



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ο Ρόλος των Πρωτεϊνών του Συμπλέγματος της Πρωτεΐνης SARA στη
Μεταγωγή του Σήματος και τη Βιολογική Δραστικότητα του TGFβ-ακτιβίνης**

Η Πρωτεΐνη RNF11

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Κ. ΚΩΣΤΑΡΑΣ
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

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

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κωσταρά Ελευθέριου : 7-12-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 569^α/13-12-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Carol Murphy Ερευνήτρια Β' ΙΒΕ-ΙΤΕ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-3-2006

«Ο ρόλος των πρωτεϊνών του Συμπλέγματος της πρωτεΐνης SARA στην Μεταγωγή του Σήματος και τη Βιολογική Δραστικότητα του TFG –β/ακτιβίνης»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 711^α/3-5-2001

Γαλάρης Δημήτριος

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεωργάτος Σπυρίδων

Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φώτης Θεόδωρος

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παπαμαρκάκη Θωμαΐς

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κούκλης Παναγιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χριστοφορίδης Σάββας

Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Murphy Carol

Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 3-5-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (ITE-IBE), κατά την χρονική περίοδο 2006-2011, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση και της ερευνήτριας Β' κ. Carol Murphry. Η χρηματοδότηση για τη διεκπεραίωση της διατριβής προήλθε από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα ENDOTRACK (EU FP6, LSH-2004-1.1.5-2).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες κ. Θεόδωρο Φώτση και κ. Carol Murphry για την επιστημονική τους καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν σε κάθε στάδιο της παρούσας μελέτης. Επίσης, για την συμβολή του στην παρούσα μελέτη, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω, όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών ερευνών, για την ομαδικότητα και τη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Γιώργο Σφλώμο, για την αρχική βοήθεια και τη μετέπειτα συνεργασία στα πλαίσια των κοινών ερευνητικών ενδιαφερόντων, καθώς επίσης τους Νικολέτα Κωστοπούλου, Κατερίνα Πανοπούλου, Σοφία Μπέλου, Αθηνά Κύρκου, Παναγιώτα Χήρα, Λαμπρινή Κύρκου, Δημήτρη Μπασαγιάννη, Σοφία Ζωγράφου, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα και Κατερίνα Γεωργοπούλου.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την Εύη Καραλή, τον Κωνσταντίνο Παπαρούνα και την Ευτυχία Γαλιάτσου, τους φίλους και την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή τους στήριξη.

Στους γονείς μου Σοφία και Κώστα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΓΕΝΙΚΑ	1
1.1.1	Κυτταρική επικοινωνία και σηματοδότηση	1
1.1.2	Κυτταρική σηματοδότηση: Το παράδειγμα των υποδοχέων της οικογένειας του EGF.....	2
1.1.3	Ενδοκυττάρωση και ενδοκυτταρική διακίνηση.....	3
1.1.3.1	Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης	4
1.1.3.2	Ενδοκυτταρική διακίνηση	5
1.1.4	Ρυθμιστές της ενδοκυττάρωσης και της ενδοκυτταρικής διακίνησης.....	7
1.1.4.1	Φωσφωινোসίδια	7
1.1.4.2	Οι Rab πρωτεΐνες	9
1.2	ΚΛΑΘΡΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	11
1.2.1	Μηχανισμοί δημιουργίας κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη	12
1.2.2	Σήματα διαλογής για την ενδοκυττάρωση και την ενδοκυτταρική διακίνηση	15
1.2.2.1	Μοτίβα	15
1.2.2.1.1	Το μοτίβο τύπου NPXY	16
1.2.2.1.2	Το μοτίβο τύπου YXXΦ	16
1.2.2.1.3	Μοτίβα αλληλουχιών βασισμένα σε κατάλοιπα λευκίνης.....	17
1.2.2.2	Η πρωτεΐνη ουβικιτίνη	17
1.3	ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ	20
1.3.1	Πρώιμα Ενδοσώματα/Ενδοσώματα Διαλογής	20
1.3.1.1	Πρωτεΐνες του πρώιμου ενδοσώματος	22
1.3.1.2	Σηματοδότηση και πρώιμο ενδόσωμα. <i>Από το χθες στο σήμερα</i>	26
1.3.2	Τα ενδοσώματα ανακύκλωσης	28
1.3.3	Το μονοπάτι αποικοδόμησης.....	29
1.3.3.1	Πολυκυστιδιακά σωματίδια, όψιμο ενδόσωμα και λυσόσωμα.....	29
1.3.3.2	Μηχανισμός δημιουργίας πολυκυστιδιακών σωματιδίων και διαλογή για αποικοδόμηση	31
1.3.3.2.1	ESCRT συμπλέγματα (Endosomal sorting complex required for transport).....	32
1.3.3.2.2	Σύλληψη του φορτίου	37
1.3.3.2.3	Άλλες λειτουργίες του ESCRT συμπλέγματος	39
1.4	Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA	40
1.4.1	Ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη SARA συνδέεται με γεγονότα κυστιδιακής διακίνησης..	40
1.4.2	Η σημασία της πρωτεΐνης SARA στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και την Ακτιβίνη	42
1.4.3	Ο ρόλος της πρωτεΐνης SARA κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης.....	44
1.4.4	Αποτελέσματα από το σύστημα του διπλού υβριδίου	45
1.5	Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11	46
1.5.1	Έκφραση της πρωτεΐνης RNF11	46
1.5.2	Δομικές περιοχές και μοτίβα της πρωτεΐνης RNF11	47
1.5.3	Η βιολογική σημασία της πρωτεΐνης RNF11	50
1.6	ΣΚΟΠΟΣ	53

2	ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	55
2.1	ΥΛΙΚΑ	55
2.1.1	Αντισώματα και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες	55
2.1.2	Φορείς έκφρασης πρωτεϊνών και siRNAs	56
2.1.3	Εκκινητές και κλωνοποίηση	56
2.2	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ & ΑΔΕΝΟΪΟΙ	58
2.2.1	Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβες ομφάλιων λώρων	58
2.2.2	Καλλιέργεια και διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών	58
2.2.3	Έκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα BHK με τη βοήθεια της T7 RNA πολυμεράσης του συστήματος του ιού της vaccinia	59
2.2.4	Κατασκευή και τιτλοδότηση ανασυνδυασμένων αδενοϊών.....	60
2.3	ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
2.3.1	Απομόνωση RNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης-PCR (qRT-PCR).....	60
2.3.2	Έμμεσος ανοσοφθορισμός και στατιστική ανάλυση του συνεντοπισμού	61
2.3.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	62
2.3.4	Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών	63
2.3.5	Καθαρισμός GST-πρωτεϊνών	63
2.3.6	Δοκιμασία πρωτεϊνικής καταβύθισης (Glutathione S-transferase pull-down assays).....	64
2.3.7	Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης (Immunoprecipitation assays).....	64
2.3.8	Παρακολούθηση της αποικοδόμησης του EGFR	65
2.3.9	Ενδοκυττάρωση του ¹²⁵ I-EGF.....	65
2.3.10	Ανακύκλωση και αποικοδόμηση του ¹²⁵ I-EGF.	65
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
3.1	Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA	67
3.1.1	Ανίχνευση με το σύστημα του διπλού υβριδίου	67
3.1.2	Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11 και SARA με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull down)	67
3.1.3	Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11 και SARA με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής ανοσοκατακρήμνισης (immunoprecipitation).....	68
3.2	Η ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SARA ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΑ	69
3.3	Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ, ΣΤΑ ΟΨΙΜΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗΣ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ, ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA	73
3.3.1	Η κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης RNF11	73
3.3.2	Η πρωτεΐνη RNF11 συνεντοπίζεται με την SARA στο πρώιμο ενδόσωμα	76
3.3.3	Η πρωτεΐνη RNF11 στοχεύεται στο πρώιμο ενδόσωμα ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης SARA	78
3.4	Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΥΦΙΣΤΑΤΑΙ ΜΥΡΙΣΤΟΪΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΟ ΑΚΡΟ ΚΑΙ ΓΡΗΓΟΡΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	78
3.4.1	Η πρωτεΐνη RNF11 υφίσταται μυριστοϋλίωση.....	78

3.4.2	Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης επηρεάζει την κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης RNF11	80
3.5	ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RNF11 ΚΑΙ SARA	82
3.5.1	Εύρεση της περιοχής της πρωτεΐνης SARA που αλληλεπιδρά με την RNF11	82
3.5.2	Η σημασία των δομικών περιοχών και μοτίβων της πρωτεΐνης RNF11 για τη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη SARA.	83
3.6	Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΟΔΗΓΕΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA ΣΕ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	86
3.6.1	Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 μειώνει τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης SARA	86
3.6.2	Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 αποικοδομεί τη SARA στο λυσόσωμα.	88
3.7	ΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΤΩΝ RNF11/SARA ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΙΣ ESCRT-0 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	92
3.7.1	Η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τις STAM2, Eps15b και HRS	92
3.7.2	Η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες STAM2 και κλαθρίνη, αλλά όχι με την πρωτεΐνη HRS.....	96
3.8	Η RNF11 ΚΑΙ Η SARA ΠΑΙΡΝΟΥΝ ΜΕΡΟΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ EGFR ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ.....	98
3.8.1	Απορύθμιση των επιπέδων των πρωτεϊνών RNF11 και SARA καθυστερεί την αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR	99
3.8.2	Η σημασία των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης RNF11 στην αποικοδόμηση του EGFR υποδοχέα.	101
3.9	ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ RNF11 ΚΑΙ zFYVE9 (SARA) ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ EGF ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ERK1/2	103
3.10	Η ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ RNF11 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ EGF, ΕΝΩ Η ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ zFYVE9 (SARA) ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΔΕΝ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ.....	104
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	109
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	121
	SUMMARY	123
	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	125
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	129

1 **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1.1 **ΓΕΝΙΚΑ**

1.1.1 **Κυτταρική επικοινωνία και σηματοδότηση**

Τα κύτταρα όλων των οργανισμών, από τους κατώτερους μονοκύτταρους μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά, επικοινωνούν με το περιβάλλον τους και ανταποκρίνονται ειδικά στα ερεθίσματα που λαμβάνουν από αυτό. Για παράδειγμα, ένας απλός μονοκύτταρος οργανισμός μπορεί να αντιλαμβάνεται τη διαφορά του φωτός και να ανταποκρίνεται κινούμενος προς αυτό το ερέθισμα. Από την άλλη μεριά, στους ανώτερους οργανισμούς, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, ομάδες κυττάρων εκκρίνουν διάφορα μορφογόνα, ουσίες που αναγκάζουν και ωθούν άλλες κατηγορίες κυττάρων να μεταναστεύσουν, να πολλαπλασιαστούν ή να αποκτήσουν συγκεκριμένη αναπτυξιακή τύχη. Η κυτταρική επικοινωνία λοιπόν, αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της βιολογίας και της ανάπτυξης όλων των οργανισμών, διασφαλίζει την ισορροπία και επιτρέπει τη σωστή λειτουργία των πολυκύτταρων οργανισμών σαν μια συντονισμένη και αρμονικά συνεργάσιμη κοινωνία.

Τα κύτταρα διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς επικοινωνίας με το περιβάλλον ή τα γειτονικά τους κύτταρα, μια διαδικασία που περιγράφεται ως μεταγωγή σήματος. Η μεταγωγή σήματος στην πιο απλουστευμένη της μορφή, περιλαμβάνει μια ομάδα σηματοδοτικών κυττάρων που εκκρίνουν, μέσω των μηχανισμών της εξωκυττάρωσης, σηματοδοτικά μόρια (συνδέτες ή προσδέματα, ligands), όπως για παράδειγμα ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες. Οι ουσίες αυτές ανιχνεύονται από πρωτεΐνες-υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης μιας άλλης ομάδας κυττάρων, τα οποία λειτουργούν ως δέκτες και συχνά, αναφέρονται ως κύτταρα-στόχοι. Οι υποδοχείς ανταποκρίνονται ειδικά συνδεδεμένοι στα διάφορα σηματοδοτικά μόρια, που υπάρχουν στο εξωκυττάριο υγρό και με μια απόλυτα εξειδικευμένη και σε υψηλό βαθμό ρυθμιζόμενη διαδικασία, μεταβιβάζουν το μήνυμα στο εσωτερικό των κυττάρων, μέσω ενδιάμεσων αγγελιοφόρων μορίων. Η τελευταία διαδικασία, που περιγράφεται με τον όρο της κυτταρικής σηματοδότησης, προκαλεί μια σειρά μοριακών αλλαγών στα κύτταρα στόχους, μέσω των οποίων ερμηνεύουν, με τρόπο ειδικό, τα μηνύματα που δέχονται, επάγοντας διάφορες

βιολογικές διαδικασίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, την έκκριση ουσιών ή τον κυτταρικό θάνατο.

1.1.2 Κυτταρική σηματοδότηση: Το παράδειγμα των υποδοχέων της οικογένειας του EGF

Οι υποδοχείς της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ανήκουν στην κατηγορία των διαμεμβρανικών υποδοχέων με εγγενή δραστικότητα κινάσης σε κατάλοιπα τυροσίνης (RTK, Receptor tyrosine kinase) και περιλαμβάνουν τους EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2/new, ErbB3/HER3 και ErbB4/HER4. Ο ErbB2 υποδοχέας δεν δεσμεύεται σε αυξητικούς παράγοντες, ενώ ο ErbB3 δεν έχει ενεργό κέντρο κινάσης. Οι δύο αυτοί υποδοχείς πιστεύεται πως δρουν σαν συν-υποδοχείς μαζί με άλλα μέλη της οικογένειας¹.

Στο εξωκυτταρικό τμήμα των ErbB υποδοχέων δεσμεύεται πληθώρα προσδεμάτων ή αυξητικών παραγόντων. Οι EGF, amphiregulin (AR) και TGF- α δεσμεύονται στον EGFR, ενώ οι betacellulin (BTC), heparin-binding EGF (HB-EGF) και epiregulin (EPR) προσδέονται στον EGFR και τον ErbB4. Οι neuregulins 1 και 2 συνδέονται στους ErbB3 και ErbB4, ενώ οι 3 και 4 μόνο στον ErbB4².

Η κυτταροπλασματική πλευρά των υποδοχέων έχει ενεργότητα κινάσης σε κατάλοιπα τυροσίνης. Έπειτα από επαγωγή, οι υποδοχείς φωσφορυλιώνουν τόσο τον εαυτό τους, όσο και πλήθος κυτταροπλασματικών ή μεμβρανικών πρωτεϊνών, που επιτρέπουν τόσο τη μεταγωγή του σήματος όσο και την ενδοκυττάρωσή τους. Ο μηχανισμός ενδοκυττάρωσης των EGFR υποδοχέων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης (υποενότητα 1.2.1). Οι υποδοχείς EGFR μεταδίδουν το μήνυμα μέσω πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών μεταξύ των οποίων μερικά είναι καλά μελετημένα¹, όπως

1. το μονοπάτι Ras/MAPK (Mitogen-activated protein kinase)
2. το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) και
3. το μονοπάτι JAK/STAT (Janus/Signal transducer and activator of transcription)

Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των διαδοχικών ενεργοποιήσεων είναι η τροποποίηση της έκφρασης σειράς γονιδίων και η αλλαγή της λειτουργίας του κυττάρου. Έτσι, οι

υποδοχείς EGFR παίζουν σημαντικό ρόλο σε πλειάδα κυτταρικών ανταποκρίσεων όπως στο καθορισμό της κυτταρικής γραμμής (cell lineage), τη μορφογένεση πολλών οργάνων (organ morphogenesis) και τη κυτταρική επιβίωση (cell survival) στον ενήλικα οργανισμό. Επιπρόσθετα, ο EGFR και οι άλλοι υποδοχείς της οικογένειας, διαμέσου της ενεργοποίησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων μορφών καρκίνων, όπως στον καρκίνο του μαστού, των πνευμόνων, του προστάτη, του εγκεφάλου και άλλων. Οι καρκίνοι αυτοί συχνά σχετίζονται με υπερέκφραση των υποδοχέων ή με μεταλλάξεις που αλλάζουν τη λειτουργία και τη μεμβρανική τους διακίνηση³.

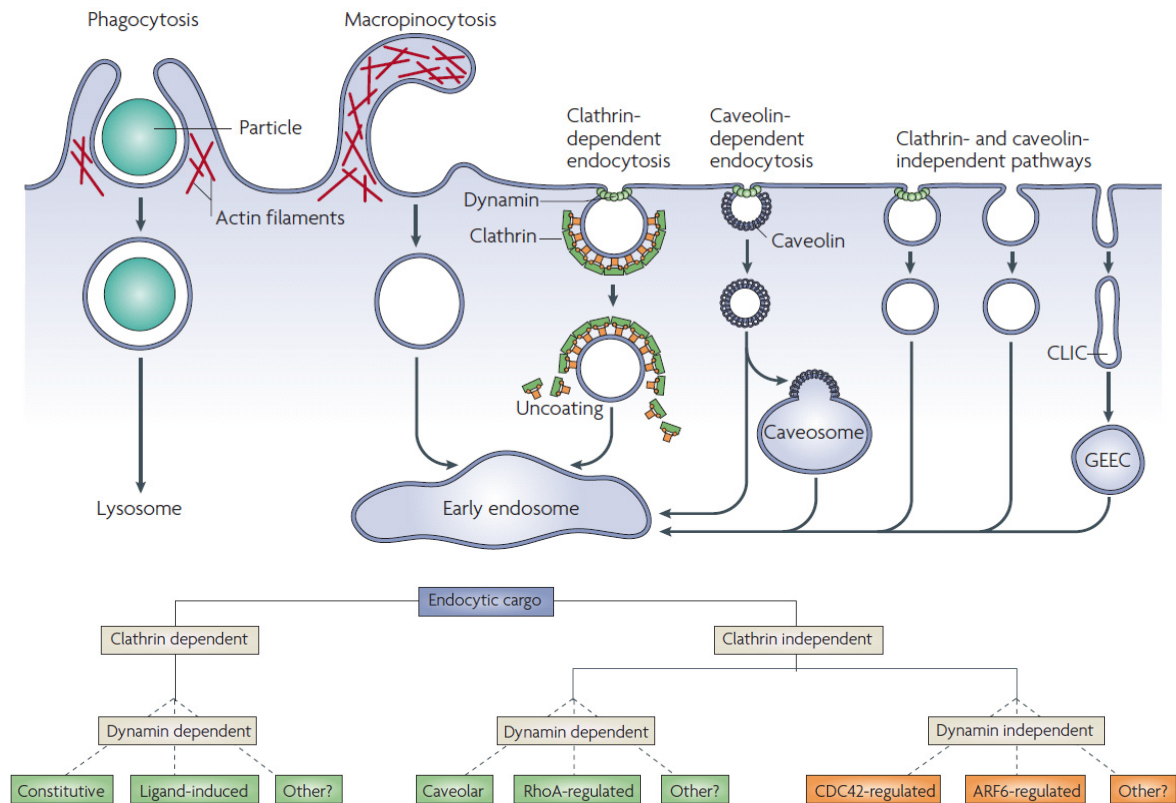
1.1.3 Ενδοκυττάρωση και ενδοκυτταρική διακίνηση

Στις περισσότερες περιπτώσεις η σύνδεση του σηματοδοτικού μορίου στον κατάλληλο υποδοχέα, εκτός από την μετάδοση του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου, έχει ως αποτέλεσμα και την εσωτερίκευση των συμπλεγμάτων των υποδοχέων-συνδετών. Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων με τα προσδέματά τους ή άλλες πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης ('φορτίο', **cargo**), εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενσωματωμένες σε μεμβρανικά κυστίδια (**vesicles**). Αυτά μετακινούνται μέσα στο κύτταρο και παραδίδουν το 'φορτίο' σε διάφορους ενδοκυτταρικούς προορισμούς. Η είσοδος του 'φορτίου' μέσα στο κύτταρο περιγράφεται με τον όρο της ενδοκυττάρωσης (**Endocytosis**), ενώ η κυκλοφορία του 'φορτίου', διαμέσου κυστιδίων, στα διάφορα ενδοκυτταρικά μονοπάτια, περιγράφεται με τον όρο της ενδοκυτταρικής διακίνησης (**Trafficking**).

Τα κύτταρα, μέσω των μηχανισμών της ενδοκυττάρωσης και των μονοπατιών μεμβρανικής διακίνησης, από τη μια ρυθμίζουν τη μακροπρόθεσμη ευαισθησία των κυττάρων σε αυξητικούς παράγοντες και από την άλλη ελέγχουν την ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων. Επιπρόσθετα, η ενδοκυττάρωση και η ενδοκυτταρική διακίνηση ρυθμίζουν τη λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, την αντιγονική παρουσίαση, τη μίτωση, την κυτταρική μετανάστευση, την είσοδο παθογόνων στο κύτταρο και πολλά άλλα⁴.

1.1.3.1 Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης

Τα κύτταρα εσωτερικεύουν εξωκυττάριο υλικό, αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς, πρωτεΐνες και λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, παθογόνα, θραύσματα νεκρών κυττάρων και άλλα. Η ενδοκυττάρωση πραγματοποιείται με διάφορους μηχανισμούς, που κατατάσσονται με βάση την αναγκαιότητα ή όχι για την πρωτεΐνη κλαθρίνη^{5 6 7} (Εικ.1.1). Η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση (CDE, Clathrin-dependent endocytosis) είναι ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός εσωτερίκευσης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στο κύτταρο. Λεπτομερής περιγραφή των μηχανισμών αυτού του μονοπατιού παρατίθεται στην υποενότητα 1.2.



