιπλέον μόρια της μεμβράνης, ενώ ενορχήστρωση των δράσεών τους έχει επίσης περιγραφεί και αποδίδεται στην ύπαρξη κοινών τελεστών των διακριτών Rabs. Στην περίπτωση των WPBs, οι πέντε Rabs, που ταυτοποιήθηκαν, θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για διακριτές λειτουργίες κατά τη διαδικασία ωρίμανσης, μεταφοράς των WPBs στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και σύντηξης με αυτή. Η χώρο-χρονική οργάνωση των διαφορετικών αυτών λειτουργιών θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω των κοινών τελεστών και ρυθμιστών (GEFs, GAPs) που μοιράζονται οι Rab3 και Rab27 (Figueiredo et al., 2008), καθώς επίσης και μέσω της Munc13-4 (κοινός τελεστής των Rab27 και Rab15, όπως απέδειξε η παρούσα μελέτη).

Υπάρχει, λοιπόν, κάποια συγκεκριμένη ομάδα Rab, που να εξυπηρετεί αυτή τη χώρο-χρονική οργάνωση και, επομένως, τα μέλη της να συνεντοπίζονται σταθερά σε όλα τα

εκκριτικά οργανίδια; Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, σε συνδυασμό με την εύρεση των Rab27-3-33-37 στα πυκνά κοκκία των νευροενδοκρινών PC12 κυττάρων (Tsuboi and Fukuda, 2006), των Rab27-33-37 στα λυτικά κοκκία των κυττάρων φυσικών φονέων (Casey et al., 2007) και των Rab27-3-37 στα κοκκία ινσουλίνης των παγκρεατικών κυττάρων (Brunner et al., 2007), συνηγορούν προς την κατεύθυνση ύπαρξης μιας τέτοιας βασικής ρυθμιστικής μηχανής των εκκριτικών κυστιδίων. Είναι σαφής, βέβαια η ανάγκη περισσότερων συστηματικών μελετών, καθώς επίσης και η επιβεβαίωση των ευρημάτων των πρωτεομικών αναλύσεων κυστιδίων, προκειμένου αυτό να μπορεί να υποστηριχθεί με βεβαιότητα. Από την άλλη μεριά, ο εντοπισμός της Rab15 στα WPBs (πρώτη φορά δείχνεται να εντοπίζεται σε εκκριτικά κυστίδια) και η μη εύρεση σε αυτά, άλλων Rabs, χαρακτηριστικών άλλων εκκριτικών οργανιδίων, δείχνει ότι, εκτός από τις βασικές εκκριτικές Rabs, υπάρχει και ένας αριθμός αυτών που εντοπίζονται αποκλειστικά σε συγκεκριμένα κυστίδια, εξυπηρετώντας τις εξειδικευμένες ανάγκες του εκάστοτε συστήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Rab4 των αιμοπεταλίων, που εντοπίζεται στη μεμβράνη των α-κοκκίων (κοκκία που φέρουν τον vWF των αιμοπεταλίων) και ρυθμίζει την έκκρισή τους (Shirakawa et al., 2000), ενώ η ίδια Rab δεν εντοπίζεται στα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων (παρούσα μελέτη).

Θα χρειαστούν, βεβαίως, αρκετές ανάλογες μελέτες πριν διαπιστωθεί αν η Rab15 αποτελεί μία ειδική Rab των WPBs ή αν εντοπίζεται και σε εκκριτικά οργανίδια άλλων κυττάρων. Ο εντοπισμός της στα οργανίδια αυτά πιθανόν αποτελεί αποτέλεσμα σύντηξης ενδοσωμάτων ανακύκλωσης με τα WPBs, καθώς η Rab15 εντοπίζεται επίσης και σε ένα ενδοσωμικής φύσεως διαμέρισμα. Ένα τέτοιο σενάριο θα μπορούσε να εξυπηρετεί τη μετατόπιση της CD63, ενός φορτίου των WPBs, από τα ενδοσώματα στα WPBs, καθώς έχει βρεθεί πως το φορτίο αυτό, μετά τη μεταφορά του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (ως αποτέλεσμα της έκκρισης των WPBs), ανακυκλώνεται, μέσω ενδοσωμικών διαμερισμάτων, ξανά στα WPBs (Arribas and Cutler, 2000). Οι επαφές που παρατηρήσαμε μεταξύ των WPBs και των Rab4- και Rab11-θετικών ενδοσωμάτων ενισχύουν την υπόθεση αυτή.

Από τις πέντε Rabs που εντοπίστηκαν στα WPBs, οι Rab-27, -3 και -15 ρυθμίζουν θετικά την έκκρισή τους. Ο ρόλος της Rab27, σε άλλα συστήματα, είναι άλλοτε θετικός και άλλοτε αρνητικός στην έκκριση. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί, μεταξύ άλλων, να ρυθμίζει θετικά την έκκριση ινσουλίνης (Yi et al., 2002) και γλυκογόνου από παγκρεατικά β και α κύτταρα αντίστοιχα, την έκκριση των λυτικών κοκκίων των κυτταροτοξικών T

λεμφοκυττάρων (Stinchcombe et al., 2001), την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από τα AtT20 κύτταρα (Zhao et al., 2002), την έκκριση των ζυμογόνων κοκκίων των παγκρεατικών βοτρυοειδών κυττάρων (Chen et al., 2004) και των πυκνών κοκκίων των αιμοπεταλίων (Shirakawa et al., 2004). Αντίθετα, υπερέκφρασή της οδήγησε σε μειωμένη έκκριση των πυκνών κοκκίων των PC12 κυττάρων (Desnos et al., 2003), αν και άλλες αναφορές εμφανίζουν ένα θετικό ρόλο της Rab27a και σε αυτό το σύστημα (Tsuboi and Fukuda, 2006). Τα πράγματα είναι περισσότερο ξεκάθαρα σε επίπεδο knockout ποντικών, τα οποία εμφανίζουν τόσο μειωμένη μεταφορά των κυστιδίων σε περιφερειακές θέσεις (Gomi et al., 2007), όσο και μειωμένη έκκρισή τους.

Τα αποτελέσματά μας, λοιπόν, συμφωνούν με την κυρίαρχη άποψη για το ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη διαδικασία της έκκρισης. Έρχονται, όμως, σε αντίθεση με πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, η οποία έδειξε ότι η Rab27a είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκκρισης των WPBs. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε, όπως και στη δική μας, η μεθοδολογία αποσιώπησης με siRNAs (Nightingale et al., 2009).