Εικόνα 1.1: (επάνω) Μονοπάτια εισόδου στο κύτταρο. Τα μόρια μεγάλου μεγέθους εισέρχονται στο κύτταρο με φαγοκυττάρωση, ενώ το εξωκυττάριο υγρό εισέρχεται με μακροπινοκύτωση. Και οι δύο διαδικασίες εξαρτώνται από την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης. Πολυάριθμα φορτία της κυτταρικής μεμβράνης ενδοκυττάρωνονται με τη βοήθεια μηχανισμών που εξαρτώνται ή όχι από την πρωτεΐνη κλαθρίνη και την GTPάση *Dynamin*. Τα περισσότερα από τα φορτία παραδίδονται στο πρώιμο ενδόσωμα μέσω καλυμμένων κυστιδίων (*coated vesicles*) ή μέσω σωληνοειδών ενδιάμεσων διαμερισμάτων, γνωστά ως *CLIC* (*Clathrin and Dynamin independent carrier*) ή *GEIC* (*Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartment*). **(κάτω) Προτεινόμενη ταξινόμηση των μηχανισμών ενδοκυττάρωσης⁶.**

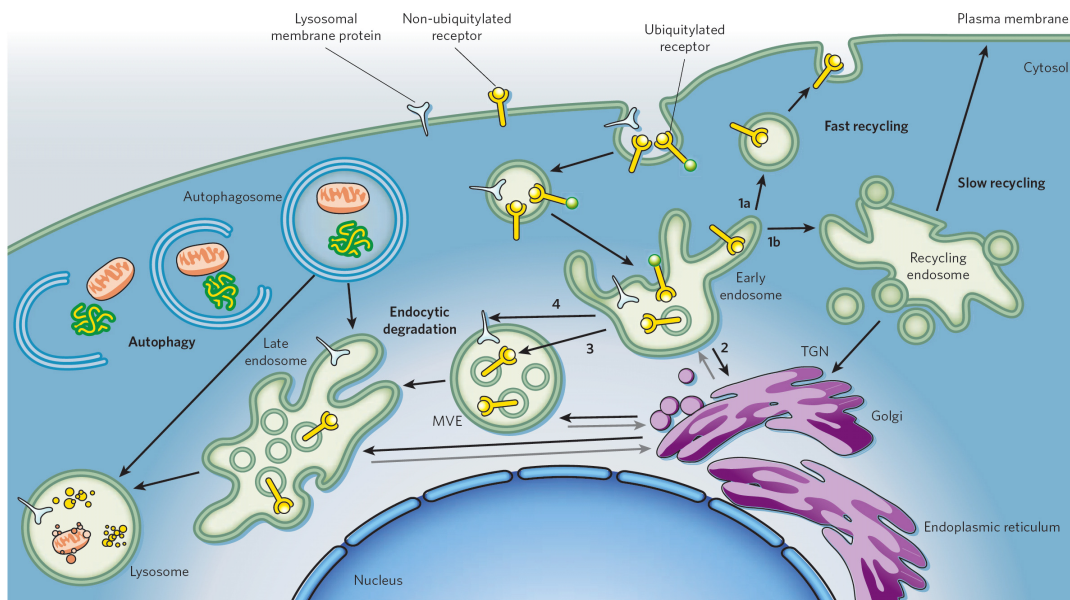
Η ανεξάρτητη από την πρωτεΐνη κλαθρίνη ενδοκυττάρωση (CIE, Clathrin-independent endocytosis), τις περισσότερες φορές είναι ευαίσθητη και επηρεάζεται από την έλλειψη χοληστερόλης. Ο ιός SV40 (Simian virus 40), η B υπομονάδα της τοξίνης της χολέρας (cholera-toxin B subunit), οι GPI-αγκυροβολημένες πρωτεΐνες (Glycosyl phosphatidylinositol-anchored), ο β υποδοχέας της ιντερλευκίνης-2 (interleukin-2 receptor-β), η E-cadherin και πολλές άλλες πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης^{8 6}, εισέρχονται στο κύτταρο ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης κλαθρίνης. Τα CIE μονοπάτια διαχωρίζονται περαιτέρω σε εκείνα στα οποία η πρωτεΐνη Dynamin διαδραματίζει ή όχι ρόλο και σε εκείνα που εξαρτώνται από πρωτεΐνες όπως η Caveolin, η Arf6, η RhoA ή η cdc42 (Εικ.1.1, πάνω και κάτω). Οι γνώσεις μας πάνω στα ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη κλαθρίνη μονοπάτια είναι περιορισμένες και ο ρόλος, καθώς και τα χαρακτηριστικά τους, δεν έχουν απόλυτα αποσαφηνιστεί⁹. Επίσης, υπάρχουν ειδικά CIE μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, όπως η φαγοκυττάρωση (phagocytosis) και η μακροπινοκύτωση (macropinocytosis), που εσωτερικεύουν μεγάλο μεγέθους σωματίδια ή μεγάλου όγκου εξωκυττάριο υγρό, αντίστοιχα.

Στις περισσότερες από τις παραπάνω περιπτώσεις, το φορτίο μέσω διαφόρων κυστιδίων (CCV, Clathrin coated vesicles), Caveosomes, CLIC (Clathrin and dynamin independent carrier) ή GEEC (Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartment)) (Εικ.1.1, πάνω), μεταφέρεται στο πρώιμο ενδόσωμα και από εκεί στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση ή επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω των μονοπατιών της ανακύκλωσης (Εικ.1.2).

1.1.3.2 Ενδοκυτταρική διακίνηση

Οι ενδοκυτταρικές μεμβράνες επιτρέπουν τη διαμερισματοποίηση του κυττάρου σε διακριτά κυστιδιακά διαμερίσματα, στα οποία επιτελούνται πολλές και διαφορετικές λειτουργίες. Τα διάφορα κυστίδια δημιουργούν στο εσωτερικό του κυττάρου οργανίδια με διαφορετική πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύσταση και με καθορισμένη λειτουργία. Τα διαμερίσματα αυτά βρίσκονται σε μια δυναμική κατάσταση επικοινωνίας, που σημαίνει ότι συνεχώς ανταλλάσσουν πρωτεϊνικό ή λιπιδιακό υλικό με την κυτταρική μεμβράνη ή άλλα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (Εικ.1.2)¹⁰. Η μεταφορά συστατικών από ένα διαμέρισμα στο άλλο, επιτυγχάνεται με την εκβλάστηση ενός κυστιδίου από ένα

οργανίδιο, τη μεταφορά του πάνω στις ράγες του κυτταροσκελετού και τη σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη ενός άλλου οργανιδίου-δέκτη (Εικ.1.10).



Εικόνα 1.2: Ενδοκυτταρική διακίνηση. Μembrανικές πρωτεΐνες και υποδοχείς εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση και στη συνέχεια μεταφέρονται στα πρώιμα ενδοσώματα. Το φορτίο που φτάνει στα πρώιμα ενδοσώματα διαλέγεται και μεταφέρεται σε μετέπειτα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Κάποιοι υποδοχείς επιστρέφουν στη μεμβράνη άμεσα (βήμα 1a) ή έμμεσα (βήμα 1b), μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Άλλες πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα υποδοχείς λυσοσωματικών ενζύμων ή κάποιες πρωτεϊνικές τοξίνες, μεταφέρονται στην συσκευή trans-Golgi (βήμα 2). Διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως ενεργοποιημένοι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, εγκλωβίζονται σε ενδοαυτικά κυστίδια (ILV) και μέσω των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων (MVE), μεταφέρονται στο όψιμο ενδόσωμα και το λυσόσωμα (βήμα 3). Σε αντίθεση, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες των λυσοσωμάτων φτάνουν στον προορισμό τους μέσω της εξωτερικής μεμβράνης των MVE (βήμα 4). Τα συστατικά των αυτοφαγοσωμάτων (autophagosome) αποικοδομούνται επίσης στα λυσοσώματα ¹¹.

Όσον αφορά τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, η ενδοκυτταρική μεμβρανική διακίνηση επιτελεί τρεις σημαντικές λειτουργίες. **Πρώτον**, ελέγχει τα επίπεδα των υποδοχέων στο κύτταρο που είναι διαθέσιμα για πρόσδεση με τους συνδέτες, μέσω ενδοκυττάρωσης και λυσοσωματικής αποικοδόμησης. **Δεύτερον**, ρυθμίζει τη διάρκεια που οι συνδέτες βρίσκονται σε επαφή με τους αντίστοιχους υποδοχείς και **τρίτον**, ρυθμίζει την κυτταρική εντόπιση των ενεργοποιημένων υποδοχέων σε συγκεκριμένα

ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, επιτρέποντας έτσι τη μετάδοση του σήματος σε άλλα δευτερεύοντα αγγελιοφόρα μόρια (υποενότητα 1.3.1.2).

Το πρώτο διαμέρισμα που συναντούν οι πρωτεΐνες-υποδοχείς (φορτίο), μετά την ενδοκυττάρωσή τους από την κυτταρική μεμβράνη, είναι το **πρώιμο ενδόσωμα** (Early endosome) (Εικ.1.2). Σε αυτό, γίνεται η επιλογή και ο διαχωρισμός του 'φορτίου' προς δυο διακριτούς προορισμούς. Ο πρώτος, ανακυκλώνει-επιστρέφει το φορτίο στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των **ενδοσωμάτων ανακύκλωσης** (Recycling endosomes), ενώ ο δεύτερος, μέσω της διαδικασίας σχηματισμού **πολυκυστιδιακών σωματίων ή ενδοσωμάτων** (MVB ή MVE, Multivesicular bodies or endosomes), οδηγεί το φορτίο στα **όψιμα ενδοσώματα** (Late endosomes) και στα **λυσosώματα** (Lysosomes), με στόχο την αποικοδόμησή του ^{12 13} (Εικ.1.2). Επιπρόσθετα, το πρώιμο και όψιμο ενδόσωμα βρίσκονται σε μια δυναμική επικοινωνία, ανταλλάσσοντας συστατικά με το δίκτυο μεμβρανών της trans-Golgi συσκευής (TGN, trans-Golgi network) (Εικ.1.2). Αναλυτική περιγραφή των συστατικών αυτών των μεμβρανικών διαμερισμάτων πραγματοποιείται στην υποενότητα 1.3.

1.1.4 Ρυθμιστές της ενδοκυττάρωσης και της ενδοκυτταρικής διακίνησης

Τόσο η ενδοκυττάρωση, όσο και η ενδοκυτταρική διακίνηση ρυθμίζονται σε υψηλό βαθμό από πρωτεΐνες και λιπίδια που βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ή των μεμβρανικών κυστιδίων. Στη συνέχεια, παραθέτονται κάποιες γενικές πληροφορίες αυτών των ρυθμιστικών μορίων, ενώ έμφαση δίνεται στην αντίστοιχη υποενότητα κάθε φορά.

1.1.4.1 Φωσφωινοσίδια

Τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης (Phosphoinositides) είναι φωσφορυλιωμένα παράγωγα του λιπιδίου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PtdIns), τα οποία διακοσμούν συγκεκριμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης και των μεμβρανών των κυστιδίων διακίνησης (Εικ.1.3) ¹⁴. Η φυσιολογική τους σημασία είναι μεγάλη. Τα λιπίδια αυτά, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που φέρουν κατάλληλες δομικές περιοχές και εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, ο κυτταρικός

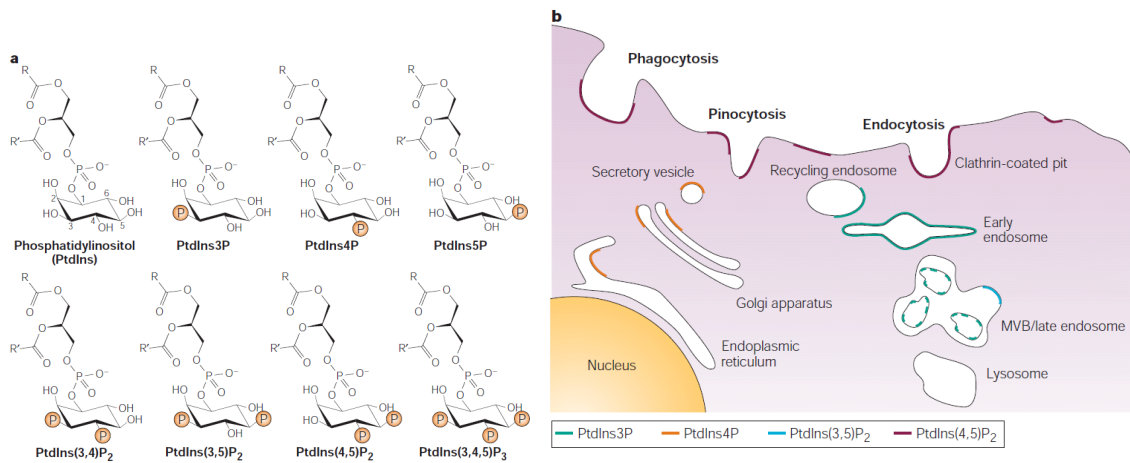
θάνατος, η κινητικότητα των κυττάρων, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η κυστιδιακή διακίνηση (vesicle trafficking).

Η παραγωγή και η αποικοδόμηση των φωσφωνοσιδίων σε συγκεκριμένες μεμβρανικές περιοχές, ρυθμίζει, τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο, τη συσσώρευση ή την απελευθέρωση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν¹⁵. Η παραγωγή και η μετατροπή τους ρυθμίζεται σε υψηλό βαθμό από τη δράση κινασών (lipid-kinases) και φωσφατασών (lipid-phosphatases). Στο κεφάλαιο του πρώιμου ενδοσώματος (1.3.1.1) αναλύεται αναλυτικά ο μηχανισμός δημιουργίας του PtdIns(3)P λιπιδίου. Στην εικόνα 1.3, φαίνεται η κατανομή τους στα διάφορα μεμβρανικά διαμερίσματα.

Το PtdIns(4,5)P₂ εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και παίζει ρόλο σε διαδικασίες ενδοκυττάρωσης, φαγοκυττάρωσης και μακροπυκνύτωσης¹⁶. Για παράδειγμα, στο μονοπάτι της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης, το PtdIns(4,5)P₂ αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες AP2, Dynamin, Epsin και Dab2. Με τον τρόπο αυτό, το PtdIns(4,5)P₂ ρυθμίζει τόσο τα πρώιμα, όσο και τα μετέπειτα στάδια σχηματισμού των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων (CCP) (υποενότητα 1.2)^{17 18}.

Το PtdIns(3)P λιπίδιο, είναι άφθονο στις μεμβράνες του πρώιμου ενδοσώματος και των ενδοαυλικών κυστιδίων (ILV, Intraluminal vesicles) των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων (MVE) (Εικ.1.3) (υποενότητα 1.3.3.1). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ενδοσωμάτων και στην εκβλάστηση των ILV στα MVE^{19 20}. Οι δομικές περιοχές που δεσμεύουν το PtdIns(3)P λιπίδιο είναι οι FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1), PX (Phox-homology), PH (Pleckstrin-homology), ENTH (Epsin N-terminal-homology) και άλλες. Ο κατάλογος των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο PtdIns(3)P λιπίδιο, μέσω των παραπάνω περιοχών, είναι μεγάλος και περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφολιπάσες, πρωτεΐνες ικρίωματα (scaffold proteins), πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και πολλές άλλες πρωτεΐνες²¹. Περισσότερες από 30 πρωτεΐνες στον άνθρωπο περιέχουν την FYVE περιοχή και οι περισσότερες από αυτές είναι ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής διακίνησης. Κάποιες από αυτές αναπτύσσονται στην ενότητα 1.3.1.1.

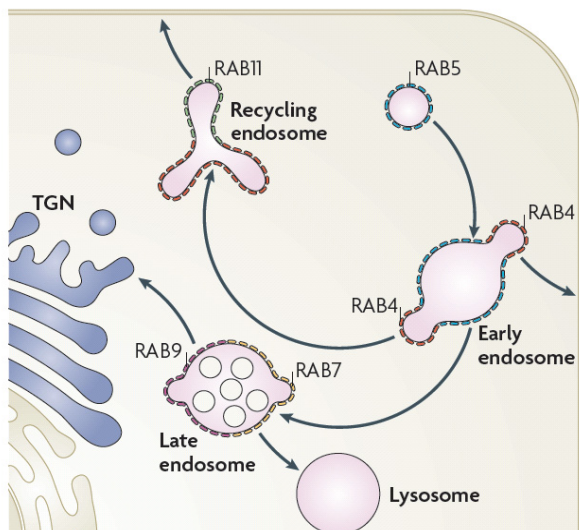
Το PtdIns(3,5)P₂ λιπίδιο εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των πολυκυστιδιακών σωματιδίων και στο όψιμο ενδόσωμα. Τέλος, το PtdIns(4)P λιπίδιο είναι κυρίαρχο στο δίκτυο trans-Golgi (TGN) και οι πρωτεΐνες που προσελκύει, παίζουν ρόλο στην κυστιδιακή διακίνηση από το TGN προς την κυτταρική μεμβράνη.



Εικόνα 1.3: Τα λιπίδια της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης και η κατανομή τους στο κύτταρο. (α) Το λιπίδιο της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PtdIns) μπορεί να φωσφορυλιωθεί στην 3, 4 και 5 θέση, δημιουργώντας 7 διαφορετικά παράγωγα (PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P, PtdIns(3,4)P, PtdIns(3,5)P, PtdIns(4,5)P και PtdIns(3,4,5)P). (β) Τα παράγωγα του λιπιδίου της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (φωσφοϊνσιτίδια) εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές ή οργανίδια μέσα στο κύτταρο. Το PtdIns3P εντοπίζεται κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα και τα ενδοαυλικά κυστίδια των MVB, το PtdIns(4,5)P εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, το PtdIns4P στη συσκευή Golgi και το PtdIns(3,5)P στην εξωτερική μεμβράνη των MVB και των όψιμων ενδοσωμάτων¹⁶.

1.1.4.2 Οι Rab πρωτεΐνες

Μια κύρια κατηγορία πρωτεϊνών των κυστιδίων διακίνησης είναι οι πρωτεΐνες Rab (Ras-associated binding), οι οποίες εναλλάσσονται μεταξύ μιας GTP-προσδεδεμένης, ενεργούς και μιας GDP-προσδεδεμένης, ανενεργούς μορφής. Οι πρωτεΐνες Rab έχουν συγκεκριμένη κυστιδιακή κατανομή και συχνά θεωρούνται ως δείκτες των διαμερισμάτων που τις φέρουν (Εικ.1.4 και 1.11)²². Η ανταλλαγή του GDP με το GTP καταλύεται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών GEF (Guanine nucleotide exchange factors), ενώ η υδρόλυση του GTP σε GDP διευκολύνεται από την εγγενή δραστικότητα GTPάσης των πρωτεϊνών Rab και καταλύεται από τις πρωτεΐνες GAP (GTPase-activating proteins). Στην ενεργή τους μορφή εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες, από όπου αλληλεπιδρούν, προσελκύνοντας πληθώρα πρωτεϊνών, γνωστών ως Rab τελεστών (effectors)²³. Έχει αποδειχθεί ότι με τη βοήθεια των τελεστών τους, οι πρωτεΐνες Rab επιτελούν πολλαπλές λειτουργίες, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο σε γεγονότα ενδοκυτταρικής μεμβρανικής διακίνησης (trafficking), όπως η κυστιδιακή εκβλάστηση (budding), κινητικότητα (motility), πρόσδεση (tethering) και σύντηξη (fusion)^{22 24}.



Εικόνα 1.4: Ενδοκυτταρικά οργανίδια και 'Rab περιοχές'. Τα πρώιμα ενδοσώματα περιέχουν διακριτές περιοχές, πλούσιες στις πρωτεΐνες Rab5 (μπλε) και Rab4 (κόκκινο), οι οποίες εμπλέκονται στη σύντηξη των ενδοσωμάτων και την ενδοκυτταρική ανακύκλωση, αντίστοιχα. Τα ενδοσώματα ανακύκλωσης περιέχουν περιοχές πλούσιες στις πρωτεΐνες Rab4 (κόκκινο) και την Rab11 (πράσινο), οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυστιδιακή διακίνηση προς την κυτταρική μεμβράνη. Τα όψιμα ενδοσώματα φέρουν περιοχές πλούσιες στις πρωτεΐνες Rab7 (κίτρινο) και Rab9 (μωβ), οι οποίες μεσολαβούν τη διακίνηση των κυστιδίων προς το λυσόσωμα και την *trans-Golgi* συσκευή, αντίστοιχα²⁴.

Πιο αναλυτικά, η μεμβρανική διακίνηση από ένα μεμβρανικό διαμέρισμα σε ένα άλλο, πραγματοποιείται με μια διαδικασία τεσσάρων σταδίων, η οποία περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός κυστιδίου από την μεμβράνη του οργανιδίου-δότη, τη μεταφορά του κυστιδίου προς το επιθυμητό διαμέρισμα, μέσω των διαδρομών που σχηματίζονται από τους μικροσωληνίσκους και την ακτίνη, την πρόσδεση του κυστιδίου στη μεμβράνη του οργανιδίου-δέκτη και τη σύντηξη των δύο μεμβρανών (Εικ.1.10)²². Τα παραπάνω στάδια ρυθμίζονται σε υψηλό βαθμό, διασφαλίζοντας ότι τα κυστίδια που δημιουργούνται από ένα διαμέρισμα παραδίδονται στο σωστό τελικό προορισμό. Παρόλο που η βιβλιογραφία δεν είναι ξεκάθαρη, έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Rab μέσω των τελεστών τους συμμετέχουν ενεργά, παρέχοντας εξειδίκευση στις παραπάνω λειτουργίες. Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών Rab στα κύτταρα των θηλαστικών αντανακλά και την πολυπλοκότητα των διαδικασιών της κυστιδιακής μεταφοράς διαμέσω των διαφορετικών διαμερισμάτων. Πιστεύεται πως κάθε Rab είναι ειδική για κάθε τύπο κυστιδίου. Η Rab5 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα CCP (Clathrin coated pit) και το

πρώιμο ενδόσωμα^{25 26}. Η Rab7, εντοπίζεται στο όψιμο ενδόσωμα και είναι σημαντική για την κυστιδιακή διακίνηση έπειτα από το σχηματισμό των πολυκυστιδιακών σωματίων²⁷. Από την άλλη μεριά, οι Rab4 και Rab11 ρυθμίζουν τη μεταφορά των κυστιδίων από το πρώιμο ενδόσωμα προς την κυτταρική μεμβράνη (υποενότητα 1.3.2).

Οι Rab GTPάσες δεσμεύονται αντιστρεπτά στις μεμβράνες, με την προσθήκη ομάδων γερανυλίου-γερανυλίου (geranyl-geranyl) σε ένα ή δύο κατάλοιπα κυστεΐνης του αμινοτελικού τους άκρου, μια τροποποίηση σημαντική για το ρόλο τους στη μεμβρανική διακίνηση²⁸. Τέλος έχει προταθεί, ότι οι πρωτεΐνες Rab μπορεί να κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου κυστιδίου, δημιουργώντας 'Rab περιοχές' με διαφορετική λειτουργία η κάθε μια^{29 10} (Εικ.1.4).

1.2 ΚΛΑΘΡΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

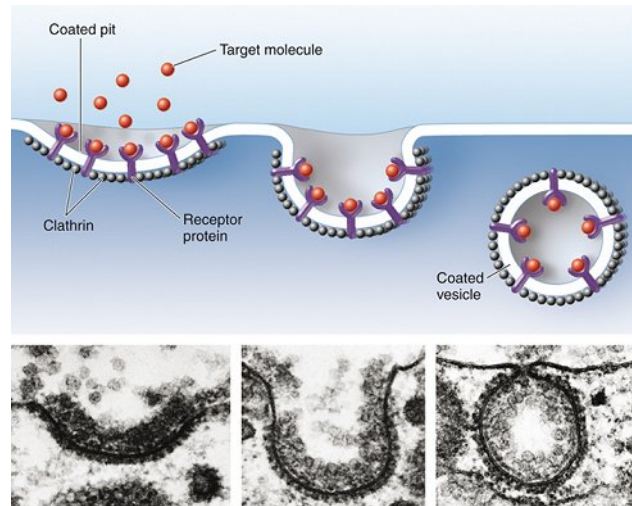
Η κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση (CDE) είναι ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός εσωτερίκευσης μορίων στο κύτταρο και χρησιμοποιείται για την είσοδο θρεπτικών ουσιών, παθογόνων, πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, αυξητικών παραγόντων, υποδοχέων και άλλων. Περισσότεροι από 50 διαφορετικοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων χρησιμοποιούν την CDE για την είσοδο τους μέσα στο κύτταρο, μια διαδικασία που μπορεί να είναι συνεχής (constitutive) ή επαγόμενη (induced) από κάποιο ερέθισμα.

Οι γνώσεις μας πάνω στους μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης των διαφόρων υποδοχέων είναι περιορισμένες και συχνά οι βιβλιογραφικές αναφορές αντικρούουν η μία την άλλη. Ωστόσο, ο ρόλος της πρωτεΐνης κλαθρίνης στο σχηματισμό των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων στο παραπάνω μονοπάτι είναι αδιαμφισβήτητος. Η μεγάλη ποικιλία των φορτίων που χρησιμοποιούν το μονοπάτι της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης αντικατοπτρίζει και τη μεγάλη ποικιλία των ρυθμιστικών παραγόντων, πρωτεϊνών-προσαρμοστών (protein-adaptors), λιπιδίων, μοτίβων, τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων που παίζουν ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία³⁰.

1.2.1 Μηχανισμοί δημιουργίας κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη

Όπως προαναφέρθηκε, στο κλαθρινο-εξαρτώμενο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης (CDE) κυρίαρχο ρόλο παίζει η τρισκελής πρωτεΐνη κλαθρίνη. Η κλαθρίνη πολυμερίζεται και σχηματίζει ένα πολυγωνικό δίκτυο στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης του κυττάρου. Το δίκτυο αυτό, μέσω ενός πολύπλοκου και καλά ρυθμιζόμενου μηχανισμού, προκαλεί την εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης (**CCP, Clathrin coated pit, κλαθρινο-καλυμμένες κοιλότητες**), από την οποία τελικά εκβλασταίνει και αποκόπτεται ένα κυστίδιο, το οποίο είναι καλυμμένο με την πρωτεΐνη κλαθρίνη (**CCV, Clathrin coated vesicle, κλαθρινο-καλυμμένα κυστίδια**) (Εικ.1.5). Τα κυστίδιο αυτό, μετά την αποκάλυψη (αποβολή περιβλήματος κλαθρίνης) (uncoated vesicle) συντήκεται με τα πρώιμα ενδοσώματα.

Στη διαδικασία δημιουργίας των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων, διάφορες πρωτεΐνες-προσαρμοστές (AP2, Epsin, β -arrestins, Dab2, numb και πολλές άλλες) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς συνδέονται ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη κλαθρίνη, με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, με λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και με υποδοχείς. Για παράδειγμα, η β -arrestin αλληλεπιδρά με τους φωσφορυλιωμένους υποδοχείς GPCR (G protein-coupled receptors), το PtdIns(4,5)P₂ λιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης και τις πρωτεΐνες κλαθρίνη και AP2 (Adaptor protein-2). Η πρωτεΐνη AP2 είναι απαραίτητη και για τη συνεχόμενη ενδοκυττάρωση του υποδοχέα της τρανσφερίνης³¹. Ωστόσο, στην περίπτωση του EGFR, παρόλο που ο υποδοχέας συνδέεται με την πρωτεΐνη AP2 και παρόλο που η πρωτεΐνη AP2 είναι σημαντική στη συναρμολόγηση του δικτύου κλαθρίνης, ο ρόλος της AP2 για την ενδοκυττάρωση του EGFR δεν είναι απόλυτα σαφής^{32 33 30}. Άλλες πρωτεΐνες, όπως η Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), η Epsin, η Eps15 (EGFR-pathway substrate 15) φαίνεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο^{34 35}. Στη συνέχεια αναπτύσσεται ο κλαθρινο-εξαρτώμενος μηχανισμός ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα EGFR, που αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο³⁶.



Εικόνα 1.5: Κοιλότητα και κυστίδιο καλυμμένο από την πρωτεΐνη κλαθρίνη. Σχηματική απεικόνιση και φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της καλυμμένης με κλαθρίνη κοιλότητας (CCP, Clathrin coated pit) στην κυτταρική μεμβράνη και της μετέπειτα σταδιακής ωρίμανσής της σε κυστίδιο καλυμμένο με την πρωτεΐνη κλαθρίνη (CCV, Clathrin coated vesicle) (http://www.zoology.ubc.ca/~berger/b200sample/unit_8_protein_processing/clathrin_pits.htm).

Η σύνδεση του EGF στον υποδοχέα EGFR στην κυτταρική μεμβράνη έχει σαν αποτέλεσμα τον διμερισμό³⁷, την ενεργοποίηση της εγγενούς δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης και την αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων. Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης λειτουργούν σαν θέσεις πρόσδεσης διαφόρων πρωτεϊνών με SH2 (Src homology 2) και PTB (Phosphotyrosine-binding domains) δομικές περιοχές. Μια από αυτές είναι η πρωτεΐνη Grb2, η οποία αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα και βοηθά στην προσέλκυση της πρωτεΐνης Cbl (Casitas B-lineage lymphoma). Η Cbl, που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα EGFR είτε άμεσα (μέσω της SH2 δομικής περιοχής), είτε μέσω της πρωτεΐνης Grb2, είναι μια E3 λιγάση ουβικιτίνης με RING δομική περιοχή, που προσελκύεται στον EGFR υποδοχέα μετά από επαγωγή με EGF. Η πρωτεΐνη Cbl προκαλεί την ουβικιτίνωση των υποδοχέων σε πολλαπλές θέσεις ή K63-συνδεόμενη πολυουβικιτίνωση^{38 39} (υποενότητα 1.2.2.2 και Εικ.1.7). Παρόλο που η ουβικιτίνωση φαίνεται να μην διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα⁴⁰, υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι σημαντική για τη προσέλκυση του EGFR στα καλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια⁴¹. Ωστόσο, όπως θα δούμε στη συνέχεια, είναι απαραίτητη για τη διαλογή των υποδοχέων για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα (υποενότητα 1.2.2.2).

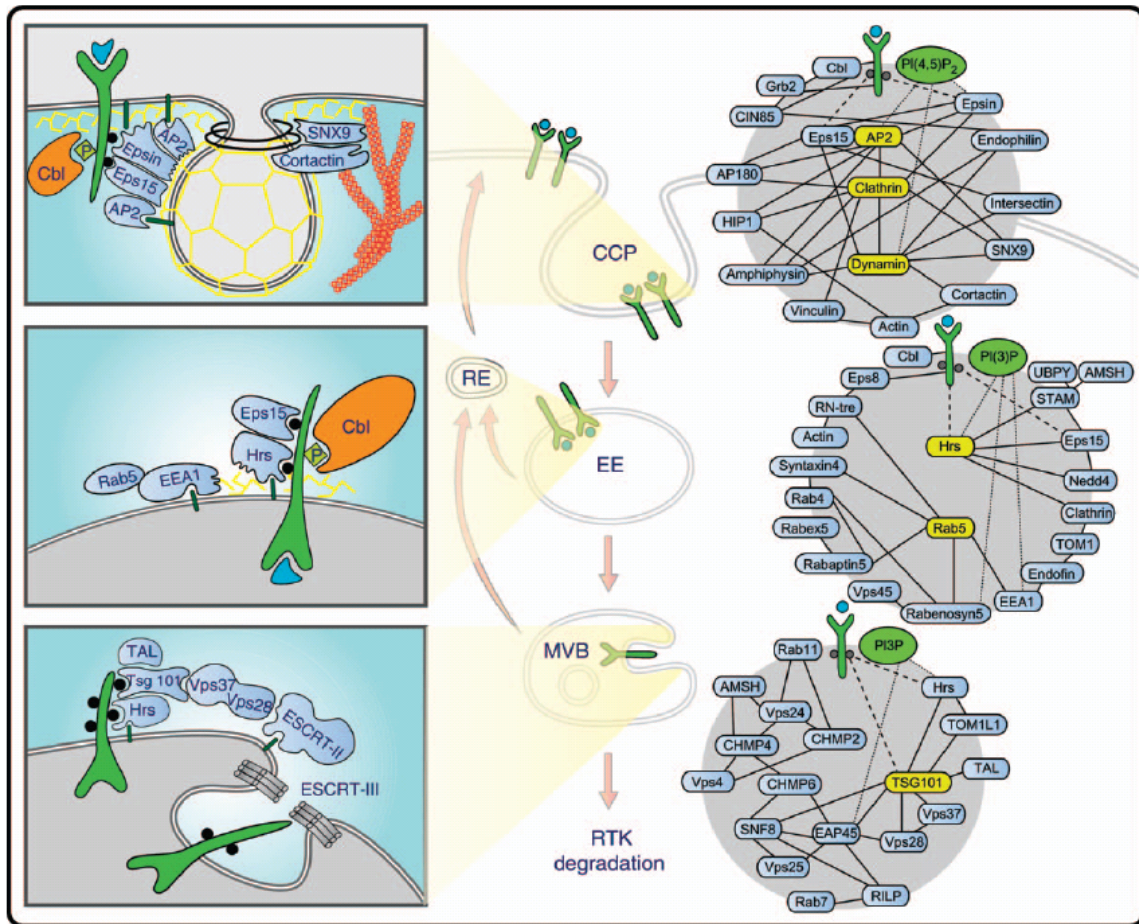
Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης Cbl που καταργούν την ενεργότητά της ως λιγάση ουβικιτίνης, αναστέλλουν την ουβικιτίνωση και την αποδόμηση του υποδοχέα EGFR⁴².

Η ουβικιτίνη λειτουργεί ως θέση πρόσδεσης πρωτεϊνών που περιέχουν UIM (Ubiquitin interaction motif) ή UBA (Ubiquitin associated), όπως οι Eps15 και Epsin. Στην κυτταρική μεμβράνη, η πρωτεΐνη Eps15 αλληλεπιδρά με τους EGFR υποδοχείς, την πρωτεΐνη κλαθρίνη, την Grb2 και την AP2, εντοπίζεται στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και φωσφορυλιώνεται μετά από επαγωγή με EGF⁴³. Αποσιώπηση του γονιδίου της *Eps15* αναστέλλει την ενδοκυττάρωση τόσο του EGF όσο και της τρανσφερίνης. Πέρα από τις παραπάνω πρωτεΐνες, η Eps15 αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη Epsin, μια πρωτεΐνη που βοηθά στην καμπύλωση της μεμβράνης και το σχηματισμό των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων⁴⁴.

Ο σχηματισμός λοιπόν διαφόρων συμπλεγμάτων, τόσο με τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, όσο και με το PtdIns(4,5)P₂ λιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης, βοηθάει στην καμπύλωση της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας και στο σχηματισμό της καλυμμένης με κλαθρίνη κοιλότητας (CCP). Καθώς συνεχίζει ο πολυμερισμός της κλαθρίνης και η συσσώρευση πρωτεϊνικών συμπλόκων, η εγκόλπωση της μεμβράνης βαθαίνει και τελικά σχηματίζεται ένα κυστίδιο που εξωτερικά καλύπτεται από την πρωτεΐνη κλαθρίνη (CCV). Η τελική εκτομή του κυστιδίου από την κυτταρική μεμβράνη καταλύεται από την πρωτεΐνη Dynamin. Η πρωτεΐνη αυτή πολυμερίζεται γύρω από το 'λαιμό' του νεοσυντιθέμενου κυστιδίου και με τη δράση της ως GTPάση, προκαλεί υδρόλυση του GTP, εκτομή και απελευθέρωση του κυστιδίου στο κυτταρόπλασμα. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί, πως με παρόμοιο μηχανισμό, αλλά διαφορετικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (COP I, II), πραγματοποιείται και η δημιουργία καλυμμένων κυστιδίων και από άλλα οργανίδια, όπως για παράδειγμα από τη trans-Golgi συσκευή ή το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Συνειδητοποιούμε λοιπόν, πως ο κατάλογος των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση του EGFR ή άλλων υποδοχέων είναι αρκετά μεγάλος. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται πληθώρα τροποποιήσεων και ποικιλία δομικών περιοχών, που μεσολαβούν λιπιδιακές και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Το πρωτεϊνικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων (Interactome) που δημιουργείται και μεσολαβεί την ενδοκυττάρωση του EGFR ή άλλων RTK (Receptor tyrosine kinase) περιγράφεται στην

εικόνα 1.6 (πάνω δεξιά) με τις πρωτεΐνες AP2, κλαθρίνη και Dynamin να διαδραματίζουν κομβικό ρόλο¹⁸.



Εικόνα 1.6: Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Interactome) που σχηματίζονται κατά την κλαθρίνο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση, την κυστιδιακή διακίνηση στο πρώιμο ενδόσωμα και τη διαλογή για αποικοδόμηση των υποδοχέων RTK, καθώς και το σχηματισμό των ενδοσουλικών κυστιδίων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες με καθοριστική σημασία, ενώ με πράσινο περιγράφονται τα λιπίδια που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες¹⁸.

1.2.2 Σήματα διαλογής για την ενδοκυττάρωση και την ενδοκυτταρική διακίνηση

1.2.2.1 Μοτίβα

Η ενδοκυττάρωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών από την κυτταρική μεμβράνη, η διακίνηση, καθώς και η στόχευση πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα ρυθμίζεται από την ύπαρξη διαφόρων συντηρημένων μοτίβων. Τα μοτίβα αυτά βρίσκονται, κυρίως, στην κυτταροπλασματική πλευρά των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών-υποδοχέων και διαχωρίζονται ανάλογα με τη σύσταση των αμινοξέων, σε

εκείνα που φέρουν στην αλληλουχία τους ένα σημαντικό κατάλοιπο τυροσίνης (NPXY, YXX Φ , DPXXY, NPXXY) και σε εκείνα που φέρουν κατάλοιπα ισολευκινών ([D/E]XXXL[L/I] ή DXXLL) (X οποιοδήποτε αμινοξύ και Φ αμινοξύ με υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα). Τα μοτίβα αυτά αναγνωρίζονται από διάφορες πρωτεΐνες του ενδοκυτταρικού μονοπατιού και κατευθύνουν τις πρωτεΐνες που τα φέρουν στους τελικούς τους προορισμούς. Οι αλληλουχίες αυτές ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες που εισέρχονται μέσα στο κύτταρο, μέσω των μονοπατιών της ενδοκυττάρωσης, όσο και τις πρωτεΐνες που εξέρχονται μέσω των μονοπατιών της βιοσυνθετικής και της εκκριτικής οδού. Επιπρόσθετα, τα μοτίβα αυτά ρυθμίζουν τη μεταφορά πρωτεϊνών στα διάφορα μεμβρανικά διαμερίσματα του ενδοκυτταρικού μονοπατιού, όπως για παράδειγμα από τη συσκευή Golgi στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα ⁴⁵.

1.2.2.1.1 Το μοτίβο τύπου NPXY

Το μοτίβο τύπου NPXY συναντάται σε διάφορους υποδοχείς, όπως για παράδειγμα στον υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDLR, Low density lipoprotein receptor), στον υποδοχέα της ινσουλίνης, στον EGFR ή σε άλλες πρωτεΐνες, όπως στις beta-1 integrin και APP (β -amyloid precursor protein). Το μοτίβο αυτό φαίνεται να είναι μεταλλαγμένο σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστεριναιμία ⁴⁶, γεγονός που καταργεί την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα LDLR. Το μοτίβο αυτό, αλληλεπιδρά με την κλαθρίνη ή με άλλους προσαμοστές (AP2, Dab2) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του φορτίου για ενδοκυττάρωση και τη μετέπειτα στόχευση του στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα ⁴⁷. Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι αρχικά, το μοτίβο αυτό προσελκύει στην κυτταρική μεμβράνη την πρωτεΐνη AP2, η οποία στη συνέχεια προσδένει την πρωτεΐνη κλαθρίνη, οδηγώντας στην ενδοκυττάρωση των υποδοχέων. ⁴⁸.

1.2.2.1.2 Το μοτίβο τύπου YXX Φ

Το YXX Φ μοτίβο παρουσιάζει διπλή εξειδίκευση, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο τόσο στην ενδοκυττάρωση μεμβρανικών πρωτεϊνών, την κυστιδιακή τους μεταφορά και τη στόχευση τους στο λυσοσώμα, όσο και στο εκκριτικό μονοπάτι. Βρίσκεται στην κυτταροπλασματική περιοχή διαφόρων διαμεμβρανικών υποδοχέων, όπως για παράδειγμα στον υποδοχέα της τρανσφερίνης και στον υποδοχέα των

ασιαλογλυκοπρωτεϊνών ή σε πρωτεΐνες του λυσοσώματος όπως είναι η Lamp1/2 (Lysosomal associated membrane protein) (Εικ.1.2). Το μοτίβο αυτό διαμεσολαβεί την πρόσδεση των πρωτεϊνών που το φέρουν με τις πρωτεΐνες AP1, -2, -3 και -4. Το κατάλοιπο της τυροσίνης (Y) του μοτίβου YXX Φ είναι συντηρημένο και δεν μπορεί να αντικατασταθεί από κάποιο άλλο αρωματικό αμινοξύ. Τα αμινοξέα X καθώς και το υδρόφοβο αμινοξύ, θεωρείται πως προσφέρουν εξειδίκευση στην πρόσδεση του μοτίβου αυτού με άλλες πρωτεΐνες του ενδοκυττάριου μονοπατιού ⁴⁸.

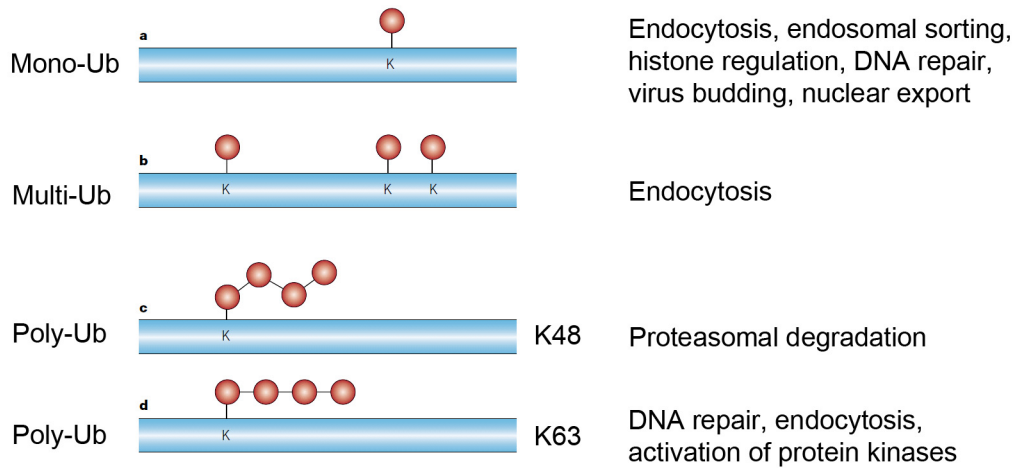
1.2.2.1.3 Μοτίβα αλληλουχιών βασισμένα σε κατάλοιπα λευκίνης

Τα μοτίβα αλληλουχιών που περιέχουν δύο κατάλοιπα λευκίνης [D/E]XXXL[L/I] ή DXXLL (Di-leucine based sequence motifs) εντοπίζονται στους υποδοχείς GABA, GLUT 8, mannose-6-phosphate, CD3/4, VAChT και πολλούς άλλους. Οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες-προσαρμοστές, παίζοντας ρόλο σε διαδικασίες ενδοκυττάρωσης και κυστιδιακής μεταφοράς μεμβρανικών πρωτεϊνών ή/και μεμβρανικών υποδοχέων. Συνήθως πριν από τα κατάλοιπα λευκινών (LL), βρίσκονται πολωμένα κατάλοιπα και αμινοξέα με αρνητικό φορτίο, όπως για παράδειγμα το ασπαρτικό οξύ (D), το γουταμικό οξύ (E) ή η σερίνη (S). Τα μοτίβα βασισμένα σε λευκίνη (LL) αλληλεπιδρούν με τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών της AP2 και βοηθούν στη συσσώρευση πρωτεϊνών σε κοιλότητες ή σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη. Επιπρόσθετα τα μοτίβα αυτά, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με πρωτεΐνες AP ή με τις πρωτεΐνες GGA (Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF-binding protein), συμμετέχουν στη διακίνηση πρωτεϊνών ανάμεσα στη συσκευή του trans-Golgi και τα ενδοσώματα ^{49 48}.

1.2.2.2 Η πρωτεΐνη ουβικιτίνη

Η πρωτεϊνική ουβικιτίνωση (protein ubiquitination) είναι μια αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση, στην οποία το πολυπεπτίδιο της ουβικιτίνης (Ubiquitin) (76 αμινοξέα) προσκολλάται ομοιοπολικά σε πρωτεϊνικά υποστρώματα. Η προσθήκη ουβικιτίνης πραγματοποιείται με το σχηματισμό ισοπεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην καρβοξυτελική γλυκίνη της ουβικιτίνης και την ε-αμινομάδα των καταλοίπων λυσίνης (K) πρωτεϊνών στόχων. Επιπρόσθετα, οι λυσίνες (π.χ. K48 ή K63 ή άλλες) της πρωτεΐνης

ουβικιτίνης μπορεί να αποτελέσουν υποστρώματα για προσθήκη άλλων ουβικιτινών, διαδικασία που οδηγεί σε πολυμερισμό και στη δημιουργία αλυσίδων πολύ-ουβικιτίνης (poly-ubiquitination).