Η προφανής αυτή ασυμφωνία πιθανώς να οφείλεται στα σχετικά ποσά ώριμων και ανώριμων WPBs τη στιγμή της ενεργοποίησης, καθώς οι Nightingale et al. πραγματοποίησαν τα πειράματά τους σε κύτταρα που δεν βρίσκονταν σε κατάσταση συρροής, λόγω αυξημένου κυτταρικού θανάτου, ως αποτέλεσμα της μεθοδολογίας διαμόλυνσης που ακολούθησαν. Η υπόθεση της διακριτής δράσης της Rab27a, στα ώριμα σε σχέση με τα ανώριμα WPBs, θα μπορούσε να ενισχυθεί από τα αποτελέσματα της μελέτης των D. Liu et al (2010) στα λυτικά κοκκία των κυττάρων φυσικών φονέων, σύμφωνα με τα οποία η Rab27a είναι απαραίτητη για τη μετακίνηση των κοκκίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά περιορίζει την κίνησή τους στο κυτταρόπλασμα (Liu et al.). Η ωρίμανση ενός οργανιδίου και η μετακίνησή του στην περιφέρεια του κυττάρου είναι έννοιες που έχουν προηγουμένως σχετιστεί. Πρέπει, βέβαια, να αναφέρουμε στο σημείο αυτό, πως πραγματοποιήσαμε πειράματα αποσιώπησης της Rab27a σε κύτταρα HUVE σε κατάσταση διασποράς. Παρατηρήσαμε μικρότερη επίδραση στην έκκριση των WPBs, σε σχέση με κύτταρα σε κατάσταση συρροής, αλλά και πάλι δεν είδαμε ανασταλτικό ρόλο για τη Rab27a. Χωρίς να μπορούμε να έχουμε τις ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης των πειραμάτων των Nightingale et al., αναφέρουμε πως στα χέρια μας η τεχνολογία AMAXA, τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε από τους συγγραφείς της αναφοράς, προκαλούσε 50% κυτταρικό θάνατο και σημαντικά μειωμένη έκκριση των WPBs.

Στην παρούσα μελέτη, ο θετικός ρυθμιστικός ρόλος της Rab27a στην έκκριση των WPBs, αποδείχτηκε τόσο με πειράματα υπερέκφρασης όσο και αποσιώπησης, ενώ η εύρεση της Munc13-4, ενός γνωστού τελεστή της Rab27a (Shirakawa et al., 2004), ως θετικού ρυθμιστή της έκκρισης των WPBs, επιβεβαιώνει περαιτέρω το θετικό ρόλο της Rab27a και, επιπλέον, παρέχει μέρος της μηχανιστικής βάσης αυτής της θετικής ρύθμισης. Περαιτέρω μελέτη της αιμορραγικής διάθεσης σε ασθενείς με Griscelli syndrome ή σε ashen ποντίκια (αντίστοιχο του Griscelli syndrome μοντέλο σε ποντίκια) θα προσφέρει σημαντικά στη διαλεύκανση του ρόλου της Rab27a στην έκκριση των WPBs.

Η Rab27b, από την άλλη πλευρά, δε φάνηκε να επηρεάζει την εκκριτική διαδικασία. Αν και το μετάγραφο της ανιχνεύτηκε σε ολικό mRNA HUVEC, η επίδραση της αποσιώπησης της δεν κρίθηκε σημαντική για την έκκριση των WPBs, ενώ και η ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27b και Rab27a δε φάνηκε να μειώνει την έκκριση περισσότερο, από όσο η αποσιώπηση της Rab27a από μόνη της, αποτελέσματα που αποδίδονται είτε στη μικρή έκφραση της Rab27b στα κύτταρα HUVE, είτε στη μη απόλυτη ειδικότητα των siRNAs της Rab27a, τα οποία αποσιωπούν εν μέρει και τη Rab27b.

Η εύρεση πως δύο μέλη της υποοικογένειας των Rab3 πρωτεϊνών (Rab3A και Rab3D) ρυθμίζουν την έκκριση των WPBs, δεν ήταν αναπάντεχη, καθώς είναι ευρέως αποδεκτή η άποψη πως τα μέλη της υποοικογένειας αυτής παίζουν σημαντικό ρόλο στα τελικά στάδια του μονοπατιού της έκκρισης, σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η εύρεσή τους ως θετικούς ρυθμιστές της έκκρισης των WPBs, έρχεται σε συμφωνία με ανάλογους θετικούς ρόλους που έχει βρεθεί να διαδραματίζουν, τα παράλογα αυτά, στη βασική απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (ακετυλοχολίνης) στις νευρομυϊκές συνάψεις (Schluter et al., 2002), στην έκκριση των μελανοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης (Rupnik et al., 2007) και των PC12 κυττάρων (Tsuboi and Fukuda, 2006).

Από την άλλη μεριά, όμως, υπάρχει ένας επίσης μεγάλος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών, που παρουσιάζουν έναν αρνητικό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών στην εκκριτική διαδικασία (Schluter et al., 2002) (Johannes et al., 1994) (Regazzi et al., 1996). Για την ακρίβεια, για ελάχιστες πρωτεΐνες έχουν αποδοθεί τόσο αντικρουόμενοι ρόλοι, όσο για τη Rab3. Τα τόσα αντικρουόμενα αποτελέσματα, ακόμα και στις ίδιες κυτταρικές σειρές, αποδίδονται στο γεγονός, ότι, συνήθως, περισσότερες της μιας ισομορφές της Rab3 (οι οποίες να σημειωθεί πως παρουσιάζουν 77-85% ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο και έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τα ίδια μόρια-τελεστές) εκφράζονται στους

ίδιους κυτταρικούς τύπους, με αποτέλεσμα να επεμβαίνουν στις διάφορες εξωγενείς παρεμβάσεις, επηρεάζοντας τα τελικά συμπεράσματα. Στην περίπτωση της υπερέκφρασης, η είσοδος μιας ετερόλογης πρωτεΐνης ανταγωνίζεται όλες τις ενδογενείς (Rab3A, Rab3B, Rab3C και Rab3D, ανάλογα με το ποια ή ποιες εκφράζονται στο εκάστοτε σύστημα) για τους ίδιους τελεστές. Εξάλλου, στην περίπτωση της μελέτης μιας λεπτά ρυθμιζόμενης διαδικασίας, όπως η έκκριση, όπου η κάθε Rab, με διακριτό και διαδοχικό τρόπο, θα αλληλεπιδράσει με μία αλληλουχία τελεστών, προκειμένου να μεσολαβήσει τη δράση της, ο κορεσμός αυτής της μηχανής (τόσο των ρυθμιστών, όσο και των τελεστών της Rab), ίσως δεν αποτελεί την καλύτερη μεθοδολογία και, μάλλον, θα πρέπει να αποτελεί συνοδευτικό εργαλείο. Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση της απαλοιφής ενός παραλόγου, τα υπόλοιπα παράλογα είναι δυνατό, αλληλεπιδρώντας με κοινούς τελεστές, να καλύψουν την απώλειά του.

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, μελέτες σε knockout ποντίκια έδειξαν ότι η ταυτόχρονη απαλοιφή τριών, από τα τέσσερα, παραλόγων της Rab3, οδήγησε σε 30% μειωμένη πιθανότητα επαγόμενης απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή στη νευρομυϊκή σύναψη (Schluter et al., 2004), ενώ οι μονές απαλοιφές δεν είχαν σημαντική επίδραση στη διαδικασία αυτή. Τέλος, σε επίπεδο ενός πιο απλού οργανισμού, όπως ο *C.elegans*, όπου υπάρχει ένα μόνο Rab3 γονίδιο, η απαλοιφή του υπέδειξε ένα θετικό ρυθμιστικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στον εκκριτικό μηχανισμό.

Ο αρνητικός ρόλος που είχε προηγουμένως αποδοθεί στη Rab3D, ως ρυθμιστή της έκκρισης των WPBs (Knop et al., 2004) και, επομένως, η ασυμφωνία με την παρούσα μελέτη, πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στις δύο περιπτώσεις. Είναι πιθανό, δηλαδή, η υπερέκφραση της Rab3 να προκαλεί κορεσμό της εκκριτικής μηχανής ή, εναλλακτικά, η Rab3 να απαιτεί τον κύκλο του νουκλεοτιδίου για τη φυσιολογική της δράση και επομένως, η υπερέκφραση της διαρκώς ενεργούς μορφής της να την εκτρέπει από αυτόν. Για την πρωτεΐνη αυτή, είναι γνωστό πως εναλλάσσεται διαρκώς μεταξύ κυτταροπλάσματος και μεμβράνης (Handley et al., 2007).