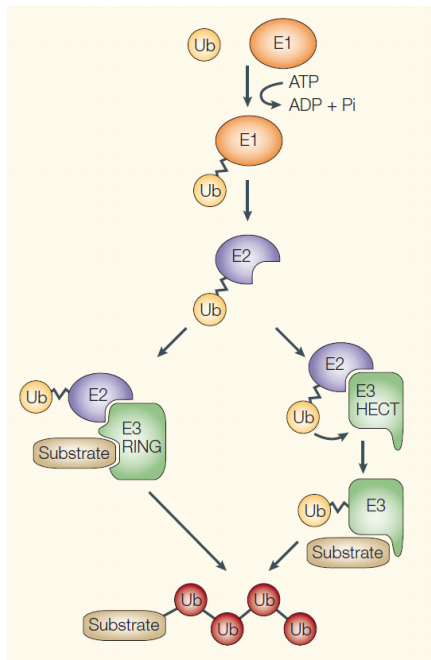


Εικόνα 1.7: Τύποι ουβικιτίνωσης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Η προσθήκη ουβικιτίνης (Ub) μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μία (mono-Ub) (a) ή πολλαπλές (multiple-Ub) (b) λυσίνες (K) των υποστρωμάτων, ή μπορεί να πραγματοποιηθεί πολυμερισμός της ουβικιτίνης και σχηματισμός αλυσίδων (poly-Ub) (c,d) συνδεδεμένες στη λυσίνη (K) 48, 63 ή σε άλλες λυσίνες της πρωτεΐνης ουβικιτίνης. Κάθε μια από αυτές τις τροποποιήσεις διαδραματίζει και διαφορετικό ρόλο ⁵⁰.

Η κύρια γνωστή λειτουργία της ουβικιτίνης είναι να σημαίνει τις πρωτεΐνες για αποικοδόμηση. Ο σχηματισμός αλυσίδας τεσσάρων ή περισσότερων ουβικιτινών που συνδέονται μέσω της K48, λειτουργεί ως σήμα για την πρωτεολυτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από το 26S πρωτεάσωμα (Εικ.1.7). Ωστόσο, μη πρωτεολυτικές λειτουργίες της πολύ-ουβικιτίνωσης, έχουν αναφερθεί. Στην περίπτωση αυτή, ο πολυμερισμός της ουβικιτίνης πραγματοποιείται με σύνδεση μέσω της K63 ή άλλων λυσινών του μορίου της ουβικιτίνης. Επιπρόσθετα, η προσθήκη ουβικιτίνης σε ένα (mono-ubiquitination) ή πολλαπλά (multiple-ubiquitination) κατάλοιπα λυσινών των πρωτεϊνών, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ενδοκυττάρωση, την ενδοκυτταρική διακίνηση, την ενεργότητα των ιστονών, την επιδιόρθωση του DNA και την εκβλάστηση των ιών ⁵¹ (Εικ.1.7).

Η διαδικασία της ουβικιτίνωσης περιλαμβάνει τρία στάδια, κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιείται από διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων-πρωτεϊνών (Εικ.1.8). Αρχικά, το μόριο της ουβικιτίνης ενεργοποιείται με κατανάλωση ενέργειας (ATP) και μεταφέρεται

με θειοεστερικό δεσμό στα E1-ένζυμα ενεργοποίησης (Ubiquitin-activation enzymes). Στη συνέχεια η ουβικιτίνη μεταφέρεται, με το σχηματισμό θειοεστερικού δεσμού, στα E2-ένζυμα σύζευξης (Ubiquitin conjugation enzymes) και τελικά στα υποστρώματα με τη βοήθεια E3-λιγασών (Ubiquitin-ligase enzymes).



Εικόνα 1.8: Το μονοπάτι της ουβικιτίνης. Τρεις τύποι ενζύμων είναι απαραίτητοι για την διαδικασία της ουβικιτίνωσης: ενζυμα ενεργοποίησης (E1) (Ubiquitin-activating enzyme), σύζευξης (E2) (Ubiquitin-conjugating enzyme) και ένζυμα πρωτεϊνικής λιγάσης (E3) (ubiquitin-protein ligase) της ουβικιτίνης. Αρχικά, η ουβικιτίνη (Ub) μεταφέρεται με ATP-εξαρτώμενο τρόπο σε μια κυστεΐνη του ενεργού κέντρου των E1 ενζύμων, με το σχηματισμό θειοεστερικού δεσμού (κίτρινη ουβικιτίνη). Στη συνέχεια, η ουβικιτίνη μεταφέρεται σε μια κυστεΐνη του ενεργού κέντρου των E2 ενζύμων, πάλι με το σχηματισμό θειοεστερικού δεσμού. Τελικά, η ουβικιτίνη με τη βοήθεια E3 λιγασών μεταφέρεται στα υποστρώματα με το σχηματισμό ισοπεπτιδικού δεσμού (κόκκινη ουβικιτίνη)⁵².

Οι E3 λιγάσες της ουβικιτίνης είναι σημαντικές, διότι αναγνωρίζουν τα υποστρώματα και προσφέρουν εξειδίκευση στις διαδικασίες ουβικιτίνωσης. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες E3 λιγασών. Οι τύπου RING (π.χ. Cbl και MDM2), οι τύπου HECT (π.χ. Smurf2, AIP4 και NEDD4) και οι τύπου U box. Οι RING πρωτεΐνες καταλύουν τη μεταφορά της ουβικιτίνης στα υποστρώματα με άμεσο τρόπο, χωρίς το σχηματισμό θειοεστερικού δεσμού μεταξύ της ουβικιτίνης και της RING πρωτεΐνης. Σε αντίθεση στις τύπου HECT E3 λιγάσες, η ουβικιτίνη αρχικά μεταφέρεται στις E3 λιγάσες και στη συνέχεια στα υποστρώματα (Εικ.1.8).

Η σήμανση με ουβικιτίνη σε μία ή πολλαπλές θέσεις, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση και τη μετέπειτα ενδοκυτταρική διακίνηση των υποδοχέων. Οι υποδοχείς υφίστανται ουβικιτίνωση στην κυτταρική μεμβράνη (π.χ. EGFR από Cbl) και η τροποποίηση αυτή βοηθά στην αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διαθέτουν περιοχές σύνδεσης με την ουβικιτίνη, δημιουργώντας ένα δίκτυο πρωτεϊνικών

συμπλόκων απαραίτητο για την ενδοκυττάρωση και την τελική διαλογή των υποδοχέων για αποικοδόμηση. Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν περιοχές σύνδεσης με την ουβικιτίνη ή τις ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες ονομάζονται 'υποδοχείς ουβικιτίνης' (ubiquitin receptors). Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται σε όλα τα στάδια κυστιδιακής μεταφοράς, από την ενδοκυττάρωση (π.χ. Eps15, Epsin) μέχρι και τη σύλληψη του φορτίου για αποικοδόμηση (π.χ. HRS, STAM, βλ. υποενότητα 1.3.3.2.1) ^{53 54}.

Υπάρχουν διάφορες αναγνωρισμένες περιοχές που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη, όπως οι UBA (Ubiquitin associated), UEV (Ubiquitin E2 variant), UIM (Ubiquitin interacting motif) και CUE (Cuel-homologous) ⁵⁵. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι αντιστρεπτές και να ρυθμίζονται από πρωτεΐνες DUB (de-ubiquitinating enzymes), οι οποίες αφαιρούν τις ουβικιτίνες από τα πρωτεϊνικά υποστρώματα (π.χ. AMSH, Associated molecule with the SH3 domain of STAM).

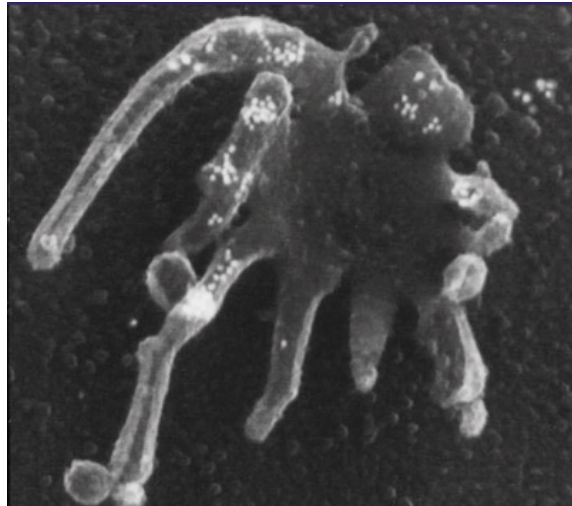
1.3 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ

1.3.1 Πρώιμα Ενδοσώματα/Ενδοσώματα Διαλογής

Τα πρώιμα ενδοσώματα είναι το πρώτο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα που δέχεται 'φορτίο' από την κυτταρική μεμβράνη, δια μέσω των διαφόρων μονοπατιών ενδοκυττάρωσης (CDE ή CIE). Το μονοπάτι αυτό αποτελεί ένα δυναμικό δίκτυο μεμβρανών, στο οποίο τα κυστίδια που το απαρτίζουν παρουσιάζουν αυξημένη κινητικότητα και τάση να υφίστανται ομότυπη και ετερότυπη μεμβρανική σύντηξη ⁵⁶.

Το πρώιμο ενδοσώμα είναι ένα πλειομορφικό διαμέρισμα, αποτελούμενο από σωληνοειδείς μεμβρανικές προεκτάσεις, διαμέτρου ~60nm και από μεγαλύτερα μεμβρανικά κυστίδια, διαμέτρου ~400nm στα οποία σχηματίζονται μεμβρανικές εγκολπώσεις, προκαλώντας έτσι πολυκυστιδιακή εμφάνιση ⁵⁷ (Εικ.1.9). Αυτές οι μορφολογικά διακριτές περιοχές των πρώιμων ενδοσωμάτων πιστεύεται πως είναι και λειτουργικά σημαντικές. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες-υποδοχείς που θα επιστρέψουν στη μεμβράνη, μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης, συσσωρεύονται στις σωληνοειδείς προεκτάσεις των πρώιμων ενδοσωμάτων, ενώ οι πρωτεΐνες που μετέπειτα προορίζονται για αποικοδόμηση, συσσωρεύονται στις μεμβρανικές εγκολπώσεις και τα πολυκυστιδιακά σώματα (MVB) των πρώιμων ενδοσωμάτων ⁵⁸. Επίσης, τα κυστίδια που

δημιουργούνται από αυτές τις δυο λειτουργικά και μορφολογικά διακριτές περιοχές του πρώιμου ενδοσώματος, παρουσιάζουν διαφορές και στις χημικές ιδιότητες του περιεχομένου του αυλού τους⁵⁹. Το pH μειώνεται από 6,2 σε ~5,5 στον αυλό των πολυκυστιδιακών σωματίων, ενώ αντίθετα αυξάνεται σε ~6,5 στα σωληνοειδή ενδοσώματα ανακύκλωσης.



Εικόνα 1.9: Το πρώιμο ενδόσωμα. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου πρώιμου ενδοσώματος που περιέχει την πρωτεΐνη LDL (Low density lipoprotein) συζευγμένη με μόρια χρυσού (gold particles)⁵⁷.

Οι περισσότεροι αυξητικοί παράγοντες που ενδοκυτταρώνονται αποικοδομούνται, ενώ οι υποδοχείς τους συχνά επιστρέφουν στη μεμβράνη για έναν επόμενο 'γύρο' πρόσδεσης με τον αυξητικό παράγοντα, ενδοκυττάρωσης και διαλογής στο πρώιμο ενδόσωμα. Οι υποδοχείς της τρανσφερίνης ή οι LDLR περνούν πολύ γρήγορα από το πρώιμο ενδόσωμα στα ενδοσώματα ανακύκλωσης, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του υποδοχέα EGFR (70-75%) μεταφέρεται για αποικοδόμηση στο όψιμο ενδοσώμα και το λυσόσωμα⁶⁰. Το σχετικά όξινο pH του περιβάλλοντος στον αυλό του πρώιμου ενδοσώματος (~6,3-6,8), επιτρέπει το διαχωρισμό των αυξητικών παραγόντων από τους υποδοχείς τους. Έχοντας αποδεσμευτεί, οι δύο πρωτεΐνες, υποδοχέας και συνδέτης, μπορεί να έχουν διαφορετική τύχη. Για παράδειγμα ο LDLR ανακυκλώνεται, ενώ η πρωτεΐνη LDL αποικοδομείται.

Συνειδητοποιούμε λοιπόν ότι πρωταρχική λειτουργία του πρώιμου ενδοσώματος είναι η διαλογή του 'φορτίου' που έχει ενδοκυτταρωθεί σε διαφορετικούς ενδοκυτταρικούς προορισμούς και για αυτό χαρακτηρίζεται και ως ενδόσωμα διαλογής (Sorting endosome)⁶¹. Το πρώιμο ενδόσωμα έχει ποικίλη πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύσταση. Στην επόμενη υποενότητα περιγράφονται αναλυτικά οι βασικές πρωτεΐνες με την πιο σημαντική λειτουργία της καθεμιάς.

1.3.1.1 Πρωτεΐνες του πρώιμου ενδοσώματος

Το πρώιμο ενδόσωμα διαθέτει διάφορες πρωτεΐνες Rab, με πιο γνωστές τις πρωτεΐνες Rab5 και Rab4 (Εικ.1.4). Κάθε μια από αυτές διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο. Ακόμη, στο πρώιμο ενδόσωμα βρίσκονται οι Rab10, Rab14, Rab21 και Rab22, αλλά ο ρόλος τους δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένος⁶².

Η πρωτεΐνη **Rab5** είναι η πιο καλά μελετημένη Rab της πρώιμης ενδοκυτταρικής διακίνησης^{63 22}. Ρυθμίζει τη μεταφορά του 'φορτίου' από την πλασματική μεμβράνη στο πρώιμο ενδόσωμα, την παραγωγή του phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) λιπιδίου⁶⁴, την ομότυπη σύντηξη⁶⁵, καθώς και την κινητικότητα και τη μεταφορά των πρώιμων ενδοσωμάτων πάνω στις 'ράγες' των μικροσωληνίσκων⁶⁶. Ταυτόχρονα, μπορεί να ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος από το πρώιμο ενδόσωμα στον πυρήνα (βλ. πιο κάτω)⁶⁷⁻⁶⁹.

Η Rab5 ενεργοποιείται με τη δράση της Rabex-5, μιας πρωτεΐνης που δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (GEF), και διατηρείται σε ενεργή μορφή με τη βοήθεια μιας άλλης πρωτεΐνης τελεστή, της Rabartin-5⁷⁰. Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες τελεστές που προσελκύονται στα πρώιμα ενδοσώματα μέσω της Rab5, διαδραματίζοντας καθορισμένη λειτουργία^{71 23 62}, περιγράφονται περιληπτικά στη συνέχεια.

Μια από τις πρώτες πρωτεΐνες που προσελκύονται στα πρώιμα ενδοσώματα από την Rab5-GTP (ενεργή μορφή) είναι η κινάση της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (**PtdIns(3)P-kinase/VPS34/p150**)⁶⁴. Κύριος ρόλος της είναι η παραγωγή του λιπιδίου PtdIns(3)P, ένα φωσφοϊνοσίδιο άφθονο στη μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων και τα ενδοαυλικά κυστίδια των πολυκυστιδιακών σωματιδίων. Το PtdIns(3)P αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που φέρουν το FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) μοτίβο, την PX (Phox-

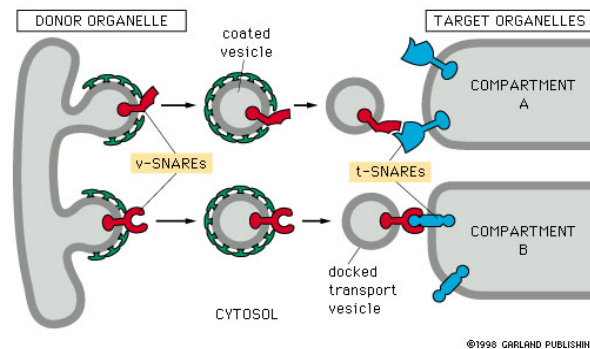
homology) δομική περιοχή και άλλες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών, είναι οι πρωτεΐνες EEA1 (early endosome antigen 1)⁷², η Rabenosyn-5⁷³ και η SNXs (Sorting nexins)⁷⁴, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με το PtdIns(3)P λιπίδιο και με την ενεργή μορφή της Rab5.

Άλλες σημαντικές πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν FYVE μοτίβο και θα μας απασχολήσουν στην παρούσα διατριβή, είναι οι πρωτεΐνες **SARA** (SMAD anchor for receptor activation)⁷⁵ και **HRS** (Hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine kinase substrate)⁷⁶. Αναστέλλοντας την παραγωγή του PtdIns(3)P λιπιδίου, χρησιμοποιώντας κατάλληλους αναστολείς (π.χ. Wortmannin), καταργείται και ο εντοπισμός των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο PtdIns(3)P λιπίδιο (π.χ. EEA1) στο πρώιμο ενδόσωμα, με συνεπακόλουθο την αναστολή και των λειτουργιών που η κάθε μια επιτελεί. Διαφαίνεται λοιπόν, πως ο ρόλος που παίζει η κινάση της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης για τη σωστή λειτουργία του πρώιμου ενδοσώματος είναι καθοριστικός²¹.

Ένας ακόμη καλά χαρακτηρισμένος τελεστής της Rab5 είναι η πρωτεΐνη **EEA1**. Η πρωτεΐνη αυτή, συνδεόμενη, μέσω του FYVE μοτίβου που περιέχει στο PtdIns(3)P λιπίδιο, διακοσμεί την εξωτερική μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων και χρησιμοποιείται ως δείκτης του διαμερίσματος αυτού (Εικ.1.11)⁷⁷. Η EEA1 αλληλεπιδρά με μέλη των πρωτεϊνών **SNARE** (Soluble N-ethylmaleide-sensitive factor attachment protein receptor), διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων. Οι πρωτεΐνες SNARE δύο διαφορετικών κυστιδίων (v-SNARE και t-SNARE) σχηματίζουν ένα ελικοειδές σύμπλεγμα, ικανό να προκαλέσει σύντηξη των δύο μεμβρανών. Η ειδική προσέλκυση των πρωτεϊνών SNARE από καθορισμένες πρωτεΐνες, σε συγκεκριμένα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, προσφέρει εξειδίκευση στη διαδικασία σύντηξης των διαφόρων κατηγοριών των ενδοσωμάτων⁷⁸ (Εικ.1.10). Πιο συγκεκριμένα, στα πρώιμα ενδοσώματα η EEA1 συνδέεται ισχυρά με δύο από τα μέλη των SNARE-στόχων (t-SNAREs), την syntaxin6 και syntaxin13^{79 80}.

Μια ακόμη πρωτεΐνη με FYVE περιοχή που διαδραματίζει ρόλο στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων και αποτελεί τελεστή τόσο της Rab5 όσο και της Rab4, είναι η **Rabenosyn-5**⁷³. Συνδεόμενη στις Rab πρωτεΐνες, η Rabenosyn-5 συντονίζει γεγονότα διαλογής 'φορτίου' από το πρώιμο ενδόσωμα, στο οποίο κυριαρχεί η Rab5, στο γρήγορο

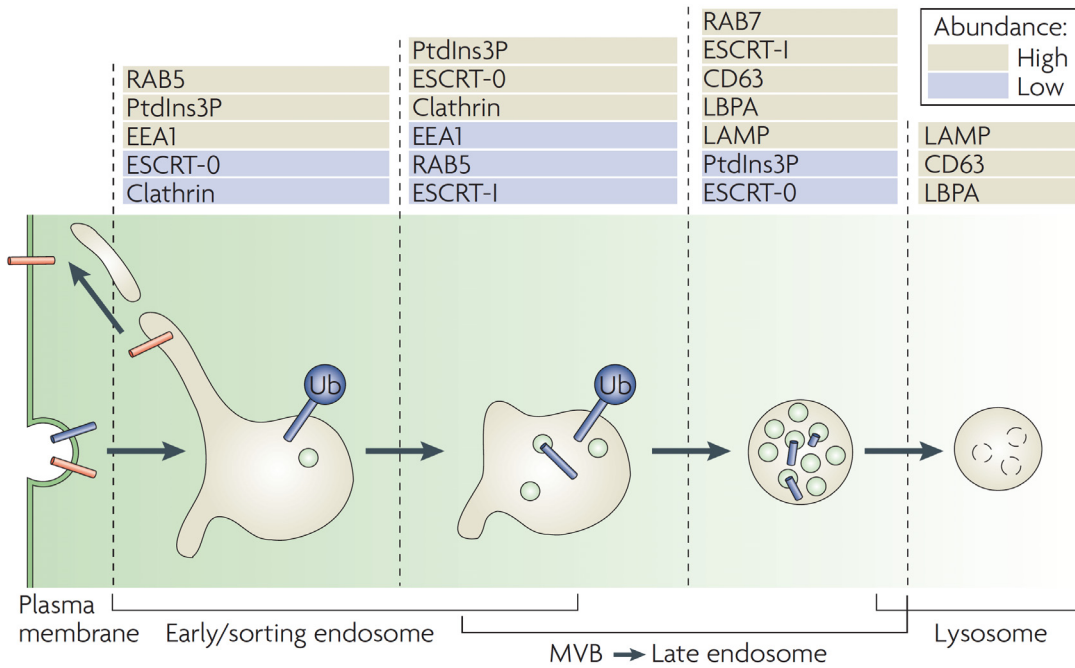
διαμέρισμα ανακύκλωσης (fast recycling compartment) (υποενότητα 1.3.2), όπου αφθονεί η πρωτεΐνη Rab4⁸¹. Επιπρόσθετα, η Rabenosyn-5 αλληλεπιδρά με την **EHD1**, μια πρωτεΐνη σημαντική για την ανακύκλωση 'φορτίου' από το ενδοκυτταρικό διαμέρισμα ανακύκλωσης (ERC, Endocytic recycling compartment) στην κυτταρική μεμβράνη (υποενότητα 1.3.2)⁸².



Εικόνα 1.10: Οι πρωτεΐνες SNARE και η εξειδίκευση στις διαδικασίες μεμβρανικής διακίνησης. Οι πρωτεΐνες vesicle-SNARE (v-SNARE) των κυστιδίων μεταφοράς αναγνωρίζονται με συμπληρωματικό τρόπο από τις target-SNARE (t-SNARE) του οργανιδίου δέκτη (A ή B) και έτσι επιτυγχάνεται η πρόσδεση του κυστιδίου και η σύντηξη των δύο μεμβρανών (http://www.zoology.ubc.ca/~berger/b200sample/unit_8_protein_processing/vesicle_traffic/vesicle_transport.htm).

Τέλος, οι πρωτεΐνες **APPL1** και **APPL2** (Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif) αποτελούν δυο ακόμη τελεστές της πρωτεΐνης Rab5, οι οποίες εντοπίζονται σε μια υποκατηγορία Rab5-θετικών πρώιμων ενδοσωμάτων⁶⁷. Οι πρωτεΐνες αυτές, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση και όχι στην ενδοκυτταρική μεμβρανική διακίνηση. Για παράδειγμα, μετά από επαγωγή με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), οι APPL μετατοπίζονται από το πρώιμο ενδόσωμα στον πυρήνα, όπου και αλληλεπιδρούν με πρωτεϊνικά συμπλέγματα που σχετίζονται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης και την έκφραση γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σημαντικές για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η σύνδεση τους με την Rab5 φαίνεται πως είναι σημαντική για τη μιτογένεση⁶⁷. Έχει επίσης δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες APPL επηρεάζουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT, protein kinase B) και ότι η σωστή κυτταρική τους εντόπιση στα ενδοσώματα είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης AKT⁶⁸. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα πρώιμα

ενδοσώματα, δεν αποτελούν μόνο ένα κυτταρικό διαμέρισμα διαλογής ‘φορτίου’, αλλά φαίνεται πως διαδραματίζουν και σημαντικό ρόλο σε γεγονότα σηματοδότησης αυξητικών παραγόντων⁶¹.



Εικόνα 1.11: Ενδοκυτταρική μεμβρανική διακίνηση και οι κυριότερες πρωτεΐνες που τη χαρακτηρίζουν. Με γαλάζιο ή γκρι χρώμα αναπαριστάται η χαμηλή ή η υψηλή αφθονία των διαφόρων πρωτεϊνών. Παρατηρούμε ότι πολλές από τις πρωτεΐνες παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη στους διαφόρους τύπους οργανιδίων¹².

Εκτός από την Rab5 και τους τελεστές της, στα πρώιμα ενδοσώματα βρίσκεται και η πρωτεΐνη **Rab4**⁸³. Η πρωτεΐνη Rab4, εντοπίζεται επίσης στο γρήγορο (fast recycling) και αργό (slow recycling ή ERC) (Rab11-θετικό) κυτταρικό διαμέρισμα ανακύκλωσης, μονοπάτια που σχετίζονται με την ανακύκλωση ‘φορτίου’ προς την κυτταρική μεμβράνη (Εικ.1.3.2). Η Rab4 ρυθμίζει, κυρίως, τη συνεχή έξοδο ‘φορτίου’ προς την κυτταρική μεμβράνη, όπως επίσης και τη διαλογή του ‘φορτίου’ προς το αργό διαμέρισμα ανακύκλωσης⁸⁴. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη μεμβρανική διακίνηση του μεταφορέα της γλυκόζης (GLUT4) από ένα ενδοκυττάριο αποθηκευτικό διαμέρισμα στην πλασματική μεμβράνη, μετά από επαγωγή με ινσουλίνη, σε λιπώδη και μυϊκά κύτταρα⁸⁵. Το γεγονός πως η Rab4 διαθέτει κοινούς τελεστές με την Rab5 (π.χ. Rabenosyn-5, Rabartin-5), δηλώνει πως αυτές οι δύο πρωτεΐνες Rab συνδέονται λειτουργικά στις διαδικασίες μετάβασης από το πρώιμο ενδοσώμα στα ενδοσώματα ανακύκλωσης.

1.3.1.2 Σηματοδότηση και πρώιμο ενδόσωμα. Από το χθες στο σήμερα...

Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων αποτελούσε ένα τρόπο απευαισθητοποίησης του κυττάρου, έτσι ώστε να μη μπορεί πλέον να ανταποκριθεί στα διάφορα ερεθίσματα. Από τη μια, η εσωτερίκευση των ενεργοποιημένων υποδοχέων μείωνε τους διαθέσιμους δέκτες μηνυμάτων από τη μεμβράνη των κυττάρων και από την άλλη, η μετέπειτα αποικοδόμησή τους μαζί με τα προσδεδεμένα μόρια του συνδέτη στα λυσόσωμα, σταματούσε τη σηματοδότηση και επανέφερε τα κύτταρα από τη διεγερμένη φάση (activated state), στη φάση ηρεμίας (φάση σταθερότητας, steady state).

Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ενδοκυττάρωση και η μεμβρανική διακίνηση των υποδοχέων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της σηματοδότησης και έχει αποδειχθεί πως, εκτός από την αποικοδόμηση των υποδοχέων, παίζουν ρόλο και στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών^{86 87 88 89 90 91}.

Η κυτταρική σηματοδότηση, εκτός από την ενεργοποίηση των κατάλληλων υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη, εξαρτάται και ρυθμίζεται, σε μεγάλο βαθμό, από τον τόπο και για το χρονικό διάστημα από το οποίο εκπέμπεται το κατάλληλο σήμα. Τα κυστίδια του ενδοκυτταρικού μονοπατιού αποτελούν μια ιδανική 'πλατφόρμα', η οποία μπορεί να προσφέρει χωρική και χρονική διάσταση στις διαδικασίες σηματοδότησης. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς, όντας σε συγκεκριμένα διαμερίσματα-ενδοσώματα, ενεργοποιούν καθοδικούς τελεστές και στέλνουν χρονικά παρατεταμένα σήματα, προσφέροντας από τη μια τοπολογική εξειδίκευση και από την άλλη ενίσχυση της σηματοδότησης.

Η επικρατούσα άποψη του παρελθόντος ότι η μεταγωγή του σήματος συμβαίνει μόνο από την κυτταρική μεμβράνη, αντικρούστηκε από την παρατήρηση ότι λίγο μετά την ενδοκυττάρωση, ο ενεργοποιημένος EGFR υποδοχέας και πολλά από τα καθοδικά σηματοδοτικά μόρια εντοπίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεταγωγή του σήματος μπορεί να συνεχίζεται και μετά την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων⁹². Η τελευταία υπόθεση των 'ενδοσωμάτων σηματοδότησης' (**signaling endosomes**) υποστηρίζεται και από την παρατήρηση πως η αναστολή της ενδοκυττάρωσης των EGFR από την κυτταρική μεμβράνη έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποίησης των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, όπως

για παράδειγμα των MAP κινασών (MAPK, Mitogen-activated protein kinases) ERK1/2 και της κινάσης της 3-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης (PI3K phosphatidylinositol 3-kinase)⁹³. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και με την αναστολή της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα της ινσουλίνης⁹⁴, PDGFR, β 2-adrenergic-receptor και πολλών άλλων⁸⁶. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι κάποια από τα μόρια του καταρράκτη των σηματοδοτικών μονοπατιών ενεργοποιούνται μετά την ενδοκυττάρωση των ενεργοποιημένων υποδοχέων στα ενδοσωματικά διαμερίσματα.

Η ιδέα των 'ενδοσωμάτων σηματοδότησης' διατυπώθηκε αρχικά σε μελέτες σε νευρικά κύτταρα, στα οποία η σηματοδότηση από τους άξονες προς το κυτταρικό σώμα, δεν μπορεί να εξηγηθεί με απλή διάχυση των σηματοδοτικών μορίων. Μελετώντας την ενδοκυτταρική διακίνηση του αυξητικού παράγοντα NGF (Nerve growth factor) κατά μήκος των αξόνων των νευρικών κυττάρων, αποδείχθηκε πως τα καλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια, καθώς και τα πρώιμα ενδοσώματα, αποτελούν μεταφορείς τόσο των ενεργοποιημένων TrKA υποδοχέων, όσο και των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων ERK1/2 και PI3K/AKT⁹⁵.

Επίσης, η διάρκεια της σηματοδότησης εξαρτάται από το χρόνο στον οποίο οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς έρχονται σε επαφή με καθοδικούς τελεστές. Η παράμετρος αυτή ρυθμίζεται από την κινητική και το ποσοστό των υποδοχέων που υφίσταται αποικοδόμηση, σε σύγκριση με τον ρυθμό ανακύκλωσής τους προς την κυτταρική μεμβράνη. Δυσλειτουργία του μηχανισμού αποικοδόμησης των υποδοχέων, μετά την ενεργοποίηση και την ενδοκυττάρωση, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ανακύκλωση των υποδοχέων και παρατεταμένη μεταγωγή σήματος.

Από την άλλη μεριά, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς, μπορεί να εισέλθουν στο κύτταρο χρησιμοποιώντας διαφορετικά μονοπάτια (CDE ή CIE), γεγονός που μπορεί διαφοροποιεί τη μετέπειτα τύχη τους ή τη σηματοδότηση. Ο EGFR ή οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF β), εκτός από το κλαθρινο-εξαρτώμενο μονοπάτι χρησιμοποιούν και άλλα μονοπάτια για την είσοδο τους μέσα στο κύτταρο⁹⁶⁹⁷. Για παράδειγμα, μετά από επαγωγή με υψηλή δόση EGF ή σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα EGFR (A431), έχει αναφερθεί πως ο υποδοχέας EGFR μπορεί να ενδοκυτταρωθεί και με μη κλαθρινο-εξαρτώμενο τρόπο, μονοπάτι που προωθεί την αποικοδόμηση των υποδοχέων και όχι την μεταγωγή του σήματος⁹⁶. Από

την άλλη μεριά, οι υποδοχείς του TGFβ πιστεύεται πως μπορούν και ενδοκυτταρώνονται τόσο με CDE όσο και CIE, με στόχο είτε την ενεργοποίηση της σηματοδότησης, είτε την αποσιώπησή της με πρωτεασωματική αποικοδόμηση, αντίστοιχα⁹⁷.

1.3.2 Τα ενδοσώματα ανακύκλωσης

Η απομάκρυνση μεμβρανικού και πρωτεϊνικού υλικού από την κυτταρική μεμβράνη, μέσω των διαφόρων μονοπατιών της ενδοκυττάρωσης, εξισορροπείται από μεμβρανικό και πρωτεϊνικό υλικό που επιστρέφει σε αυτή. Πολλές από τις πρωτεΐνες-υποδοχείς που έχουν εισέλθει, μέσω των μονοπατιών της ενδοκυττάρωσης, στο πρώιμο ενδόσωμα μπορούν να επιστρέψουν στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των μονοπατιών της ανακύκλωσης (Εικ.1.2). Τα ενδοσώματα ανακύκλωσης είναι ένα δυναμικό δίκτυο μεμβρανικών κυστιδίων, που φαίνεται να ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες Rab4 και Rab11 οι οποίες παρουσιάζουν διακριτή, αλλά αλληλο-επικαλυπτόμενη κατανομή (Εικ.1.4). Ο ακριβής ρόλος αυτών των GTPασων δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος.

Είναι γνωστό ότι η ανακύκλωση διαφόρων υποδοχέων προς την κυτταρική μεμβράνη (π.χ. υποδοχέας τρανσφερίνης), παρουσιάζει διπλή κινητική και διακρίνεται στην αργή (slow) και τη γρήγορη (fast). Η διαφορετική κινητική αντανακλά και την ύπαρξη δυο διαδρομών προς την κυτταρική μεμβράνη, άρα και διπλού μηχανισμού. Πιστεύεται πως οι πρωτεΐνες Rab4 και Rab35 ρυθμίζουν την ανακύκλωση του φορτίου από το πρώιμο ενδόσωμα ή από ένα πιο πρώιμο στάδιο, κατευθείαν προς την κυτταρική μεμβράνη με κινητική ($t_{1/2}$) που για τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR) υπολογίζεται στα 5 λεπτά (fast recycling, **γρήγορη ανακύκλωση**) (Εικ.1.2, βήμα 1α).

Από την άλλη μεριά, η πρωτεΐνες EHD4 και Rab11 διαμεσολαβούν στην κυστιδική μεταφορά του φορτίου προς την κυτταρική μεμβράνη, διαμέσω μονοπατιών που επικοινωνούν με τη συσκευή Golgi. Το μονοπάτι αυτό είναι γνωστό ως ενδοκυτταρωτικό διαμέρισμα ανακύκλωσης (ERC, Endocytic recycling compartment) (Εικ.1.2, βήμα 1β)⁹⁸ και για τον TfR έχει ενδιάμεση διάρκεια ($t_{1/2}$) περίπου 15-30 λεπτά (slow recycling, **αργή ανακύκλωση**). Το διαμέρισμα αυτό παρουσιάζει σωληνοειδή μορφολογία και πολλές φορές βρίσκεται κοντά στον πυρήνα των κυττάρων (περιπυρηνικό). Το μοντέλο που επικρατεί για τη βιογένεση των διαφόρων ενδοκυτταρωτικών διαμερισμάτων υποστηρίζει ότι οι σωληνοειδείς προεκτάσεις του πρώιμου ενδοσώματος γίνονται ERC,

ενώ το κυρίως σώμα των πρώιμων ενδοσωμάτων ωριμάζει σε MVB (Multivesicular bodies)¹³.

Επειδή τα κύτταρα ανανεώνουν συνεχώς την κυτταρική τους μεμβράνη, μέσω των μονοπατιών της ενδοκυττάρωσης, η ανακύκλωση των συστατικών της είναι πολύ σημαντική και πρέπει να είναι σε υψηλό βαθμό ρυθμιζόμενη⁹⁹.

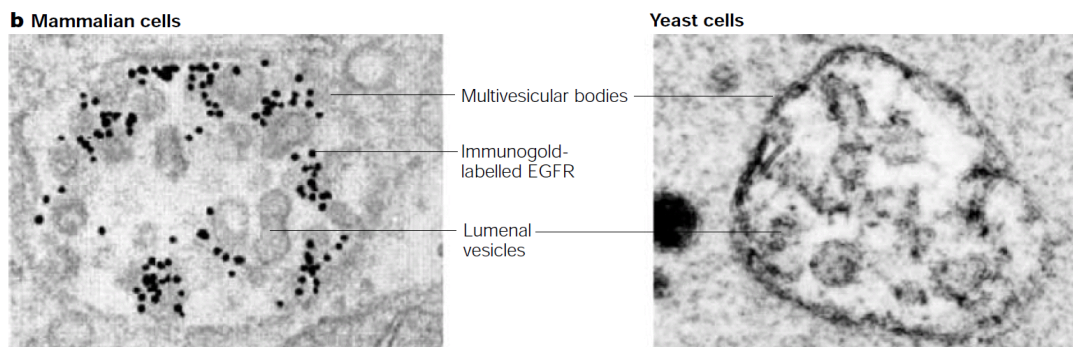
1.3.3 Το μονοπάτι αποικοδόμησης

Η εξειδικευμένη αναγνώριση του προς αποικοδόμηση 'φορτίου', που έχει σημανθεί στην κυτταρική μεμβράνη με ουβικιτίνη, πραγματοποιείται στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, με τη βοήθεια του πρωτεϊνικού συμπλέγματος ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) (Εικ.1.13 και 1.14). Αυτό είναι μια αρκετά συντηρημένη 'πρωτεϊνική μηχανή', η οποία πραγματοποιεί τρεις διακριτές, αλλά αλληλένδετες λειτουργίες¹¹. **Πρώτον**, αναγνωρίζει τα σημασμένα με ουβικιτίνη πρωτεϊνικά 'φορτία' και αποτρέπει την ανακύκλωσή τους προς την κυτταρική μεμβράνη ή την ανάδρομή τους μεταφορά σε προηγούμενα κυτταρικά διαμερίσματα. **Δεύτερον**, παραμορφώνει, εγκολπώνοντας τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων και παγιδεύει το 'φορτίο' σε αυτές τις μεμβρανικές κοιλότητες. **Τρίτον**, καταλύει την τελική εκτομή των μεμβρανικών εγκολπώσεων, σχηματίζοντας μικρά κυστίδια (ILV, Intraluminal vesicles) στον αυλό των ενδοσωμάτων, τα οποία περιέχουν το προς αποικοδόμηση 'φορτίο'¹⁰⁰. Στην ώριμή τους μορφή τα ενδοσώματα αυτά ονομάζονται πολυκυστιδιακά σωματίδια, τα οποία στη συνέχεια συντήκονται με τα όψιμα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα (Εικ.1.2 και 1.11).

1.3.3.1 Πολυκυστιδιακά σωματίδια, όψιμο ενδόσωμα και λυσόσωμα

Τα πολυκυστιδιακά σωματίδια/ενδοσώματα (Εικ.1.12) (MVB/E, Multivesicular bodies/endosomes) σχηματίζονται με εγκόλπωση της μεμβράνης των πρώιμων ενδοσωμάτων, αποκοπή και συσσώρευση κυστιδίων στο εσωτερικό του αυλού τους (ILV, Intraluminal vesicles). Τα MVB των κυττάρων των θηλαστικών αποτελούν ένα ενδιάμεσο, αλλά διακριτό τύπο ενδοσωμάτων, τόσο από τα πρώιμα όσο και τα όψιμα ενδοσώματα (Εικ.1.2). Τα ενδοσώματα αυτά, διαφέρουν σε πρωτεϊνική σύσταση από τα πρώιμα ενδοσώματα, καθώς επίσης διαφέρουν τόσο σε πρωτεϊνική όσο και σε λιπιδιακή σύσταση από τα όψιμα ενδοσώματα (Εικ.1.11). Οι μεμβράνες των ενδοαυλικών

ενδοσωμάτων είναι πλούσιες σε PtdIns(3)P λιπίδια, γεγονός που υποδηλώνει την προέλευσή τους από τα πρώιμα ενδοσώματα (Εικ.1.3)¹⁹. Στη μεμβράνη των ενδοαυλικών κυστιδίων των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων συσσωρεύονται, με τη βοήθεια μιας εξειδικευμένης πρωτεϊνικής μηχανής (βλ. πιο κάτω ESCRT συμπλέγματα), οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που προορίζονται για αποικοδόμηση. Η μεμβράνη των MVB συντήκεται με τη μεμβράνη των όψιμων ενδοσωμάτων και τελικά το φορτίο παραδίδεται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Οι πρωτεΐνες που δεν προορίζονται για αποικοδόμηση, παραμένουν στην εξωτερική μεμβράνη των MVB και από εκεί μπορεί να μεταφερθούν, είτε στη *trans*-Golgi συσκευή και την κυτταρική μεμβράνη, είτε στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων (π.χ. Lamp1) (Εικ.1.2). Με την τελευταία διαδικασία, το MVB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύστασης και της λειτουργίας του λυσοσωμικού διαμερίσματος.



Εικόνα 1.12: Το πολυκυστιδιακό σωματίδιο (MVB). Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου των πολυκυστιδιακών σωματιδίων κυττάρων θηλαστικών (αριστερά) ή μυκήτων (δεξιά). Τα μόρια χρυσού στην εικόνα των κύτταρων των θηλαστικών αντιπροσωπεύουν τον υποδοχέα EGFR. Και στις δυο περιπτώσεις διακρίνονται τα ενδοαυτικά κυστίδια (ILV) στον αυλό των πολυκυστιδιακών σωμάτων (MVB)¹⁰⁰.

Όμοια με τα πρώιμα ενδοσώματα, τα όψιμα ενδοσώματα αποτελούν ένα δυναμικό δίκτυο κυστιδίων με αρκετά πολύπλοκη και πλειομορφική οργάνωση. Το όψιμο ενδόσωμα (Εικ.1.2 και 1.11) περιέχει ενδοαυτικά κυστίδια, σωληνοειδείς προεκτάσεις και πολλές μεμβρανικές εγκοιλώσεις. Η εξωτερική του μεμβράνη περιέχει υψηλά ποσά των πρωτεϊνών Lamp1, Rab7 και Rab9, ενώ στα ενδοαυτικά κυστίδια υπάρχει αυξημένη ποσότητα LBPA (Lisobiphosphatidic acid) (Εικ.1.11). Οι υποδοχείς που έχουν εγκλωβιστεί

στα ενδοαυλικά κυστίδια των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων, παραδίδονται στα όψιμα ενδοσώματα και κατόπιν στα λυσοσώματα όπου και αποικοδομούνται.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι μεμβράνες των ενδοαυλικών κυστιδίων των όψιμων ενδοσωμάτων δεν περιέχουν μόνο πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση. Η πρωτεΐνη M6PR (Mannose 6-phosphate receptor) κυκλοφορεί ανάμεσα στην trans-Golgi συσκευή και τα ενδοσώματα, παραδίδοντας λυσοσωμικά ένζυμα από τη συσκευή Golgi στα όψιμα ενδοσώματα ¹⁰¹. Επίσης, στα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells), οι πρωτεΐνες των εσωτερικών κυστιδίων των όψιμων ενδοσωμάτων παίρνουν μέρος στην παρουσίαση των αντιγόνων στην επιφάνεια των κυττάρων.

Τα λυσοσώματα και τα όψιμα ενδοσώματα βρίσκονται σε μια δυναμική κατάσταση, ανταλλάσσοντας συνεχώς λιπιδιακό και πρωτεϊνικό υλικό ⁵⁷. Για το λόγο αυτό ο διαχωρισμός τους είναι πολύ δύσκολος. Και τα δύο διαμερίσματα περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα, έχουν παρόμοιο pH (~5,5) και στην εξωτερική τους μεμβράνη απαντώνται παρόμοιες γλυκο-πρωτεΐνες. Ωστόσο, στα λυσοσώματα δεν υπάρχουν οι πρωτεΐνες των όψιμων ενδοσωμάτων Rab7 και Rab9 (Εικ.1.11). Στα λυσοσώματα, πραγματοποιείται η αποικοδόμηση του φορτίου που φτάνει σε αυτά, με διάφορες λιπάσες ή πρωτεάσες ¹⁰².

1.3.3.2 Μηχανισμός δημιουργίας πολυκυστιδιακών σωματιδίων και διαλογή για αποικοδόμηση

Ο σχηματισμός των πολυκυστιδιακών σωματιδίων (MVB), καθώς επίσης και η διαλογή του φορτίου που φέρει ουβικιτίνες, ρυθμίζεται από τη σωστή και συντονισμένη δράση 18 πρωτεϊνών, οι οποίες ανακαλύφθηκαν στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και ανήκουν στην E κατηγορία των Vps πρωτεϊνών (class E-Vacuolar protein sorting). Έλλειψη κάθε ενός από τα γονίδια της E Vps κατηγορίας έχει ως αποτέλεσμα τη λανθασμένη εντόπιση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη του κενοτοπίου (vacuole) (οργανίδιο ομόλογο του λυσοσώματος) στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, και τη συσσώρευση ενδοσωματικού φορτίου σε μεγάλους ανώμαλους σχηματισμούς δίπλα από το κενοτόπιο, γνωστούς ως διαμερίσματα 'κατηγορίας E' (Class E compartment) ¹⁰³. Οι E Vps πρωτεΐνες είναι αρκετά συντηρημένες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Παρόμοια πειράματα 'έλλειψης λειτουργίας' (loss of function) των ορθόλογων πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει το σχηματισμό

ανώμαλων μεμβρανικών διαμερισμάτων, ανάλογων με αυτούς που έχουν παρατηθεί στο μύκητα ¹⁰⁴. Για κάθε μία από τις Vps κατηγορίας E πρωτεΐνες του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, υπάρχει μία ή περισσότερες ορθόλογες πρωτεΐνες στα θηλαστικά. Στη συνέχεια του κειμένου, αναφέρονται είτε οι ανθρώπινες είτε οι πρωτεΐνες του μύκητα, ανάλογα με το σύστημα στο οποίο ο ρόλος τους έχει αποσαφηνιστεί σε μεγάλο βαθμό (Πίνακας 1.1). Η πλειοψηφία αυτών των πρωτεϊνών είναι συστατικά τεσσάρων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, γνωστών ως ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) (Εικ.1.13).