Τα πειράματα ταυτόχρονης αποσιώπησης των Rab3A και Rab3D έδειξαν πως, σε ενδογενείς ποσότητες, η μία δεν αναπληρώνει τη δράση της άλλης. Διακριτοί ρόλοι μεταξύ των ισομορφών της Rab3 έχουν προηγουμένως αναφερθεί. Οι Rab3A και Rab3B έχουν διακριτούς ρόλους σε μελανοτρόφα κύτταρα αρουραίου, όπου, ενώ η Rab3A ρυθμίζει θετικά την έκκριση, η Rab3B δεν την επηρεάζει (Rupnik et al., 2007), ενώ για τη Rab3D έχει, επιπρόσθετα, προταθεί ρόλος στη διατήρηση του φυσιολογικού μεγέθους των

εκκριτικών κυστιδίων (Riedel et al., 2002). Εναλλακτικά, είναι πιθανό, στο πείραμα της ταυτόχρονης αποσιώπησης των Rab3A και Rab3D, να αναλαμβάνουν μέρος της δράσης των αποσιωπηθέντων πρωτεϊνών οι άλλες δύο ισομορφές της Rab3.

Επιπλέον, οι Rab27 και Rab3 φαίνεται να δρουν στο ίδιο μονοπάτι ρύθμισης της έκκρισης των WPBs και μάλιστα διαδοχικά, αφού όποια από τις δύο κι αν αποσιωπηθεί το μονοπάτι αυτό τερματίζεται. Το μονοπάτι αυτό ελέγχει το 50% της έκκρισης των WPBs. Εφεδρεία στη δράση μεταξύ των δύο αυτών Rab, στις ενδογενείς τους ποσότητες, δεν παρατηρήθηκε. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ούτε ένα μικρό ποσοστό συνεργασίας, όπως είχε προηγούμενα παρατηρηθεί στα πυκνά κοκκία των PC12 κυττάρων (Tsuboi and Fukuda, 2006). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στις σχετικές ποσότητες των κοινών τελεστών μεταξύ κυττάρων HUVE και PC12 κυττάρων.

Το πιο απρόσμενο αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας ήταν η ανακάλυψη ότι η Rab15, μία Rab που μέχρι σήμερα έχει χαρακτηριστεί ως αποκλειστικά ενδοσωμική, όχι μόνο εντοπίζεται σε εκκριτικά κυστίδια, αλλά, επιπρόσθετα, ρυθμίζει θετικά την έκκρισή τους. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η Rab15 εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, όπου συνεντοπίζεται με τις Rab4 και Rab5, αλλά και στα Rab11-θετικά περικεντρικά ενδοσώματα ανακύκλωσης (Zuk and Elferink, 1999). Υπερέκφρασή της οδηγεί σε μείωση της ενδοκυττάρωσης, της διαμεσολαβούμενης από υποδοχείς, μείωση του ρυθμού ανακύκλωσης της 125 I-Tfn (ραδιενεργώς σημασμένη τρανσφερίνη), δεν επηρεάζει την έξοδο του φορτίου από τα πρώιμα ενδοσώματα, ενώ, μάλλον, εμποδίζει τη σύντηξη μεταξύ των πρώιμων ενδοσωμάτων *in vitro* (Zuk and Elferink, 2000).

Η αλληλεπίδραση της Rab15 με τη Munc13-4, μία τελεστική πρωτεΐνη της έκκρισης, περιγράφεται, επίσης, για πρώτη φορά. Αξίζει να σημειωθεί πως η Munc13-4 περιλαμβάνει εκτεταμένη coiled coil δομή που χαρακτηρίζει την αλληλουχία μεταξύ των C2 περιοχών της (Feldmann et al., 2003). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί αρκετοί τελεστές που αλληλεπιδρούν με περισσότερες της μιας Rabs (Fukuda et al., 2008). Από τα χαρακτηριστικότερα παραδείγματα είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται αποκλειστικά στη συσκευή Golgi. Πρόκειται για τις golgins, πρωτεΐνες με κύριο δομικό χαρακτηριστικό την εκτεταμένη coiled coil δομή τους. Συγκεκριμένα η golgin GCC185 (ή GCC2) έχει βρεθεί να έχει θέσεις πρόσδεσης για οχτώ διαφορετικές Rab GTPάσες (Rab1, Rab2, Rab6, Rab9, Rab15, Rab27b, Rab30, Rab33b) (Hayes et al., 2009). Η αλληλεπίδραση αυτή, πιθανώς, ερμηνεύει την αθροιστική δράση που παρουσιάζουν οι Rab15 και Rab27 στην έκκριση των WPBs.

Η Munc13-4 εκφράζεται, κυρίως σε κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς (Neeft et al., 2005) και μετάλλαξη της είναι υπεύθυνη για το σύνδρομο FLH-3 (familial hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome subtype 3), που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική έκκριση των λυτικών κοκκίων των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTLs) (Yamamoto et al., 2004). Έχει, μάλιστα, δειχθεί πως η πρωτεΐνη αυτή δρα σε ένα στάδιο καθοδικά του ελλιμενισμού των κυτταροτοξικών κοκκίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν εξακριβώσει το θετικό ρυθμιστικό της ρόλο στην έκκριση των πυκνών κοκκίων των αιμοπεταλίων (Shirakawa et al., 2004), των κυστιδίων των ιστιοκυττάρων (Neeft et al., 2005) και ουδετερόφιλων (Pivot-Pajot et al., 2008), των λυτικών κοκκίων των CTLs (Yamamoto et al., 2004) και των κυττάρων φυσικών φονέων (NK- natural killer cells) (Wood et al., 2009). Τα αποτελέσματά μας έρχονται να προσθέσουν και τα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων στην παραπάνω λίστα των κυστιδίων. Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου διαμεσολαβεί τη θετική της δράση στην έκκριση των WPBs χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Από μελέτες σε άλλα εκκριτικά οργανίδια γνωρίζουμε πως αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Pivot-Pajot et al., 2008), ενώ η ισομορφή Munc13-1 μεσολαβεί στην αποσύνδεση της Munc18-1 από τη syntaxin 1, επιτρέποντας, έτσι, το σχηματισμό του trans-SNARE συμπλέγματος (Betz et al., 1997).

Τέλος, οι πρωτεΐνες Rab33 και Rab37 δε φάνηκε να επηρεάζουν την έκκριση των WPBs. Αναφορικά με την πρώτη, είναι γνωστό πως η Rab33 είναι μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται στη συσκευή Golgi και ρυθμίζει τη μετακίνηση κυστιδίων από αυτό το διαμέρισμα προς το ενδοπλασματικό δίκτυο (Zheng et al., 1998). Ο εντοπισμός της στη μεμβράνη των WPBs παρατηρείται για πρώτη φορά, ενώ υπάρχει μία ακόμη αναφορά εντοπισμού της σε εκκριτικά κυστίδια, στα πυκνά κοκκία των PC12 κυττάρων (Tsuboi and Fukuda, 2006). Και στις δύο περιπτώσεις, όμως, δεν κατέστη δυνατό να παρουσιαστεί κάποιος ρόλος αυτού του εντοπισμού στην επαγόμενη έκκριση των κυστιδίων αυτών. Είναι, λοιπόν, πιθανό να πρόκειται για υπολείμματα ανώριμων κυστιδίων που έχουν προκύψει από το TGN, χωρίς λειτουργική σημασία.