Table 1 ESCRT subunits					
Complex	Yeast protein	Metazoan protein	Mammalian synonym	Ubiquitin-binding domain	Selected interacting proteins (metazoan)
ESCRT-0	Vps27	Hrs	NA	UIM	Clathrin, Eps15b
	Hse1	STAM1, 2	NA	UIM (VHS)	AMSH, UBPY
ESCRT-I	Vps23	Tsg101	NA	UEV	NA
	Vps28	Vps28	NA	NA	NA
	Vps37	Vps37A, B, C, D	NA	NA	NA
	Mvb12	Mvb12A, B	NA	NA	NA
ESCRT-II	Vps22	Vps22	EAP30	NA	NA
	Vps25	Vps25	EAP20	NA	NA
	Vps36	Vps36	EAP45	GLUE	NA
ESCRT-III	Vps2	Vps2A,B	CHMP2A,B	NA	NA
	Vps20	Vps20	CHMP6	NA	NA
	Vps24	Vps24	CHMP3	NA	AMSH, UBPY
	Vps32 (Snf7)	Vps32A, B, C	CHMP4A,B,C	NA	NA
Vps4	Vps4	Vps4A, B	SKD1A,B	NA	NA
	Ist1	Ist1	NA	NA	NA
	Did2 (Vps46)	Vps46A, B	CHMP1A,B	NA	NA
	Vta1	Vta1	LIP5	NA	NA
	Vps60 (Mos10)	Vps60	CHMP5	NA	NA
Other	Bro1 (Vps31)	Alix, HD-PTP	NA	NA	AMSH, UBPY

NA, not applicable. In an attempt to simplify, we have mainly used the Vps names of ESCRT subunits, although alternative names exist, especially in mammalian cells, as indicated. Certain mammalian proteins, such as Hrs, Tsg101 and Alix, have such well-established names that their Vps names have been omitted. Note that the assignment of accessory proteins to Vps4 rather than to ESCRT-III is arbitrary in the light of our incomplete understanding of their functions.

Πίνακας 1.1: Τα μέλη των ESCRT συμπλεγμάτων με τις ονομασίες που χρησιμοποιούνται τόσο στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, όσο και στα μετόζωα ή τα θηλαστικά. Επίσης, στον πίνακα παρουσιάζονται τα μέλη που διαθέτουν μοτίβα που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη, καθώς και κάποιες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν ¹¹.

1.3.3.2.1 ESCRT συμπλέγματα (Endosomal sorting complex required for transport)

Η πρωτεϊνική μηχανή ESCRT αποτελείται από τέσσερα συμπλέγματα, ESCRT-0, -I, -II και -III, και από διάφορα επικουρικά πρωτεϊνικά συστατικά. Διάφορες πρωτεϊνικές και λιπιδιακές αλληλεπιδράσεις προσελκύουν τα συμπλέγματα αυτά σε συγκεκριμένες θέσεις στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, προσφέροντας με αυτό τον τρόπο εξειδικευμένη τοπολογικά δράση (Εικ.1.13) ^{11 12 105}.

Το σύμπλεγμα ESCRT-0

Το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα ESCRT-0, αποτελείται από τις πρωτεΐνες HRS (Hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine kinase substrate) και STAM (Signal transduction adapter molecule) (Vps27 και Hse1 στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*) (Πίνακας 1.1 και Εικ.1.13)¹². Το σύμπλεγμα αυτό, το οποίο αναγνωρίστηκε μεταγενέστερα ως μέλος των ESCRT συμπλεγμάτων, είναι απαραίτητο για την αρχική αναγνώριση των υποδοχέων-φορτίων που φέρουν ουβικιτίνες και για την προσέλκυση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος ESCRT-I στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων^{106 107}.

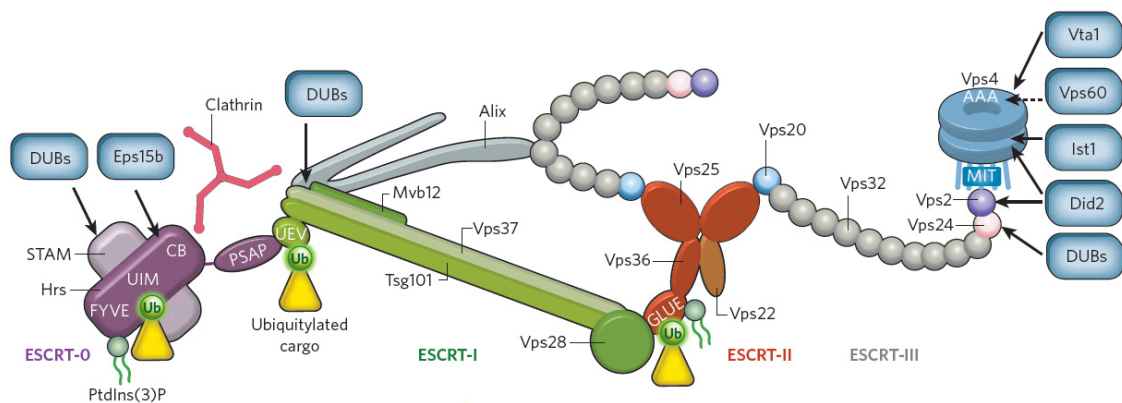
Και οι δυο πρωτεΐνες, διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο την VHS (Vps27, HRS and STAM) δομική περιοχή, με άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία, καθώς επίσης και περιοχές μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με την ουβικιτίνη (UIM) ή την κλαθρίνη (CB, Clathrin-binding motif). Το UIM μοτίβο είναι απαραίτητο για την αναγνώριση των σημασμένων με ουβικιτίνη φορτίων (υποενότητα 1.2.2.2)¹⁰⁸. Η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη κλαθρίνη φαίνεται να είναι σημαντική για τη συσσώρευση του ESCRT-0 συμπλέγματος σε ειδικές μικρο-περιοχές της μεμβράνης των πρώιμων ενδοσωμάτων (Clathrin-coated microdomains), από τις οποίες ξεκινά η οργάνωση των υπόλοιπων ESCRT συμπλεγμάτων^{109 110 111 112}.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η περιοχή FYVE που διαθέτει η HRS, με την οποία δεσμεύεται στο PtdIns(3)P λιπίδιο, εντοπιζόμενη στα πρώιμα ενδοσώματα^{76 113}. Η STAM αλληλεπιδρά με την HRS και με αυτό τον τρόπο προσελκύεται στο πρώιμο ενδόσωμα¹¹⁴. Ακόμη η HRS, μέσω του Pro-(Ser/Thr)-X-Pro (X, οποιοδήποτε αμινοξύ) μοτίβου, συνδέεται με την UEV δομική περιοχή της πρωτεΐνης TSG101 (Tumour susceptibility gene-101)^{107 106}, διαδραματίζοντας ρόλο στη προσέλκυση του συμπλόκου ESCRT-I στο πρώιμο ενδόσωμα. Η αποσιώπηση του *HGS* (HRS) γονιδίου επηρεάζει, τόσο την αναγνώριση των υποδοχέων προς αποικοδόμηση, όσο και τον σχηματισμό των εσωτερικών κυστιδίων (ILV) των πολυκυστιδικών σωματιδίων (MVB), υποδηλώνοντας μια αλληλένδετη σχέση μεταξύ των δυο αυτών διαδικασιών¹¹⁵.

Η Eps15b, μια ακόμη πρωτεΐνη που διαθέτει UIM, συνδέεται φυσικά με τα μέλη του συμπλέγματος ESCRT-0 στον άνθρωπο και φαίνεται να είναι σημαντική για τη σωστή λειτουργία του ESCRT-0, ως μηχανής διαλογής του EGFR υποδοχέα για αποικοδόμηση¹¹⁶. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη STAM αλληλεπιδρά με τις AMSH (Associated Molecule with

the SH3 domain of STAM) και UBPY, δυο πρωτεΐνες που προκαλούν αποουβικιτίνωση (DUB) ^{117 111}. Οι πρωτεΐνες αυτές ενδεχομένως αποουβικιτινώνουν τους υποδοχείς που δεν προορίζονται για αποικοδόμηση ή άλλες πρωτεΐνες που υφίσταται μονοουβικιτίνωση, όπως η STAM και HRS. Ωστόσο η ακριβής βιολογική σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων δεν είναι γνωστή.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι το ESCRT-0 είναι το λιγότερα συντηρημένο από τα υπόλοιπα ESCRT συμπλέγματα και, πιθανώς, να υπάρχουν και άλλες εναλλακτικές ESCRT-0 πρωτεΐνες που λειτουργούν παράλληλα ή αντικαθιστώντας τις HRS και STAM. Οι πρωτεΐνες TOM και οι GGA (Golgi-localizing, γ-adaptin ear homology domain, ARF-binding) μπορεί να θεωρηθούν ως πιθανές υποψήφιες πρωτεΐνες σε αυτό το εναλλακτικό σενάριο, καθώς περιέχουν όλα τα απαραίτητα δομικά στοιχεία που φέρει το σύμπλεγμα ESCRT-0 (VHS και περιοχές σύνδεσης με ουβικιτίνη και κλαθρίνη, βλ. πιο πάνω) ^{118 11 119 120}.



Εικόνα 1.13: Συστατικά και μοριακές αλληλεπιδράσεις της μηχανής ESCRT. Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνικών υπομονάδων των τεσσάρων ESCRT συμπλεγμάτων, καθώς επίσης και των αλληλεπιδράσεων με το ουβικιτινωμένο φορτίο, το PtdIns(3)P λιπίδιο, ενζυμα αποουβικιτίνωσης (DUB), καθώς και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες (Alix, Vps4). Στην εικόνα χρησιμοποιούνται τα ονόματα των πρωτεϊνών των θηλαστικών ή του μύκητα. CB: (Clathrin box motif) μοτίβο πρόσδεσης με την κλαθρίνη. Ub: (Ubiquitin) ουβικιτίνη ¹¹.

Το σύμπλεγμα ESCRT-I

Το σύμπλεγμα ESCRT-I, έχει χαρακτηριστεί τόσο στο μύκητα όσο και στον άνθρωπο και αποτελείται από τις πρωτεΐνες TSG101 (Vps23), Vps28, Vps37 και Mvb12, σε αναλογία 1:1:1:1 (Πίνακας 1.1 και Εικ.1.13) ^{121 122 12 123}. Η Vps28 συνδέεται με την Vps36, πρωτεΐνη του ESCRT-II, στο μύκητα *S. cerevisiae* ¹²⁴.

Πυρήνας αυτού του συμπλέγματος θεωρείται πως είναι TSG101 πρωτεΐνη, καθώς μέσω της UEV (Ubiquitin E2 Variant) δομικής της περιοχής, αλληλεπιδρά με το ουβικιτινωμένο 'φορτίο' και με μέλη του ESCRT-0, όπως η HRS^{125 107}. Η τελευταία αλληλεπίδραση είναι σημαντική για την προσέλκυση του ESCRT-I στα ενδοσώματα¹⁰⁷. Αποσιώπηση του *TSG101* γονιδίου, σε κύτταρα θηλαστικών, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία του πρώιμου ενδοσώματος. Τα πρώιμα ενδοσώματα αποκτούν σωληνοειδή μορφή (tubulation) και τα πολυκυστιδιακά σωματίδια φέρουν μειωμένο αριθμό κυστιδίων στον αυλό τους, μοιάζοντας στους σχηματισμούς των διαμερισμάτων κατηγορίας E που απαντώνται στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μετά από απάλειψη των Vps E γονιδίων^{104 115}.

Το σύμπλεγμα ESCRT-II

Το ESCRT-II αποτελείται από τις πρωτεΐνες Vps36, Vps22 και Vps25 σε αναλογία 1:1:2 (Πίνακας 1.1 και Εικ.1.13)^{126 127}. Η Vps36 φέρει μια GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in Ear45) δομική περιοχή, με τυπική Pleckstrin-Homology (PH) αναδίπλωση, μέσω της οποίας προσδένεται σε 3-φωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσίδια (PtdIns(3)P) εντοπιζόμενη σε ενδοσωματικές μεμβράνες^{128 129}. Παράλληλα, μέσω αυτής της περιοχής δεσμεύει ουβικιτίνη, λειτουργώντας ως φορέας διαλογής και μεταφοράς 'φορτίου'¹²⁹. Η Vps22 επίσης αλληλεπιδρά με λιπίδια, ενώ ο συνδετικός κρίκος με το ESCRT-III φαίνεται να είναι η Vps25 (Εικ.1.12).

Η βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του ESCRT-II στην αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR είναι αντιφατική¹³⁰, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα των θηλαστικών ενδεχομένως να έχουν αναπτύξει ESCRT-II-ανεξάρτητους μηχανισμούς διαλογής 'φορτίου' στο πολυκυστιδιακό σωματίο. Η πρωτεΐνη Alix ενδεχομένως να αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ των -I και -III ESCRT συμπλόκων, όταν το -II δεν είναι λειτουργικά απαραίτητο¹².

Το σύμπλεγμα ESCRT-III

Αυτό αποτελείται από μικρές, υψηλού φορτίου υπομονάδες που συγκροτούνται, σχηματίζοντας πολυμερή, στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων. Στο μύκητα απαρτίζεται από τις Vps2, Vps24, Vps32 (Snf7) και Vps20^{131 132 133}. Ο πυρήνας οργάνωσης αυτού του συμπλέγματος φαίνεται να είναι η Vps20, η οποία τροποποιείται, στο αμινοτελικό της άκρο, με μυριστοϋλίωση και δεσμεύεται σε μεμβράνες. Αυτή η υπομονάδα αλληλεπιδρά

με τη Vps25 του ESCRT-II ¹³⁴ (Εικ.1.12). Επειδή το ESCRT-II περιέχει δυο μόρια Vps25 (Εικόνα 1.13), ένα ESCRT-II αλληλεπιδρά με δυο ESCRT-III συμπλέγματα. Η Vps20 αλληλεπιδρά άμεσα με την Vps32, κάτι που προκαλεί τη συναρμολόγηση νηματοειδών ολιγομερών σχηματισμών της Vps32, τα οποία στο άκρο τους καλύπτονται από την Vps24 ^{132 135}. Η Vps24 με τη σειρά της, αλληλεπιδρά με την Vps2 και η τελευταία στρατολογεί την Vps4 ATPase ¹³². Δυο ακόμη μέλη με μεγάλη ομολογία με τις υπομονάδες του ESCRT-III, η Did2 (CHMP1) και η Vps60, ρυθμίζουν την ενεργότητα της Vps4 και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι σχηματισμού των πολυκυστιδιακών σωματιδίων ¹³⁶. Η πρωτεΐνη Vps4, καταλύει την αποσυναρμολόγηση των ESCRT συμπλεγμάτων και φαίνεται να είναι απαραίτητη για το σχηματισμό ILV, τόσο σε κύτταρα θηλαστικών όσο και στο μύκητα ^{137 138}. Στο μύκητα, εξάλειψη της πρωτεΐνης Vps4 έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση των συστατικών της ESCRT μηχανής στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων, τη μειωμένη αποικοδόμηση φορτίου της κυτταρικής μεμβράνης και τη δημιουργία του τύπου 'Ε διαμερίσματος' ¹³⁹.

Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν το ESCRT-III σύμπλεγμα διαφέρουν από τα μέλη των άλλων ESCRT συμπλεγμάτων στο ότι δεν φέρουν μοτίβα που αλληλεπιδρούν με την ουβικιτίνη. Αντίθετα, αλληλεπιδρούν και προσελκύουν πρωτεΐνες που προκαλούν από-ουβικιτίνωση (DUB) (π.χ. UBPY, AMSH), δηλαδή αφαιρούν τις ουβικιτίνες από τα υποστρώματα. Τα υποστρώματα μπορεί να είναι οι ουβικιτινωμένοι υποδοχείς, έτσι ώστε να ανακυκλωθεί η ουβικιτίνη πριν την ενσωμάτωσή του φορτίου στα ILV ή μπορεί να είναι μέλη των ESCRT συμπλεγμάτων, πολλά από τα οποία υφίστανται ουβικιτίνωση σε μια ή πολλαπλές θέσεις. Επίσης, όπως προαναφέραμε, το ESCRT-III βοηθά στην αποσυναρμολόγηση των ESCRT συμπλεγμάτων μετά το πέρας της λειτουργίας τους. Το ESCRT-III, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των ILV, διότι η υπερέκφραση της υπομονάδας Vps32 σε κύτταρα θηλαστικών προκαλεί το σχηματισμό εκβλαστήσεων από την κυτταρική μεμβράνη, σχηματισμών που μοιάζουν με τα ILV των πολυκυστιδιακών σωματιδίων ¹⁴⁰.

Πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε μύκητες έχουν δείξει πως εξάλειψη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ESCRT πρωτεΐνες, τόσο στο μύκητα όσο και σε κύτταρα θηλαστικών, έχει σαν αποτέλεσμα το μειωμένο σχηματισμό ενδοαυλικών κυστιδίων (ILV) στα ενδοσώματα και τα κενοτόπια, καθώς και τη δημιουργία πολυμεμβρανικών

(multilamellar) ενδοσωμάτων¹⁰⁰. Η διαδικασία δημιουργίας ενδοαυλικών κυστιδίων είναι τοπολογικά αντίθετη με την εκβλάστηση των καλυμμένων κυστιδίων από την κυτταρική μεμβράνη και ο ακριβής μηχανισμός εκβλάστησης αυτών των κυστιδίων δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Υπάρχουν όμως ενδείξεις, πως διάφορα συστατικά των ESCRT συμπλόκων, εκτός από την σύλληψη του φορτίου, συμμετέχουν στην παραμόρφωση της μεμβράνης των ενδοσωμάτων και τη διαδικασία δημιουργίας ενδοαυλικών κυστιδίων⁵⁸. Ωστόσο, η αναστολή της λυσοσωμικής αποικοδόμησης δεν έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπομονάδων του ESCRT-III συμπλέγματος, αποδεικνύοντας ότι οι ESCRT πρωτεΐνες δεν ενσωματώνονται στα ILV και δεν αποικοδομούνται από τα λυσοσώματα¹³¹. Πιθανώς, ο πολυμερισμός τους συμβαίνει από την κυτταροπλασματική πλευρά της ενδοσωματικής μεμβράνης και η αποσυναρμολόγησή τους πραγματοποιείται αμέσως πριν την εκτομή των ILV¹⁰⁵.

1.3.3.2.2 Σύλληψη του φορτίου

Όπως προαναφέρθηκε, τα ESCRT-0, -I και -II φέρουν μοτίβα και δομικές περιοχές που αλληλεπιδρούν άμεσα με την ουβικιτίνη. Διάφορα πειράματα αποδεικνύουν ότι, τα συμπλέγματα αυτά δρουν διαδοχικά και σύμφωνα με τη σειρά αρίθμησης τους^{122 126 141}. Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν το σχηματισμό ενός υπερ-συμπλέγματος ανάμεσα στο -0, -I και -II¹⁴².

Το ESCRT-0, στο πρώιμο ενδόσωμα, μπορεί να χαρακτηριστεί σαν ένα φίλτρο που συγκρατεί τους υποδοχείς που φέρουν ουβικιτίνες. Μεταλλάξεις που καταργούν τη σύνδεση της ουβικιτίνης με τις UIM περιοχές των ESCRT υπομονάδων, μειώνουν και την ικανότητα αποδοτικής διαλογής και αποικοδόμησης του φορτίου¹⁴³. Η συγγένεια σύνδεσης των UIM του ESCRT-0 με την ουβικιτίνη είναι σχετικά χαμηλή¹⁴⁴, κάτι που γεννά ερωτήματα για το πώς αυτό το σύμπλεγμα μπορεί να λειτουργεί αποδοτικά ως μηχανή διαλογής του 'φορτίου'.

Στην περίπτωση του EGFR, η δέσμευση του συνδέτη προκαλεί μονο-ουβικιτίνωση του υποδοχέα σε πολλαπλές θέσεις. Μια πιθανότητα είναι ότι το ESCRT-0, μέσω των πολλαπλών UIM που περιέχει, αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με διάφορα μόρια ουβικιτίνης του 'φορτίου', αυξάνοντας έτσι τη συγγένεια πρόσδεσης. Επιπλέον, ένα μόριο HRS

αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με δυο μόρια ουβικιτίνης, κάτι που ενισχύει περισσότερο την παραπάνω υπόθεση.

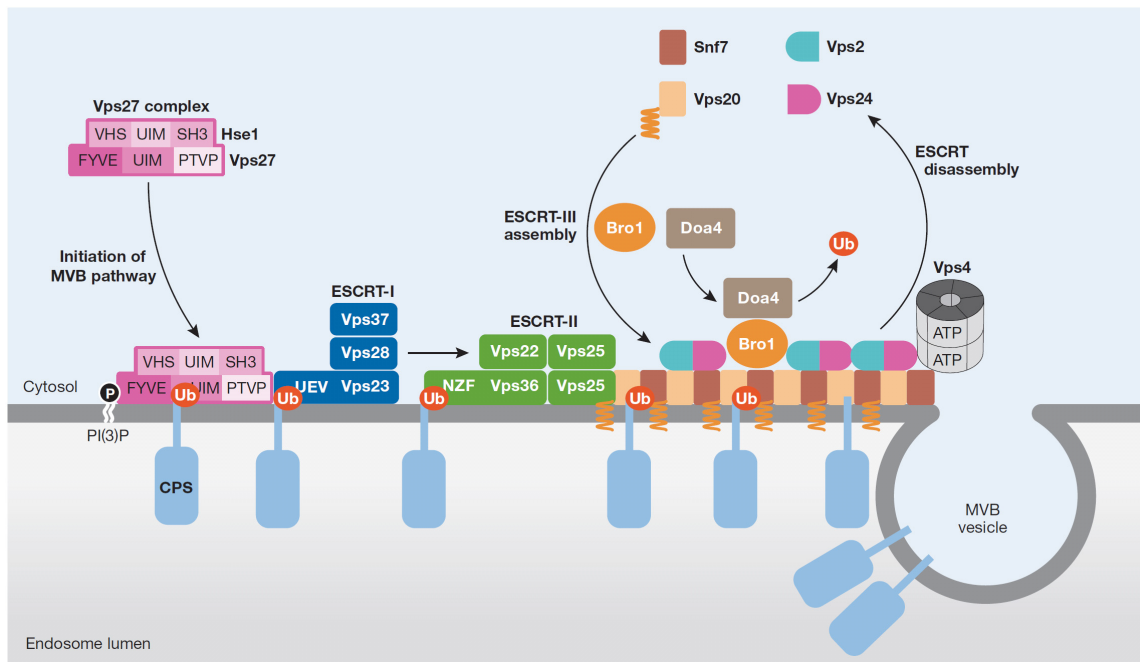
Ένας άλλος τρόπος για να ξεπεραστεί αυτή η αδυναμία του ESCRT-0, είναι να αυξήσει τη συγκέντρωση των μορίων του τοπικά. Το ρόλο αυτό τον έχει αναλάβει η πρωτεΐνη κλαθρίνη. Η πρωτεΐνη αυτή, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HRS και την περιορίζει σε συγκεκριμένες μικρο-περιοχές, ενώ ο πολυμερισμός της αυξάνει τη συγκέντρωση των μορίων της HRS στη μεμβράνη του πρώιμου ενδοσώματος^{108 110 111 112}.

Σε αντίθεση με το ESCRT-0, τα υπόλοιπα ESCRT συμπλέγματα διαθέτουν μόνο από μια υπομονάδα με UIM, οπότε η δυνατότητα τους, ως μηχανή διαλογής και συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που φέρουν ουβικιτίνες, είναι περιορισμένη. Τα παραπάνω, ενισχύουν ακόμη περισσότερο την άποψη πως η δράση τους είναι μεταγενέστερη του ESCRT-0, αφού πρώτα έχει προηγηθεί η συγκέντρωση του φορτίου.

Η ουβικιτίνη δεσμεύεται από τις αντίστοιχες περιοχές των ESCRT-0, -I και -II, μέσω της υδρόφοβης Ile44 (ισολευκίνη), οπότε έχει προταθεί ότι η διαδοχική μεταφορά του φορτίου από το ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα στο άλλο είναι δυνητικά εφικτή (Εικ.3.14).

Η παρόμοια, όμως, συγγένεια πρόσδεσης της ουβικιτίνης με τα μέλη των ESCRT συμπλεγμάτων, γεννά αμφιβολίες για το πώς μπορεί αυτή η μεταφορά να επιτευχθεί. Δυστυχώς, η έλλειψη ενός ολοκληρωμένου μοντέλου που να προβλέπει τη δομή του ESCRT-0, δεν επιτρέπει την απόλυτη κατανόηση των μηχανισμών που μεσολαβούν τη μεταφορά του φορτίου από το -0 στο -I. Ένα ενδεχόμενο είναι πως, διάφορες τροποποιήσεις των ESCRT συμπλεγμάτων μεταβάλλουν τη λειτουργία τους, ρυθμίζοντάς την έτσι σε υψηλό βαθμό. Πραγματικά, τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος υφίστανται φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης¹⁴⁵, καθώς επίσης τροποποιούνται και με μονο-ουβικιτίνωση. Η τελευταία τροποποίηση κρατά αυτές τις υπομονάδες σε ανενεργή μορφή, μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων των UIM με τις ουβικιτίνες που φέρουν¹⁴⁶.

Cargo Recognition/Sorting → Cargo Concentration → MVB Vesicle Formation

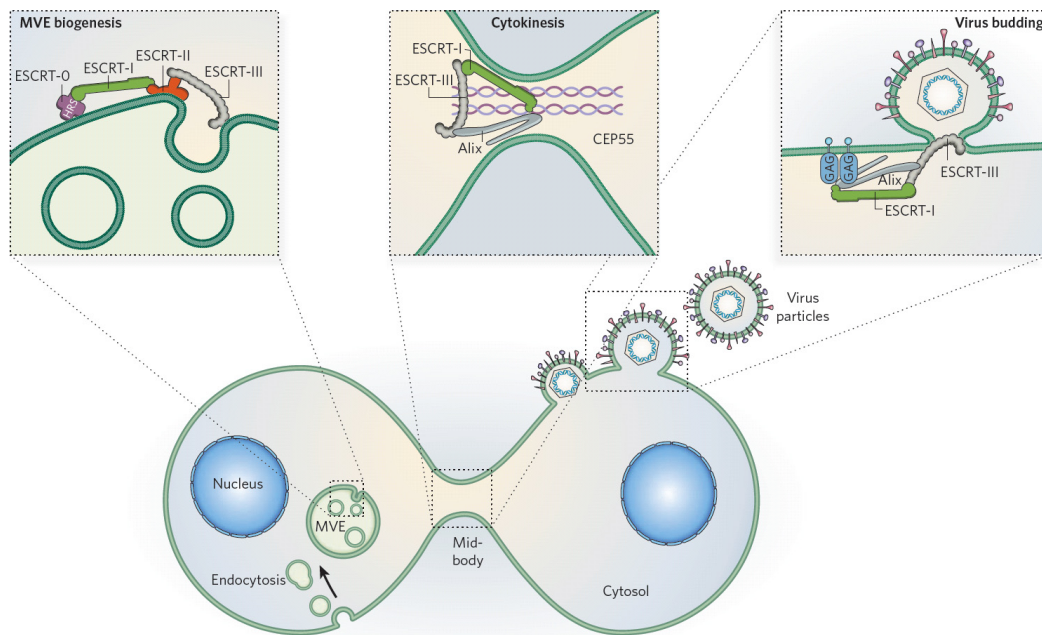


Εικόνα 3.14: Μοντέλο σύλληψης και μεταφοράς του φορτίου, με διαδοχικό τρόπο, από το ένα σύμπλεγμα ESCRT στο άλλο (conveyor belt model). Σύμφωνα με αυτό, τα συμπλέγματα ESCRT παραλαμβάνουν το φορτίο (CPS) σταδιακά, μέσω των μοτίβων αλληλεπίδρασης με την ουβικιτίνη και σύμφωνα με τη σειρά αρίθμησης τους. Το φορτίο τελικά συσσωρεύεται σε ILV στον αυλό των MVB. Η αποουβικιτίνωση του φορτίου από την πρωτεΐνη Doa4 και η αποσυναρμολόγηση των συμπλεγμάτων από την ATPase Vps4, προηγείται της εγκόλπωσης της μεμβράνης. Στην εικόνα χρησιμοποιούνται τα ονόματα των πρωτεϊνών του μύκητα *S. cereavisiae*¹⁴¹.

1.3.3.2.3 Άλλες λειτουργίες του ESCRT συμπλέγματος

Τα συμπλέγματα ESCRT είναι ευρέως γνωστά, κυρίως, για τη λειτουργία τους ως μηχανή διαλογής και αποικοδόμησης των ουβικιτινωμένων υποδοχέων στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων. Ωστόσο διαδραματίζουν και άλλες σημαντικές λειτουργίες, οι οποίες δεν σχετίζονται με τα ενδοσώματα, άλλα με την κυτταροκίνηση και την εκβλάστηση των ιών (Εικ.1.15)¹⁰⁵. Οι διαδικασίες αυτές είναι τοπολογικά ισοδύναμες. Το σύμπλεγμα ESCRT-III, η πρωτεΐνη Vps4 και σε μικρότερο βαθμό η TSG101, φαίνεται να είναι απαραίτητες για την τελική εκτομή των δύο κυττάρων, κατά την κυτταροκίνηση στα κύτταρα των θηλαστικών. Αυτές οι πρωτεΐνες προσελκύονται στο δακτύλιο περίσφιξης (midbody ring), κατά την διάρκεια της κυτταροκίνησης, από την πρωτεΐνη Alix. Επιπρόσθετα, μέλη των ESCRT συμπλεγμάτων, η πρωτεΐνη Vps4 και η πρωτεΐνη Alix

σχετίζονται με την εκβλάση των ιών από την κυτταρική μεμβράνη. Διάφορα μοτίβα στις πρωτεΐνες των ιών, όπως για παράδειγμα στον HIV ή άλλων ιών με φάκελο (enveloped viruses), αλληλεπιδρούν με την TSG101 και την Alix, οι οποίες στη συνέχεια προσελκύουν το σύμπλεγμα ESCRT-III και τελικά επιτυγχάνεται η εκτομή των νεοσυντιθέμενων ιών από την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων ¹¹.



Εικόνα 1.15: Ο ρόλος των ESCRT συμπλόκων σε τρεις διαδικασίες μεμβρανικής εκτομής. (Αριστερά) Βιογένεση των πολικυστιδιακών σωματιδίων (MVB), (μέση) εκτομή θυγατρικού από μητρικό κύτταρο κατά την κυτταροκίνηση και (δεξιά) εκτομή ιικών φακέλων ¹¹.

1.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA

1.4.1 Ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη SARA συνδέεται με γεγονότα κυστιδιακής διακίνησης

Η πρωτεΐνη SARA (SMAD anchor for receptor activation), περιέχει μια FYVE περιοχή (Εικ.1.16) η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά με το PtdIns(3)P λιπίδιο και εντοπίζεται κυρίως στο πρώιμο ενδόσωμα (υποενότητα 1.3.1.1) ^{75 147 148}. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης SARA προκαλεί διόγκωση των πρώιμων ενδοσωμάτων. Ο φαινότυπος αυτός έχει παρατηρηθεί και μετά από υπερέκφραση των πρωτεϊνών EEA1 και της μόνιμα ενεργούς μορφής της Rab5 (RabGTP ή Rab5Q79L). Οι

πρωτεΐνες EEA1 και Rab5 συμμετέχουν στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων (υποενότητα 1.3.1.1) και γι' αυτό έχει προταθεί πως η πρωτεΐνη SARA μπορεί να εμπλέκεται σε διαδικασίες σύντηξης των πρώιμων ενδοσωμάτων.

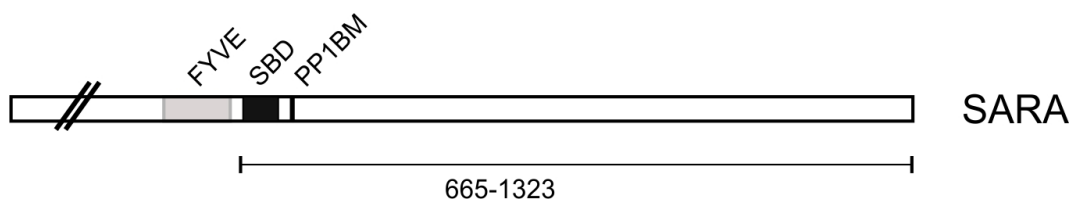
Μια ακόμη ένδειξη ότι η πρωτεΐνη SARA συμμετέχει σε γεγονότα κυστιδιακής διακίνησης, αποτελεί η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης SARA προκαλεί μείωση των υποδοχέων της τρανσφερίνης στην κυτταρική μεμβράνη καθώς και αναστολή της ανακύκλωσης της τρανσφερίνης προς την κυτταρική μεμβράνη¹⁴⁸. Παρόλο που ο μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι στιγμής, φαίνεται πως η τρανσφερίνη και ο υποδοχέας της εγκλωβίζονται στα διογκωμένα πρώιμα ενδοσώματα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι όλα τα παραπάνω αποτελέσματα αντιστρέφονται με την υπερέκφραση της μόνιμα ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης Rab5 (RabGDP ή RabS34N), μια παρατήρηση που δηλώνει πως υπάρχει μια λειτουργική σύνδεση ανάμεσα στη πρωτεΐνη SARA και την ενεργή Rab5 πρωτεΐνη¹⁴⁸.

Επίσης, η πρωτεΐνη SARA βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ροδοψίνη (rhodopsin). Η ροδοψίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ραβδίων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού, σημαντική για την ανίχνευση του φωτός και την αίσθηση της όρασης. Η πρωτεΐνη αυτή πακετάρεται σε μεμβρανικά δισκοειδή οργανίδια στο εξωτερικό τμήμα (OS, outer segment) των φωτοδεκτικών ραβδίων του ματιού. Οι συγγραφείς προτείνουν ένα μοντέλο κυστιδιακής στόχευσης (vesicular target model) στο οποίο η πρωτεΐνη SARA, το PtdIns(3)P λιπίδιο και μέλη των SNARE πρωτεϊνών όπως η Syntaxin-3, διαμεσολαβούν την κυστιδιακή μεταφορά και την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης ροδοψίνης στα μεμβρανικά δισκοειδή οργανίδια. Σε αυτό το μοντέλο, η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την ροδοψίνη, την Syntaxin-3 και άλλα μέλη του συμπλέγματος των SNARE, όπως η Vamp2 και η SNAP25 (υποενότητα 1.3.1.1). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η πρόσδεση νέων κυστιδίων που περιέχουν την πρωτεΐνη ροδοψίνη στη μεμβράνη των δισκοειδών οργανιδίων, στα κύτταρα των ραβδίων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού¹⁴⁹.

1.4.2 Η σημασία της πρωτεΐνης SARA στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και την Ακτιβίνη

Η πρωτεΐνη SARA ρυθμίζει τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ, τόσο θετικά όσο και αρνητικά. Ανακαλύφθηκε σαν μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά άμεσα με τις μη φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες SMAD2/3 (R-SMAD)^{150 151}. Η πρωτεΐνη SARA ελέγχει τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης SMAD2 και φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ, transforming growth factor β)¹⁵⁰.

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη SARA μέσω του καρβοξυτελικού της τμήματος αλληλεπιδρά και με τους υποδοχείς του TGFβ¹⁵⁰. Οι υποδοχείς του TGFβ και της ακτιβίνης είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με ενεργότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης και διακρίνονται σε τύπου I (ALK4,5) και τύπου II (TβRII, ActRII). Οι υποδοχείς τύπου II, έχουν συνεχή ενεργότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Η σύνδεση του TGFβ ή της ακτιβίνης στους υποδοχείς προκαλεί το σχηματισμό τετραμερούς συμπλέγματος μεταξύ δύο τύπου I και δύο τύπου II υποδοχέων, στο οποίο οι τύπου II φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τους τύπου I υποδοχείς. Στη συνέχεια, οι τύπου I υποδοχείς μεταδίδουν το σήμα, φωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνες SMAD2/3. Οι SMAD2/3, σχηματίζουν σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη SMAD4 (co-SMAD) και το σύμπλεγμα αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ελέγχει τη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων στόχων (Εικ.1.18, πάνω)¹⁵².



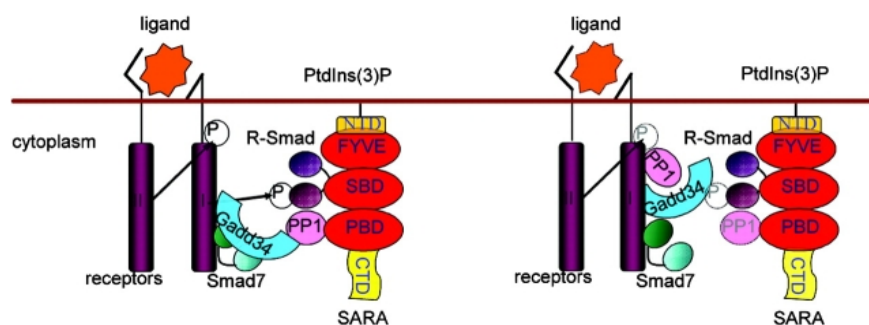
Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης SARA. Η FYVE περιοχή έχει εκτενώς αναλυθεί στην υποενότητα του πρώιμου ενδοσώματος. SBD (SMAD binding domain) περιοχή πρόσδεσης με τις πρωτεΐνες SMAD2/3, PP1BM (Protein phosphatase binding motif) περιοχή πρόσδεσης με την PP1 φωσφατάση. Η περιοχή από το 665-1323 χρησιμοποιήθηκε στη σάρωση του διπλού υβριδίου^{150 155}.

Οι υποδοχείς αυτοί, μετά από επαγωγή με τον αυξητικό παράγοντα TGFβ, ενδοκυτταρώνονται και εντοπίζονται για κάποιο χρόνο στο πρώιμο ενδόσωμα. Η πρωτεΐνη SARA, μέσω της SBD (SMAD binding domain) περιοχής (Εικ.1.16) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SMAD2 και θεωρείται ως ο συνδετικός κρίκος της πρωτεΐνης SMAD2 με

τους υποδοχείς τύπου I, διευκολύνοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της. Με αυτό τον τρόπο, το πρώιμο ενδόσωμα, στο οποίο κυρίως εντοπίζεται η πρωτεΐνη SARA, πιστεύεται πως αποτελεί μια 'πλατφόρμα', όπου πραγματοποιείται η φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών και η μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ^{150 97}.

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη cPML έχει δειχθεί πως αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SARA, τις πρωτεΐνες SMAD2/3 και με τους υποδοχείς του TGFβ μονοπατιού, βοηθώντας στη συναρμολόγηση του συμπλέγματος SARA/SMAD/υποδοχείς και την προώθηση του σήματος από τον TGFβ¹⁵³. Ακόμη έχει αναφερθεί πως η HRS, μια πρωτεΐνη με FYVE περιοχή που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR (υποενότητα 1.3.3.2.1, ESCRT-0), αλληλεπιδρά με τις SMAD2/3 και βοηθάει στη φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών από τους υποδοχείς της ακτιβίνης, σε συνεργασία με την πρωτεΐνη SARA¹⁵⁴.

Άλλες μελέτες όμως δείχνουν ότι η πρωτεΐνη SARA ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγωγή σήματος από τον TGFβ. Η πρωτεΐνη SARA μέσω του PPBM (PP1 binding motif) (Εικ.1.15) αλληλεπιδρά με την καταλυτική υπομονάδα c της PP1 φωσφατάσης, που αποφωσφορυλιώνει κατάλοιπα σερίνης-θρεονίνης¹⁵⁵. Η υπομονάδα PP1c, αλληλεπιδρά με τη ρυθμιστική υπομονάδα Gadd34 και το ολοένζυμο που σχηματίζεται αποφωσφορυλιώνει τους τύπου I υποδοχείς, με ένα μηχανισμό που ρυθμίζεται από την ανασταλτική πρωτεΐνη SMAD7 (I-SMAD) (Εικ.1.17). Η πρωτεΐνη SARA φαίνεται να ρυθμίζει την κυτταρική εντόπιση και να ενισχύει τη διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης PP1c για το σχηματισμό ενός λειτουργικού συμπλέγματος που απενεργοποιεί τους TGFβ υποδοχείς και σταματά την μετέπειτα μεταγωγή του σήματος (Εικ.1.17)¹⁵⁶.



Εικόνα 1.17: Προτεινόμενο μοντέλο που εξηγεί την αποφωσφορυλίωση των υποδοχέων τύπου I του αυξητικού παράγοντα TGFβ από τις πρωτεΐνες PP1c, Gadd35, SMAD7 και SARA. Ο μηχανισμός περιγράφεται στο κείμενο¹⁵⁶.

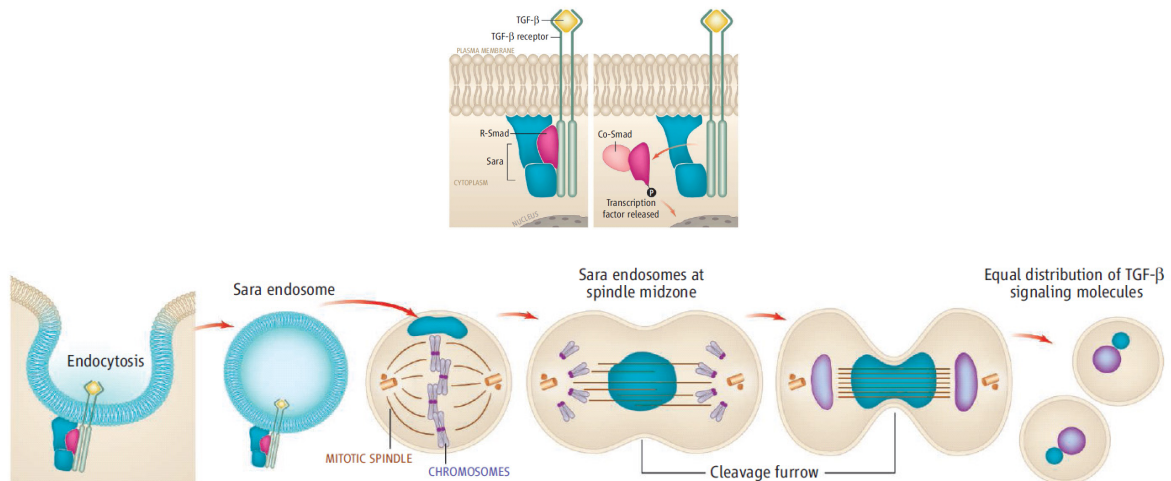
Παρόλο που έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τη σημασία της αλληλεπίδρασης των SMAD2/3 με την πρωτεΐνη SARA στη μεταγωγή σήματος από τον TGFβ και την ακτιβίνη, ο ρόλος της δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος. Ο Goto και οι συνεργάτες του υποστηρίζουν πως, σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών SMAD2/SARA, η αλληλεπίδραση της SMAD3 με την πρωτεΐνη SARA δεν είναι σημαντική για τη μεταγωγή του σήματος που διαμεσολαβείται από τον TGFβ¹⁵⁷. Παράλληλα, ο Runyan και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ως σύστημα μελέτης μεσαγγειακά κύτταρα από ανθρώπινο νεφρό, υποστηρίζουν ότι η ενδογενής πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την ενδογενή πρωτεΐνη SMAD2 μόνο μετά από επαγωγή με TGFβ. Η παραπάνω παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη και οι συγγραφείς παρουσιάζουν ένα παραλλαγμένο μηχανισμό για τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεΐνη SARA συμμετέχει στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τον TGFβ¹⁵⁸. Ακόμη, η αναστολή της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων από την κυτταρική μεμβράνη δεν φαίνεται να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της SMAD2 πρωτεΐνης, οπότε η ενεργοποίηση των SMAD2 μπορεί να επιτευχθεί στην κυτταρική μεμβράνη και με μηχανισμούς ανεξάρτητους από την πρωτεΐνη SARA¹⁵⁹.