Η Rab37, από την άλλη μεριά, φάνηκε να εντοπίζεται αποκλειστικά στα WPBs. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως η Rab37 εκφράζεται αποκλειστικά στα ιστιοκύτταρα, και πιο ειδικά, στη μεμβράνη των εκκριτικών τους κοκκίων (Masuda et al., 2000). Μετέπειτα μελέτες την εντόπισαν σε εκκριτικά κυστίδια ινσουλίνης (Brunner et al., 2007) και σε εκκριτικά λυσοσώματα κυττάρων φυσικών φονέων (Casey et al., 2007). Μέχρι

σήμερα, όμως, όπως και στην περίπτωση των WPBs, δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος αυτού του εντοπισμού. Πιθανώς, λοιπόν, να επηρεάζει άλλη λειτουργία των WPBs, πέραν της έκκρισης.

Συνοπτικά, λοιπόν, στην παρούσα εργασία παρατηρήσαμε πως πέντε διαφορετικές Rabs εντοπίζονται στη μεμβράνη των WPBs, τρεις από τις οποίες ρυθμίζουν την έκκριση των οργανιδίων αυτών. Είναι, πλέον, σαφές πως η ρύθμιση της έκκρισης των WPBs δεν είναι υπόθεση μιας πρωτεΐνης, και μάλλον δε θα μπορούσε να είναι. Αντίθετα, είναι αποτέλεσμα ενός μηχανισμού σύνθετης ρύθμισης που παρέχεται από διαφορετικές Rabs. Η αναπλήρωση μέρους της δράσης της Rab27 από τη Rab15 πιθανώς αποτελεί μηχανισμό εφεδρείας του κυττάρου. Δεν αποκλείεται δε, η δυσκολία ανίχνευσης αιμορραγικής διάθεσης σε ασθενείς με Griscelli syndrome ή σε ashpen ποντίκια να οφείλεται στη δράση της Rab15.

Περίληψη

Τα WPBs είναι εξειδικευμένα εκκριτικά οργανίδια, αποκλειστικά των ενδοθηλιακών κυττάρων. Περιέχουν ένα πλήθος μορίων-φορτίων, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του αγγειακού τόνου, τη θρόμβωση, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση. Το κυρίαρχο φορτίο τους, ο παράγοντας von Willebrand (vWF), είναι μία πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση και πήξη του αίματος, ενώ, αποτελεί και το υπεύθυνο μόριο για τη βιογένεση των WPBs. Τα WPBs σχηματίζονται στο δίκτυο trans-Golgi (TGN), υφίστανται μία διαδικασία ωρίμανσης, κατά την οποία μεταφέρονται στην περιφέρεια του κυττάρου και, κατόπιν ερεθίσματος, συντήκονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και ελευθερώνουν τα φορτία τους στην κυκλοφορία. Υπεύθυνα μόρια για τη σύντηξη των κυστιδίων και της μεμβράνης στόχου είναι τα μέλη της οικογένειας των Rabs και SNAREs. Ενώ οι SNAREs φαίνεται να συμμετέχουν μόνο στο τελικό στάδιο σύντηξης των μεμβρανών, οι Rabs έχουν πιο σύνθετο ρόλο ελέγχοντας όχι μόνο τη δράση των SNAREs, αλλά και προηγούμενα στάδια, όπως τη δημιουργία του κυστιδίου, τη μετακίνησή του και τον ελλιμενισμό του με τη μεμβράνη-στόχο. Οι δράσεις αυτές των Rabs επιτελούνται μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες-τελεστές. Μέχρι σήμερα, δύο μέλη της οικογένειας των Rabs, οι Rab27a και Rab3d, έχουν βρεθεί να εντοπίζονται στη μεμβράνη των WPBs. Και οι δύο αυτές Rabs αναστέλλουν την έκκριση των WPBs.

Προκειμένου να κατανοήσουμε το μοριακό μηχανισμό, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η έκκριση, πραγματοποιήσαμε μεθοδολογία σάρωσης όλων των Rab GTPασών του ανθρώπινου γονιδιώματος, Rab1 έως Rab43. Στη σάρωση αυτή, υπερεκφράσαμε σε κύτταρα HUVE τις Rab GTPάσες συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και ελέγξαμε τον εντοπισμό τους. Πέντε μέλη της οικογένειας των Rabs ανιχνεύτηκαν στα WPBs. Πρόκειται για τις Rab27, Rab3, Rab15, Rab33 και Rab37. Οι πέντε αυτές Rabs, κατά κανόνα, συνεντοπίζονται στα ίδια οργανίδια. Η ενδογενής έκφραση αυτών των Rab επιβεβαιώθηκε με RT-PCR.

Για να μελετήσουμε το ρόλο τους στην έκκριση των WPBs, αποσιωπήσαμε με εξειδικευμένα siRNA ολιγονουκλεοτίδια μία προς μία τις πρωτεΐνες αυτές και μετρήσαμε την επίπτωση στην επαγόμενη έκκριση του vWF. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι οι Rab27a, Rab3a, Rab3d και Rab15 είναι απαραίτητες για την έκκριση των WPBs, ενώ οι Rab27b, Rab3b, Rab33a, Rab33b και Rab37 δε φάνηκε να την επηρεάζουν σημαντικά. Προκειμένου να μελετήσουμε τη συσχέτιση των δράσεων των Rab27, Rab3, και Rab15 στη φυσιολογική έκκριση των WPBs, αποσιωπήσαμε, σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς, τις τρεις αυτές πρωτεΐνες. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως οι Rab27 και Rab3 δρουν στο ίδιο μονοπάτι ρύθμισης της έκκρισης των WPBs και μάλιστα διαδοχικά, καθώς η ταυτόχρονη αποσιώπησή τους έδινε το ίδιο περίπου ποσοστό μείωσης της

έκκρισης με τη μονή αποσιώπηση είτε της Rab27 είτε της Rab3. Αντίθετα, η ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27a και Rab15 μείωσε σημαντικά περισσότερο την απελευθέρωση του vWF σε σχέση με την αποσιώπηση κάθε μιας εκ των δύο αυτών πρωτεϊνών από μόνη της.

Προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό, μέσω του οποίου η Rab27a ρυθμίζει την έκκριση των WPBs, πραγματοποιήσαμε σάρωση διπλού υβριδίου σε κύτταρα ζύμης, χρησιμοποιώντας ως δόλωμα τη Rab27aQ78L, μόνιμα ενεργοποιημένη μορφή της Rab27a, και ως θήραμα τα cDNA της βιβλιοθήκης από ανθρώπινο πλακούντα. Η μόνη αξιόπιστη αλληλεπίδραση που προέκυψε ήταν με τη Munc13-4, ένα γνωστό, από άλλα συστήματα, τελεστή της Rab27a. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης, ανοσοφθορισμού και αποσιώπησης απέδειξαν πως η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα κύτταρα HUVE, εντοπίζεται στα WPBs και είναι απαραίτητη για την έκκρισή τους, αποτελώντας, έτσι, έναν τουλάχιστον από τους τελεστές που μεσολαβούν τη θετική ρυθμιστική δράση της Rab27a στην έκκριση των WPBs. Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη τη διακριτή δομή της Munc13-4 από αυτή των υπόλοιπων γνωστών τελεστών της Rab27a, καθώς επίσης και το γεγονός πως η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το μοναδικό από τους τελεστές της Rab27a που έχει δείχτει να εντοπίζεται και σε διαμερίσματα στα οποία δεν βρίσκεται η Rab27a, ελέγξαμε αν η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά, επίσης, με τη Rab15, παρέχοντας, έτσι, τη μηχανιστική βάση της αθροιστικής επίδρασης που έχει η ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27 και Rab15 στην έκκριση των WPBs. Πειράματα ανοσοκαταβύθισης έδειξαν πως η Munc13-4 αλληλεπιδρά με τη Rab15, ενώ δεν αλληλεπιδρά με καμία από τις υπόλοιπες τρεις Rabs των WPBs. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, Munc13-4 και Rab15, στα κύτταρα HUVE, συνεντοπίζονται σε οργανίδια που φέρουν το χαρακτηριστικό σχήμα των WPBs.

Συμπερασματικά, λοιπόν, από τις πέντε Rabs που βρήκαμε να εντοπίζονται στα WPBs (Rab27, Rab3, Rab15, Rab33 και Rab37), τρεις είναι υπεύθυνες για την έκκριση των οργανιδίων αυτών. Πρόκειται για τις Rab27, Rab3 και Rab15, εκ των οποίων οι δύο πρώτες φαίνεται να ρυθμίζουν το ίδιο μονοπάτι και μάλιστα διαδοχικά, ενώ οι Rab27 και Rab15 παρουσιάζουν αθροιστική δράση στη ρύθμιση της έκκρισης. Η εύρεση της Munc13-4 ως ρυθμιστή της έκκρισης των WPBs και, επιπλέον, ως κοινό αλληλεπιδρών μόριο των Rab27 και Rab15 παρέχει, πιθανόν, τη μηχανιστική βάση της αθροιστικής επίδρασης που έχει η ταυτόχρονη αποσιώπηση των Rab27 και Rab15 στην έκκριση των WPBs

Summary

WPBs are endothelial cell - specific secretory organelles. They carry a variety of bioactive molecules with important roles in the maintenance of vascular tone, in thrombosis, inflammation and angiogenesis. The main constituent protein of WPBs is a multimeric glycoprotein called von Willebrand Factor (vWF), with important roles in thrombosis and haemostasis. This factor is also responsible for the formation itself of WPBs. WPBs are formed at the trans-Golgi network (TGN), undergo a maturation process during which they are transported to the cell periphery and upon stimulation they fuse with the plasma membrane, releasing their contents to the blood stream. Members of the Rab and SNARE families of proteins are the responsible molecules for the transport and fusion of granules with their target-membrane. While SNAREs participate only in the final fusion reaction, Rabs possess a more complex role, controlling granule biogenesis, their transport and docking to the plasma membrane, as well as the fusion reaction. Rabs mediate their functions through interactions with effector molecules. So far, two members of this family, Rab27a και Rab3d, are known to localize on WPB membrane. They are both known to inhibit WPB secretion.

In order to study the molecular mechanism through which WPB secretion is achieved, we aimed first to find the whole spectrum of Rabs which localize on these organelles. We performed, thus, a screening of all known Rabs, Rab1 to 43, each one GFP tagged, in HUVEC, and found five members of this family decorating WPB membrane. These were Rab27, Rab3, Rab15, Rab33 and Rab37. These five Rabs, mainly, colocalize on the same WPBs. The endogenous expression of them and their isoforms was studied and verified by RT-PCR experiments.

To study their role in vWF secretion we followed a knocking down approach and we showed that Rab27a, Rab3a, Rab3d and Rab15 are necessary for vWF regulated secretion, while Rab27b, Rab3b, Rab33a, Rab33b and Rab37 are not. Finally, in order to study if Rab27, Rab3 and Rab15 cooperate in the secretory process of WPB release, we knocked them down simultaneously, in all possible combinations. We concluded that Rab27 and Rab3 act in a linear manner in the regulatory pathway of WPB secretion, since their simultaneous knockdown had the same result in WPB secretion as the single knock down of each one of them. On the other hand, simultaneous knockdown of Rab27 and Rab15 resulted in a much more significant reduction of WPB secretion than did the knocking down of each one of these proteins alone.

In order to study the mechanism through which Rab27 mediates its function on WPB secretion, we performed a yeast-two hybrid screening in collaboration with Dualsystems. By using hRab27aQ78L as a bait and a cDNA library of human placenta as a prey, we identified Munc13-4

as the most reliable interactor. Munc13-4 is a known Rab27a-effector. Immunoblotting, immunofluorescence and knocking down experiments showed that Munc13-4 is expressed in HUVEC, localizes on WPBs and is necessary for their regulated secretion. It seems, thus, that Munc13-4 is at least one of the effectors through which Rab27a mediates its positive role on WPB secretion. Munc13-4 has a distinct structure than the rest of Rab27a effectors. In addition, it is the only of the Rab27a effectors which has been shown to localize as well in membranes devoid of Rab27a. We tested, thus, whether Munc13-4 interacts with Rab15, providing the mechanism of the additive function of Rab27a and Rab15 on WPB secretion. Immunoprecipitation experiments showed that indeed Munc13-4 interacts as well with Rab15, while no interaction was observed with Rab3a, Rab33a, and Rab37. Rab15 and Munc13-4 colocalize on WPB-like structures in HUVEC.

Βιβλιογραφία

- Ali, B.R. and Seabra, M.C. (2005) Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem Soc Trans*, **33**, 652-656.
- Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. and Seabra, M.C. (2004) Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci*, **117**, 6401-6412.
- Arribas, M. and Cutler, D.F. (2000) Weibel-Palade body membrane proteins exhibit differential trafficking after exocytosis in endothelial cells. *Traffic*, **1**, 783-793.
- Arvan, P. and Castle, D. (1998) Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J*, **332** (Pt 3), 593-610.
- Babich, V., Meli, A., Knipe, L., Dempster, J.E., Skehel, P., Hannah, M.J. and Carter, T. (2008) Selective release of molecules from Weibel-Palade bodies during a lingering kiss. *Blood*, **111**, 5282-5290.
- Barbero, P., Bittova, L. and Pfeffer, S.R. (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol*, **156**, 511-518.
- Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F. and Brose, N. (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem*, **272**, 2520-2526.
- Blagoveshchenskaya, A.D., Hannah, M.J., Allen, S. and Cutler, D.F. (2002) Selective and signal-dependent recruitment of membrane proteins to secretory granules formed by heterologously expressed von Willebrand factor. *Mol Biol Cell*, **13**, 1582-1593.
- Blazquez, M. and Shennan, K.I. (2000) Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem Cell Biol*, **78**, 181-191.
- Blott, E.J. and Griffiths, G.M. (2002) Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 122-131.
- Brunner, Y., Coute, Y., Iezzi, M., Foti, M., Fukuda, M., Hochstrasser, D.F., Wollheim, C.B. and Sanchez, J.C. (2007) Proteomics analysis of insulin secretory granules. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1007-1017.
- Brzezinska, A.A., Johnson, J.L., Munafo, D.B., Crozat, K., Beutler, B., Kiosses, W.B., Ellis, B.A. and Catz, S.D. (2008) The Rab27a effectors JFC1/Slp1 and Munc13-4 regulate exocytosis of neutrophil granules. *Traffic*, **9**, 2151-2164.
- Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C.B., Simons, K. and Zerial, M. (1995) Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett*, **366**, 65-71.
- Bunte, M.C., Patnaik, M.M., Pritzker, M.R. and Burns, L.J. (2008) Pulmonary veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation: a rare model of endothelial dysfunction. *Bone Marrow Transplant*, **41**, 677-686.
- Cambien, B. and Wagner, D.D. (2004) A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med*, **10**, 179-186.
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. and Pfeffer, S.R. (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science*, **292**, 1373-1376.
- Casey, T.M., Meade, J.L. and Hewitt, E.W. (2007) Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 767-780.

- Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. and Zerial, M. (1991) Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature*, **353**, 769-772.
- Chen, X., Li, C., Izumi, T., Ernst, S.A., Andrews, P.C. and Williams, J.A. (2004) Rab27b localizes to zymogen granules and regulates pancreatic acinar exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 1157-1162.
- Christoforidis, S. and Zerial, M. (2000) Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods*, **20**, 403-410.
- Chung, S.H., Song, W.J., Kim, K., Bednarski, J.J., Chen, J., Prestwich, G.D. and Holz, R.W. (1998) The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *J Biol Chem*, **273**, 10240-10248.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M. and Stern, D.M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, **91**, 3527-3561.
- Colicelli, J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, **2004**, RE13.
- De Meyer, S.F., Deckmyn, H. and Vanhoorelbeke, K. (2009) von Willebrand factor to the rescue. *Blood*, **113**, 5049-5057.
- de Wit, T.R. and van Mourik, J.A. (2001) Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol*, **14**, 241-255.
- Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint Basile, G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P. and Darchen, F. (2003) Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol*, **163**, 559-570.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. and Goud, B. (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*, **279**, 580-585.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (2003) Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*, **115**, 461-473.
- Figueiredo, A.C., Wasmeier, C., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Baron, R.A. and Seabra, M.C. (2008) Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *J Biol Chem*, **283**, 23209-23216.
- Fontijn, R.D., Goud, B., Echard, A., Jollivet, F., van Marle, J., Pannekoek, H. and Horrevoets, A.J. (2001) The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Mol Cell Biol*, **21**, 2944-2955.
- Fu, J., Naren, A.P., Gao, X., Ahmmmed, G.U. and Malik, A.B. (2005) Protease-activated receptor-1 activation of endothelial cells induces protein kinase Calpha-dependent phosphorylation of syntaxin 4 and Munc18c: role in signaling p-selectin expression. *J Biol Chem*, **280**, 3178-3184.
- Fukuda, M. (2005) Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J Biochem*, **137**, 9-16.

- Fukuda, M. (2006) Rab27 and its effectors in secretory granule exocytosis: a novel docking machinery composed of a Rab27.effector complex. *Biochem Soc Trans*, **34**, 691-695.
- Fukuda, M. (2008) Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2801-2813.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K. and Itoh, T. (2008) Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 1031-1042.
- Fukuda, M., Kanno, E., Saegusa, C., Ogata, Y. and Kuroda, T.S. (2002) Slp4-a/granuphilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem*, **277**, 39673-39678.
- Fukuda, M., Kanno, E. and Yamamoto, A. (2004) Rabphilin and Noc2 are recruited to dense-core vesicles through specific interaction with Rab27A in PC12 cells. *J Biol Chem*, **279**, 13065-13075.
- Galley, H.F. and Webster, N.R. (2004) Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*, **93**, 105-113.
- Goldberger, A.L., Amaral, L.A., Hausdorff, J.M., Ivanov, P., Peng, C.K. and Stanley, H.E. (2002) Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 1**, 2466-2472.
- Goligorsky, M.S., Patschan, D. and Kuo, M.C. (2009) Weibel-Palade bodies--sentinels of acute stress. *Nat Rev Nephrol*, **5**, 423-426.
- Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S. and Izumi, T. (2005) Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol*, **171**, 99-109.
- Gomi, H., Mori, K., Itohara, S. and Izumi, T. (2007) Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, **18**, 4377-4386.
- Goody, R.S., Rak, A. and Alexandrov, K. (2005) The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1657-1670.
- Gowans, J.L. (1959) The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol*, **146**, 54-69.
- Hales, C.M., Vaerman, J.P. and Goldenring, J.R. (2002) Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem*, **277**, 50415-50421.
- Handley, M.T., Haynes, L.P. and Burgoyne, R.D. (2007) Differential dynamics of Rab3A and Rab27A on secretory granules. *J Cell Sci*, **120**, 973-984.
- Hannah, M.J., Hume, A.N., Arribas, M., Williams, R., Hewlett, L.J., Seabra, M.C. and Cutler, D.F. (2003) Weibel-Palade bodies recruit Rab27 by a content-driven, maturation-dependent mechanism that is independent of cell type. *J Cell Sci*, **116**, 3939-3948.
- Hannah, M.J., Williams, R., Kaur, J., Hewlett, L.J. and Cutler, D.F. (2002) Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 313-324.
- Hayes, G.L., Brown, F.C., Haas, A.K., Nottingham, R.M., Barr, F.A. and Pfeffer, S.R. (2009) Multiple Rab GTPase binding sites in GCC185 suggest a model for vesicle tethering at the trans-Golgi. *Mol Biol Cell*, **20**, 209-217.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2509-2514.

- Hoepfner, S., Severin, F., Cabezas, A., Habermann, B., Runge, A., Gillyooly, D., Stenmark, H. and Zerial, M. (2005) Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell*, **121**, 437-450.
- Hume, A.N., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Sviderskaya, E.V. and Seabra, M.C. (2006) A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes. *Mol Biol Cell*, **17**, 4720-4735.
- Izumi, T. (2007) Physiological roles of Rab27 effectors in regulated exocytosis. *Endocr J*, **54**, 649-657.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, **52**, 2745-2756.
- Johannes, L., Lledo, P.M., Roa, M., Vincent, J.D., Henry, J.P. and Darchen, F. (1994) The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *Embo J*, **13**, 2029-2037.
- Johnson, J.L., Ellis, B.A., Noack, D., Seabra, M.C. and Catz, S.D. (2005) The Rab27a-binding protein, JFC1, regulates androgen-dependent secretion of prostate-specific antigen and prostatic-specific acid phosphatase. *Biochem J*, **391**, 699-710.
- Knop, M., Aareskjold, E., Bode, G. and Gerke, V. (2004) Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *Embo J*, **23**, 2982-2992.
- Koch, H., Hofmann, K. and Brose, N. (2000) Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J*, **349**, 247-253.
- Kotake, K., Ozaki, N., Mizuta, M., Sekiya, S., Inagaki, N. and Seino, S. (1997) Noc2, a putative zinc finger protein involved in exocytosis in endocrine cells. *J Biol Chem*, **272**, 29407-29410.
- Kukimoto-Niino, M., Sakamoto, A., Kanno, E., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Shirouzu, M., Fukuda, M. and Yokoyama, S. (2008) Structural basis for the exclusive specificity of Slac2-a/melanophilin for the Rab27 GTPases. *Structure*, **16**, 1478-1490.
- Kuroda, T.S. and Fukuda, M. (2004) Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat Cell Biol*, **6**, 1195-1203.
- Kuroda, T.S., Fukuda, M., Ariga, H. and Mikoshiba, K. (2002a) The Slp homology domain of synaptotagmin-like proteins 1-4 and Slac2 functions as a novel Rab27A binding domain. *J Biol Chem*, **277**, 9212-9218.
- Kuroda, T.S., Fukuda, M., Ariga, H. and Mikoshiba, K. (2002b) Synaptotagmin-like protein 5: a novel Rab27A effector with C-terminal tandem C2 domains. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 899-906.
- Kuroda, T.S., Itoh, T. and Fukuda, M. (2005) Functional analysis of slac2-a/melanophilin as a linker protein between Rab27A and myosin Va in melanosome transport. *Methods Enzymol*, **403**, 419-431.
- Leung, K.F., Baron, R. and Seabra, M.C. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res*, **47**, 467-475.
- Liu, D., Meckel, T. and Long, E.O. Distinct role of rab27a in granule movement at the plasma membrane and in the cytosol of NK cells. *PLoS One*, **5**, e12870.
- Lowenstein, C.J., Morrell, C.N. and Yamakuchi, M. (2005) Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med*, **15**, 302-308.

- Lui-Roberts, W.W., Collinson, L.M., Hewlett, L.J., Michaux, G. and Cutler, D.F. (2005) An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *J Cell Biol*, **170**, 627-636.
- Maison, C., Horstmann, H. and Georgatos, S.D. (1993) Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol*, **123**, 1491-1505.
- Maison, C., Pырpasopoulou, A., Theodoropoulos, P.A. and Georgatos, S.D. (1997) The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *Embo J*, **16**, 4839-4850.
- Malsam, J., Kreye, S. and Sollner, T.H. (2008) Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2814-2832.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Pinsky, D.J., Sesti, C. and Levi, R. (2003) Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost*, **1**, 2497-2509.
- Masuda, E.S., Luo, Y., Young, C., Shen, M., Rossi, A.B., Huang, B.C., Yu, S., Bennett, M.K., Payan, D.G. and Scheller, R.H. (2000) Rab37 is a novel mast cell specific GTPase localized to secretory granules. *FEBS Lett*, **470**, 61-64.
- Matsumoto, M., Miki, T., Shibasaki, T., Kawaguchi, M., Shinozaki, H., Nio, J., Saraya, A., Koseki, H., Miyazaki, M., Iwanaga, T. and Seino, S. (2004) Noc2 is essential in normal regulation of exocytosis in endocrine and exocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8313-8318.
- Matsushita, K., Morrell, C.N., Cambien, B., Yang, S.X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M.R., Quick, R.A., Cao, W., O'Rourke, B., Lowenstein, J.M., Pevsner, J., Wagner, D.D. and Lowenstein, C.J. (2003) Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell*, **115**, 139-150.
- McAdara Berkowitz, J.K., Catz, S.D., Johnson, J.L., Ruedi, J.M., Thon, V. and Babior, B.M. (2001) JFC1, a novel tandem C2 domain-containing protein associated with the leukocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, **276**, 18855-18862.
- Meier, J. and Georgatos, S.D. (1994) Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *Embo J*, **13**, 1888-1898.
- Menager, M.M., Menasche, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (2007) Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol*, **8**, 257-267.
- Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F. and de Saint Basile, G. (2000) Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet*, **25**, 173-176.
- Metcalf, D.J., Nightingale, T.D., Zenner, H.L., Lui-Roberts, W.W. and Cutler, D.F. (2008) Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci*, **121**, 19-27.
- Michaux, G., Abbitt, K.B., Collinson, L.M., Haberichter, S.L., Norman, K.E. and Cutler, D.F. (2006a) The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev Cell*, **10**, 223-232.
- Michaux, G. and Cutler, D.F. (2004) How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Traffic*, **5**, 69-78.

- Michaux, G., Pullen, T.J., Haberichter, S.L. and Cutler, D.F. (2006b) P-selectin binds to the D'-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies. *Blood*, **107**, 3922-3924.
- Moyer, B.D., Allan, B.B. and Balch, W.E. (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering. *Traffic*, **2**, 268-276.
- Nashida, T., Imai, A. and Shimomura, H. (2006) Relation of Rab26 to the amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol*, **51**, 89-95.
- Neeft, M., Wieffer, M., de Jong, A.S., Negroiu, G., Metz, C.H., van Loon, A., Griffith, J., Krijgsveld, J., Wulffraat, N., Koch, H., Heck, A.J., Brose, N., Kleijmeer, M. and van der Sluijs, P. (2005) Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell*, **16**, 731-741.
- Nico, B., Crivellato, E. and Ribatti, D. (2007) The importance of electron microscopy in the study of capillary endothelial cells: an historical review. *Endothelium*, **14**, 257-264.
- Nightingale, T.D., Pattni, K., Hume, A.N., Seabra, M.C. and Cutler, D.F. (2009) Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of VWF released from endothelial cells. *Blood*, **113**, 5010-5018.
- Ostermeier, C. and Brunger, A.T. (1999) Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, **96**, 363-374.
- Padilla, A., Moake, J.L., Bernardo, A., Ball, C., Wang, Y., Arya, M., Nolasco, L., Turner, N., Berndt, M.C., Anvari, B., Lopez, J.A. and Dong, J.F. (2004) P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood*, **103**, 2150-2156.
- Pavlos, N.J., Gronborg, M., Riedel, D., Chua, J.J., Boyken, J., Kloepper, T.H., Urlaub, H., Rizzoli, S.O. and Jahn, R. Quantitative analysis of synaptic vesicle Rabs uncovers distinct yet overlapping roles for Rab3a and Rab27b in Ca²⁺-triggered exocytosis. *J Neurosci*, **30**, 13441-13453.
- Pearson, J.D. (1999) Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, **12**, 329-341.
- Pereira-Leal, J.B. and Seabra, M.C. (2000) The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol*, **301**, 1077-1087.
- Pereira-Leal, J.B. and Seabra, M.C. (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol*, **313**, 889-901.
- Pivot-Pajot, C., Varoqueaux, F., de Saint Basile, G. and Bourgoin, S.G. (2008) Munc13-4 regulates granule secretion in human neutrophils. *J Immunol*, **180**, 6786-6797.
- Pulido, I.R., Jahn, R. and Gerke, V. VAMP3 is associated with endothelial Weibel-Palade bodies and participates in their Ca(2+)-dependent exocytosis. *Biochim Biophys Acta*.
- Ramalho, J.S., Anders, R., Jaissle, G.B., Seeliger, M.W., Huxley, C. and Seabra, M.C. (2002) Rapid degradation of dominant-negative Rab27 proteins in vivo precludes their use in transgenic mouse models. *BMC Cell Biol*, **3**, 26.
- Raposo, G., Marks, M.S. and Cutler, D.F. (2007) Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 394-401.
- Regazzi, R., Ravazzola, M., Iezzi, M., Lang, J., Zahraoui, A., Anderreggen, E., Morel, P., Takai, Y. and Wollheim, C.B. (1996) Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J Cell Sci*, **109** (Pt 9), 2265-2273.

- Riedel, D., Antonin, W., Fernandez-Chacon, R., Alvarez de Toledo, G., Jo, T., Geppert, M., Valentijn, J.A., Valentijn, K., Jamieson, J.D., Sudhof, T.C. and Jahn, R. (2002) Rab3D is not required for exocrine exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules. *Mol Cell Biol*, **22**, 6487-6497.
- Rondaij, M.G., Bierings, R., Kragt, A., van Mourik, J.A. and Voorberg, J. (2006) Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 1002-1007.
- Rupnik, M., Kreft, M., Nothias, F., Grilc, S., Bobanovic, L.K., Johannes, L., Kiauta, T., Vernier, P., Darchen, F. and Zorec, R. (2007) Distinct role of Rab3A and Rab3B in secretory activity of rat melanotrophs. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C98-105.
- Sadler, J.E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, **67**, 395-424.
- Sadler, J.E. (2005) von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost*, **3**, 1702-1709.
- Sadler, J.E. (2008) Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, **112**, 11-18.
- Sadler, J.E. (2009) von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost*, **7 Suppl 1**, 24-27.
- Schluter, O.M., Khvotchev, M., Jahn, R. and Sudhof, T.C. (2002) Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem*, **277**, 40919-40929.
- Schluter, O.M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C. and Sudhof, T.C. (2004) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J Neurosci*, **24**, 6629-6637.
- Schwartz, S.L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A. and Wandinger-Ness, A. (2007) Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci*, **120**, 3905-3910.
- Schwartz, S.M., Heimark, R.L. and Majesky, M.W. (1990) Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev*, **70**, 1177-1209.
- Seabra, M.C. and Wasmeier, C. (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 451-457.
- Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B.D. and Smythe, E. (2008) Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol*, **183**, 499-511.
- Shirakawa, R., Higashi, T., Tabuchi, A., Yoshioka, A., Nishioka, H., Fukuda, M., Kita, T. and Horiuchi, H. (2004) Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem*, **279**, 10730-10737.
- Shirakawa, R., Yoshioka, A., Horiuchi, H., Nishioka, H., Tabuchi, A. and Kita, T. (2000) Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem*, **275**, 33844-33849.
- Simpson, J.C., Griffiths, G., Wessling-Resnick, M., Fransen, J.A., Bennett, H. and Jones, A.T. (2004) A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*, **117**, 6297-6311.
- Sivars, U., Aivazian, D. and Pfeffer, S.R. (2003) Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature*, **425**, 856-859.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, **149**, 901-914.
- Starling, E.H. (1896) On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol*, **19**, 312-326.

- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 513-525.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V.M. (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3007.
- Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ullrich, O., Goud, B. and Zerial, M. (1994) Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *Embo J*, **13**, 575-583.
- Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C. and Griffiths, G.M. (2001) Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol*, **152**, 825-834.
- Strom, M., Hume, A.N., Tarafder, A.K., Barkagianni, E. and Seabra, M.C. (2002) A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J Biol Chem*, **277**, 25423-25430.
- Sudhof, T.C. and Rothman, J.E. (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, **323**, 474-477.
- Sumpio, B.E., Riley, J.T. and Dardik, A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1508-1512.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. and Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, **127**, 831-846.
- ten Klooster, J.P. and Hordijk, P.L. (2007) Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biol Cell*, **99**, 1-12.
- Thiele, C. and Huttner, W.B. (1998) Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules-recent developments. *Semin Cell Dev Biol*, **9**, 511-516.
- Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2006) Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci*, **119**, 2196-2203.
- Tsuboi, T., Kanno, E. and Fukuda, M. (2007) The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells. *J Neurochem*, **100**, 770-779.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 285-293.
- Valentijn, K.M., Valentijn, J.A., Jansen, K.A. and Koster, A.J. (2008) A new look at Weibel-Palade body structure in endothelial cells using electron tomography. *J Struct Biol*, **161**, 447-458.
- Valentijn, K.M., van Driel, L.F., Mourik, M.J., Hendriks, G.J., Arends, T.J., Koster, A.J. and Valentijn, J.A. Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood*, **116**, 1807-1816.
- van Mourik, J.A., Romani de Wit, T. and Voorberg, J. (2002) Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol*, **117**, 113-122.
- Wagner, D.D., Saffaripour, S., Bonfanti, R., Sadler, J.E., Cramer, E.M., Chapman, B. and Mayadas, T.N. (1991) Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propeptide. *Cell*, **64**, 403-413.
- Wang, J., Takeuchi, T., Yokota, H. and Izumi, T. (1999) Novel rabphilin-3-like protein associates with insulin-containing granules in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, **274**, 28542-28548.

- Waselle, L., Coppola, T., Fukuda, M., Iezzi, M., El-Amraoui, A., Petit, C. and Regazzi, R. (2003) Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Mol Biol Cell*, **14**, 4103-4113.
- Weibel, E.R. and Palade, G.E. (1964) New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol*, **23**, 101-112.
- Wood, S.M., Meeths, M., Chiang, S.C., Bechensteen, A.G., Boelens, J.J., Heilmann, C., Horiuchi, H., Rosthoj, S., Rutynowska, O., Winiarski, J., Stow, J.L., Nordenskjold, M., Henter, J.I., Ljunggren, H.G. and Bryceson, Y.T. (2009) Different NK cell-activating receptors preferentially recruit Rab27a or Munc13-4 to perforin-containing granules for cytotoxicity. *Blood*, **114**, 4117-4127.
- Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Hammer, J.A., 3rd. (2002) Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol*, **4**, 271-278.
- Wu, Y.W., Tan, K.T., Waldmann, H., Goody, R.S. and Alexandrov, K. (2007) Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 12294-12299.
- Yamamoto, K., Ishii, E., Sako, M., Ohga, S., Furuno, K., Suzuki, N., Ueda, I., Imayoshi, M., Yamamoto, S., Morimoto, A., Takada, H., Hara, T., Imashuku, S., Sasazuki, T. and Yasukawa, M. (2004) Identification of novel MUNC13-4 mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes. *J Med Genet*, **41**, 763-767.
- Yi, Z., Yokota, H., Torii, S., Aoki, T., Hosaka, M., Zhao, S., Takata, K., Takeuchi, T. and Izumi, T. (2002) The Rab27a/granophilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol Cell Biol*, **22**, 1858-1867.
- Yu, M., Kasai, K., Nagashima, K., Torii, S., Yokota-Hashimoto, H., Okamoto, K., Takeuchi, T., Gomi, H. and Izumi, T. (2007) Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca²⁺-inhibitory phospholipid-binding activity of the C2A domain. *Mol Biol Cell*, **18**, 688-696.
- Zenner, H.L., Collinson, L.M., Michaux, G. and Cutler, D.F. (2007) High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. *J Cell Sci*, **120**, 2117-2125.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 107-117.
- Zhao, S., Torii, S., Yokota-Hashimoto, H., Takeuchi, T. and Izumi, T. (2002) Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones. *Endocrinology*, **143**, 1817-1824.
- Zheng, J.Y., Koda, T., Fujiwara, T., Kishi, M., Ikehara, Y. and Kakinuma, M. (1998) A novel Rab GTPase, Rab33B, is ubiquitously expressed and localized to the medial Golgi cisternae. *J Cell Sci*, **111** (Pt 8), 1061-1069.
- Zuk, P.A. and Elferink, L.A. (1999) Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **274**, 22303-22312.
- Zuk, P.A. and Elferink, L.A. (2000) Rab15 differentially regulates early endocytic trafficking. *J Biol Chem*, **275**, 26754-26764.