Είναι λοιπόν εμφανές ότι ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης SARA στο TGFβ/SMAD μονοπάτι δεν είναι απόλυτα σαφής. Πιθανώς, η πρωτεΐνη SARA, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή τη φάση διαφοροποίησης των κυττάρων, διαδραματίζει και διαφορετικό ρόλο στο TGFβ/SMAD μονοπάτι. Η έλλειψη ενός πειραματικού *in vivo* μοντέλου γονιδιακής αποσιώπησης (Knock out) του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου δεν μας βοηθά στο να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος στο παραπάνω μονοπάτι¹⁶⁰.

1.4.3 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SARA κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης

Πρόσφατα ένας πρόσθετος ρόλος αποδόθηκε στην πρωτεΐνη SARA. Ο Bokel και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ως σύστημα μελέτης την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων των φτερών της *Dr. Melanogaster*, απέδειξαν πως, κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, τα ενδοσώματα που περιέχουν την πρωτεΐνη SARA μετακινούνται προς το κέντρο της ατράκτου (central spindle) και μετά το πέρας της μίτωσης διανέμονται ισόποσα στα δύο θυγατρικά κύτταρα (Εικ.1.18, κάτω). Τα ενδοσώματα αυτά παίζουν ρόλο στην ισότιμη κατανομή των συστατικών του TGFβ (Dpp, Decapentaplegic

στη *Dr. melanogaster*) κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, όπως για παράδειγμα των TGFβ-υποδοχέων Tkv (Thickvein). Ο μηχανισμός εξασφαλίζει ότι η κατάσταση ενεργοποίησης του TGFβ/SMAD μονοπατιού παραμένει η ίδια στα δύο θυγατρικά κύτταρα (Εικ.1.18 κάτω)^{161 162}.



Εικόνα 1.18: Τα ενδοσώματα που περιέχουν την SARA εξασφαλίζουν την ισόποση κατανομή των υποδοχέων του TGFβ κατά την κυτταρική διαίρεση. (πάνω) Η πρωτεΐνη SARA συνδέεται ταυτόχρονα σε λιπίδια, στους TGFβ-υποδοχείς και στις R-SMAD. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, οι R-SMAD φωσφορυλιώνονται, αποδεσμεύονται από την SARA και αλληλεπιδρούν με την co-SMAD σχηματίζοντας ένα λειτουργικό σύμπλεγμα μεταγραφής. (κάτω) Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, τα ενδοσώματα που περιέχουν την πρωτεΐνη SARA, καθώς και τα συστατικά με τα οποία αλληλεπιδρά, προσελκύνονται στη μιτωτική άτρακτο και κατανέμονται ισόποσα στα δύο θυγατρικά κύτταρα¹⁶².

1.4.4 Αποτελέσματα από το σύστημα του διπλού υβριδίου

Θέλοντας να διαλευκάνουμε το ρόλο της πρωτεΐνης SARA, τόσο στην μεταγωγή σήματος από τον TGFβ/Ακτιβίνη όσο και στην κυστιδιακή διακίνηση, έγινε μια προσπάθεια ταυτοποίησης πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA. Η μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν αυτή του διπλού υβριδίου και η σάρωση πραγματοποιήθηκε με μια cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινου πλακούντα σε συνεργασία με την εταιρεία Hybrigenics (<http://www.hybrigenics.com>). Ως δόλωμα για την αλίευση πρωτεϊνών-θηραμάτων χρησιμοποιήθηκε το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης SARA, το οποίο εκτείνεται από το 665-1323 αμινοξύ (Εικ.1.16). Το τμήμα αυτό φέρει δυο καλά χαρακτηρισμένες περιοχές της πρωτεΐνης SARA, μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με τις

πρωτεΐνες SMAD2/3 (SBD)¹⁵⁰ και την PPP1CA φωσφατάση (PPBM)¹⁵⁵. Τα αποτελέσματα της σάρωσης φαίνονται στον πίνακα 1.2.

Ο πίνακας περιέχει τόσο γνωστές πρωτεΐνες (SMAD2/3, PP1a), αποδεικνύοντας ότι η σάρωση ήταν επιτυχής, όσο και άγνωστες πρωτεΐνες, πιθανοί τελεστές (effectors) της πρωτεΐνης SARA με εξαιρετικό ενδιαφέρον η κάθε μία. Μεταξύ των άγνωστων θετικών κλώνων, βρέθηκαν 15 για την Ring-H2 E3 λιγάση, RNF11 (Ring Finger protein 11).

	Όνομα πρωτεΐνης	PBS		Όνομα πρωτεΐνης	PBS
1	DAZAP2	A	17	BMP4	D
2	Erbin	A	18	DKFZP566I1024	D
3	ETS2	A	19	FHL2	D
4	FLJ20037	A	20	FLJ22369	D
5	IMAGE 3510047	A	21	IMAGE 3882729	D
6	PPP1CA	A	22	IMAGE 5269682	D
7	PPP1CB	A	23	JUP	D
8	PPP1CC	A	24	MIRO-2	D
9	RNF11	A	25	NIT1	D
10	SMAD2	A	26	PPP2R1A	D
11	beta-catenin	B	27	RBQ-1	D
12	FLJ90754	B	28	RNPEP	D
13	NUP155	B	29	SUPT5H	D
14	PRKCBP1	C	30	TAHCCP1	D
15	Smad3	C	31	ZNF36	D
16	BAT3	D	32	EIF4G1	D

Πίνακας 1.2: Συγκεντρωτικός πίνακας των πρωτεϊνών που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης SARA (SARAΔ1-664), στη σάρωση του διπλού υβριδίου. Οι SMAD2/3 και PPP1CA είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη SARA. Η κατηγορία αξιοπιστίας (PBS, Predicted biological score) συμβολίζεται με A, B, C και D, περιγράφοντας τις αλληλεπιδράσεις με μεγάλη (A) ή με μικρότερη (D) πιθανότητα να είναι αληθινές.

1.5 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11

1.5.1 Έκφραση της πρωτεΐνης RNF11

Η πρωτεΐνη RNF11 (Ring finger protein 11), ανακαλύφθηκε ως μια πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από καρκίνο του μαστού¹⁶³. Είναι μια RING-H2 πρωτεΐνη, η οποία διαθέτει 154 αμινοξέα και το γονίδιο που την

κωδικοποιεί εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1p31-32)¹⁶⁴. Εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στον πνεύμονα, στο έντερο, στα νεφρά, στο πάγκρεας, στη σπλήνα, στον προστάτη, στον θύμο αδένα, στο συκώτι και στα λεμφοκύτταρα, ενώ αυξημένα επίπεδα έχουν παρατηρηθεί στην καρδιά, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μυς και στους όρχεις¹⁶⁴¹⁶³. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της πρωτεΐνης RNF11 έδειξε πως υπερεκφράζεται ισχυρά στο >90% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού, σε αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος (78%) και σε καρκίνους του εντέρου (47%) και της ουροδόχου κύστης (31%). Μέτρια έκφρασή της παρατηρείται σε περιπτώσεις καρκίνων της κεφαλής-τραχήλου (63%) και του πνεύμονα (57%), ενώ σε περιπτώσεις καρκίνου των νεφρών και του προστάτη παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης και μόνο στο 10% των περιπτώσεων¹⁶⁵.

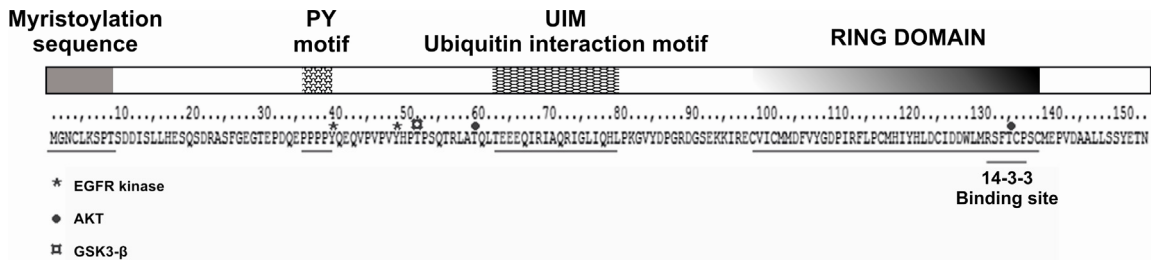
1.5.2 Δομικές περιοχές και μοτίβα της πρωτεΐνης RNF11

Η πρωτεΐνη RNF11 διαθέτει διάφορες δομικές περιοχές και μοτίβα, οι οποίες μεσολαβούν αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος και στην διαμεσολαβούμενη από ουβικιτίνη πρωτεόλυση (Εικ.1.19).

Βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης RNF11 προβλέπει πως, στο αμινοτελικό της άκρο υπάρχει μια αλληλουχία μυριστοϋλίωσης (Εικ.1.19). Η μυριστοϋλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία μια ομάδα μυριστοϋλίου προστίθεται ομοιοπολικά στην ακραία γλυκίνη της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης. Η τροποποίηση αυτή προκαλεί μεμβρανική στόχευση πολλών πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια υπάρχει ένα μοτίβο PY (PPXY, X οποιοδήποτε αμινοξύ) (Εικ.1.19). Στο μοτίβο αυτό προσδένονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν WW μοτίβα, όπως οι τύπου HECT E3-λιγάσες ουβικιτίνης (υποενότητα 1.2.2.2). Στο εσωτερικό της WW-δομικής περιοχής συντηρημένα κατάλοιπα τρυπτοφάνης σχηματίζουν μια υδρόφοβη 'τσέπη' (hydrophobic pocket), ικανή να δεσμεύει τις πλούσιες σε προλίνες αλληλουχίες του PY μοτίβου. Μέσω του PY μοτίβου, η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με την WW1-δομική περιοχή της AIP4/Itch E3-λιγάσης¹⁶³, τις WW2&3 της Smurf2 E3-λιγάσης¹⁶⁵, τις WW1&3 της WWP1 E3-λιγάσης¹⁶⁶ και την WW3 της NEDD4 E3-λιγάσης¹⁶⁷. Ενδιαφέρουσα, από εξελικτική ματιά, είναι η παρατήρηση ότι το μοτίβο αυτό υπάρχει μόνο στα ομόλογα της

πρωτεΐνης RNF11 των σπονδυλωτών¹⁶³. Αξιοσημείωτο επίσης αποτελεί το γεγονός ότι το PY μοτίβο της πρωτεΐνης RNF11 είναι πανομοιότυπο με το PY μοτίβο που συναντάται στις ανασταλτικές SMAD6/7 πρωτεΐνες των TGFβ και BMP μονοπατιών.



Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών και μοτίβων που διαθέτει η πρωτεΐνη RNF11. Διακρίνουμε μια προβλεπόμενη θέση μυριστοϋλίωσης, ένα PY μοτίβο, μια πιθανή περιοχή σύνδεσης με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη (UIM) και μια RING (Really interesting new gene) δομική περιοχή. Στο εσωτερικό της RING δομικής περιοχής υπάρχει μια θέση πρόσδεσης με τις 14-3-3 πρωτεΐνες. Επίσης με τα διάφορα σύμβολα παρουσιάζονται οι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης¹⁷⁰.

Στο μέσο της πρωτεΐνης RNF11, πιθανώς, υπάρχει ένα μοτίβο αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη (UIM) (υποενότητα 1.2.2.2). Όπως προαναφέραμε, οι πρωτεΐνες που διαθέτουν το UIM μοτίβο μπορούν να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη ουβικιτίνη ή με την ουβικιτίνη των σημασμένων πρωτεϊνών (Εικ.1.19).

Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης RNF11 υπάρχει μια RING-H2 (C3H2C3) δομική περιοχή, η οποία δεσμεύει δύο ιόντα ψευδαργύρου (Zn) (Εικ.1.19). Η RING-H2 είναι μία παραλλαγή της κλασσικής RING (C3HC4, C-X2-C-X[9-39]-C-X[1-3]-H-X[2-3]-C-X2-C-X[4-48]-C-X2-C, όπου C: κυστεΐνη, H: ιστοιδίνη και X: οποιοδήποτε αμινοξύ) περιοχής, στην οποία μία ιστοιδίνη έχει αντικαταστήσει την τέταρτη κατά σειρά κυστεΐνη του κλασσικού RING μοτίβου. Οι RING δομικές περιοχές εντοπίζονται κυρίως σε πυρηνικές πρωτεΐνες και σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με το DNA ή με άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες με RING δομική περιοχή (RING πρωτεΐνες) παίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες ουβικιτίνωσης και εμπλέκονται στη μεταγωγή του σήματος, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση¹⁶⁸. Οι περισσότερες πρωτεΐνες RING διαθέτουν εγγενή δραστηριότητα E3-λιγάσης ουβικιτίνης, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη Cbl που εμπλέκεται στην ουβικιτίνωση και την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα EGFR. Η RING περιοχή συνήθως διαμεσολαβεί τη σύνδεση των πρωτεϊνών που τη φέρουν με ένζυμα

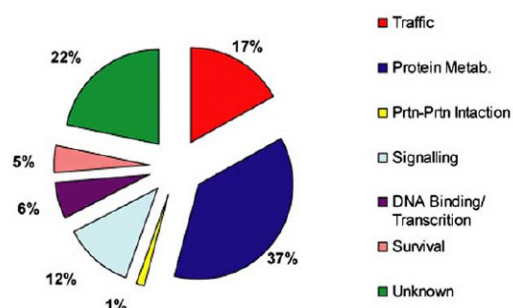
σύζευξης της ουβικιτίνης. Μέσω αυτής της δομικής περιοχής πιστεύεται πως η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τα E2-ενζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης, UbcH5a,b,c ¹⁶⁵. Έτσι λοιπόν η πρωτεΐνη RNF11 διαθέτει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό. Μέσω της RING δομικής περιοχής αλληλεπιδρά με E2-ένζυμα ¹⁶⁹ και λειτουργεί ως E3-λιγάση, ενώ ταυτόχρονα, μέσω του PY μοτίβου, αλληλεπιδρά με τις HECT E3-λιγάσες της ουβικιτίνης (υποενότητα 1.2.2.2).

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως η πρωτεΐνη RNF11 διαθέτει ένα μοτίβο πρόσδεσης με τις πρωτεΐνες 14-3-3 (RXXS/T(p)XP, X οποιοδήποτε αμινοξύ) μέσα στη RING δομική περιοχή (Εικ.1.19). Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με την 14-3-3 πρωτεΐνη, με τρόπο που ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης (T) στη θέση 135 της πρωτεΐνης RNF11 από την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT ¹⁷⁰. Είναι γνωστό ότι η δέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών σε διάφορα υποστρώματα έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών-υποστρώματα. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης RNF11, η ενεργοποίηση από την AKT και η δέσμευση στην πρωτεΐνη 14-3-3 φαίνεται να οδηγεί σε πρωτεασωματική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης RNF11. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποια αποδεδειγμένη λειτουργία αυτής της ρυθμιζόμενης αλληλεπίδρασης.

Εκτός από την γνωστή θέση φωσφορυλίωσης στη T135 από την AKT, η πρωτεΐνη RNF11 προβλέπεται ότι διαθέτει διάφορες άλλες θέσεις φωσφορυλίωσης (Εικ.1.19) (<http://scansite.mit.edu/>). Ακόμη, βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης RNF11 προβλέπει την ύπαρξη μοτίβων (40-YQE-Q43 και 85-YDP-Q88), που μπορεί, εν δυνάμει, να αλληλεπιδρούν με την SH2 δομική περιοχή και ενός μοτίβου λευκίνης (11-DDISLL-16) (<http://elm.eu.org/>). Το τελευταίο μοτίβο, περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 1.2.2.1.3 και μπορεί να αποτελέσει σήμα για ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών από την κυτταρική μεμβράνη. Επιπρόσθετα, μέσω αυτού του μοτίβου λευκίνης, η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τη VHS δομική περιοχή της πρωτεΐνης GGA1 ¹⁶⁷. Όλες οι παραπάνω πιθανές τροποποιήσεις και μοτίβα ενδεχομένως ρυθμίζουν την κυτταρική εντόπιση, την αλληλεπίδραση με διάφορες πρωτεΐνες και τη λειτουργία της πρωτεΐνης RNF11.

1.5.3 Η βιολογική σημασία της πρωτεΐνης RNF11

Οι βιβλιογραφικές αναφορές για την πρωτεΐνη RNF11 είναι λιγοστές, ωστόσο έχει συζητηθεί η πιθανή συμμετοχή της σε πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα στη ρύθμιση μονοπατιών μεταγωγής σήματος, στην ουβικιτίνωση, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στον καρκίνο ¹⁷¹ και την εκδήλωση ασθενειών όπως η νόσος του Parkinson ¹⁷². Τα πειραματικά δεδομένα όμως που υποστηρίζουν τις παραπάνω υποθέσεις, είναι ελάχιστα. Σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της σημασίας της πρωτεΐνης RNF11 αποτελεί μια σάρωση διπλού υβριδίου, η οποία αποκάλυψε πολλές πρωτεΐνες με τις οποίες ενδεχομένως αλληλεπιδρά ^{171 173}. Στην εικόνα 1.20 φαίνεται η κατανομή των αλιευμένων πρωτεϊνών σε διαφορές κατηγορίες. Από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά, φαίνεται πως η πρωτεΐνη RNF11 σχετίζεται με διαδικασίες πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (protein metabolism), μεμβρανικής μεταφοράς (trafficking) και ρύθμισης της μεταγραφής (transcription).



Εικόνα 1.20: Κατανομή των αλιευμένων πρωτεϊνών από τη σάρωση του διπλού υβριδίου της πρωτεΐνης RNF11 ^{171 173} σε κατηγορίες ανάλογα με την λειτουργία που αυτές συμμετέχουν.

Όπως αναφέραμε, η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τη Smurf2, μια E3 λιγάση που ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τον TGFβ. Η πρωτεΐνη Smurf2 αλληλεπιδρά με την ανασταλτική SMAD7 και προκαλεί την πρωτεασωμική αποικοδόμηση του τύπου I υποδοχέα του TGFβ αυξητικού παράγοντα (TβRI). Έχει προταθεί πως η πρωτεΐνη RNF11 δρα προστατευτικά στο μονοπάτι μεταγωγής του TGFβ, διότι ανταγωνίζεται με την SMAD7 για την πρόσδεση με την Smurf2 και καταστέλλει την πρωτεασωμική αποικοδόμηση των υποδοχέων. Ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη RNF11 προκαλεί ουβικιτίνωση και πιθανόν αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Smurf2. Ωστόσο, ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11/Smurf2 στο μονοπάτι μεταγωγής από

τον TGFβ δεν είναι γνωστός και η παραπάνω υπόθεση ανταγωνισμού δεν έχει αποδειχθεί πειραματικά.

Η πρωτεΐνη RNF11 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη AMSH και μάλιστα φαίνεται πως η αλληλεπίδραση διατηρείται, είτε μεταλλάσσοντας το PY μοτίβο, είτε μεταλλάσσοντας τη RING δομική περιοχή. Η πρωτεΐνη AMSH εμπλέκεται τόσο στην αποικοδόμηση του EGFR υποδοχέα όσο και στο TGFβ μονοπάτι. Πέρα από τη λειτουργία της ως ένζυμο που αφαιρεί τις ουβικιτίνες από τις σημασμένες πρωτεΐνες (DUB), η πρωτεΐνη AMSH έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τις ανασταλτικές πρωτεΐνες SMAD6/7 των TGFβ/BMP μονοπατιών, αναστέλλοντας τη δράση τους. Έχει προταθεί ότι, η πρωτεΐνη RNF11 μαζί με την Smurf2 προκαλούν ουβικιτίνωση και μειώνουν τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης AMSH¹⁶⁸. Ωστόσο, μόνο η αλληλεπίδραση των RNF11 και AMSH έχει αποδειχθεί πειραματικά, αλλά η βιολογική σπουδαιότητα αυτού του συμπλέγματος παραμένει άγνωστη.

Επιπρόσθετα η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη WWP1, μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα των EGFR και ErbB2 υποδοχέων¹⁶⁶. Οι συγγραφείς αποδεικνύουν πως, η WWP1 προκαλεί μονή ή πολλαπλή ουβικιτίνωση της πρωτεΐνης RNF11, χωρίς όμως η τροποποίηση αυτή να προκαλεί την αποικοδόμησή της πρωτεΐνης RNF11. Επίσης αποδεικνύεται πως, η εξάλειψη της πρωτεΐνης RNF11 αυξάνει τα επίπεδα των υποδοχέων EGFR και ErbB2, αυξάνει την φωσφορυλίωση των ERK1/2 μετά από επαγωγή με EGF και αυξάνει τον EGF-επαγόμενο πολλαπλασιασμό των MCF10A κυττάρων¹⁶⁶. Ωστόσο, η συσχέτιση της αλληλεπίδρασης των WWP1 και RNF11 πρωτεϊνών στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων EGFR και ErbB2 δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Ακόμη ο Anderson και οι συνεργάτες του έδειξαν πως η πρωτεΐνη RNF11 συσσωρεύεται στα σωμάτια και τους νευρώνες Lewy σε ασθενείς με την ασθένεια του Parkinson, οπότε προτείνεται ότι μπορεί να σχετίζεται με την εκδήλωση αυτής της ασθένειας¹⁷². Επίσης, η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες A20, Itch και TAX1BP1 έπειτα από επαγωγή με TNF (Tumor necrosis factor) και ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του NF-κΒ^{174 175}.

Με βάση όλα τα παραπάνω, διαφαίνεται πως η πρωτεΐνη RNF11 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όσο και στην κυστιδιακή

ενδοκυτταρική διακίνηση (Εικ.1.20). Έτσι, θεωρήσαμε πως η πρωτεΐνη RNF11 αποτελεί ένα ενδιαφέρον μόριο, για να μελετήσουμε την σημασία της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη SARA.

1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς διαφόρων αυξητικών παραγόντων, μετά την ενδοκυττάρωσή τους από την κυτταρική μεμβράνη, διακινούνται, ανάλογα με τα 'μηνύματα' που φέρουν, σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα μέσω κυστιδίων μεταφοράς. Τόσο η τύχη των υποδοχέων/προσδεμάτων, όσο και η μετάδοση των καθοδικών σηματοδοτικών τους μηνυμάτων, ρυθμίζονται σε υψηλό βαθμό από διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες διαμερισματοποιούνται κατά μήκος των μονοπατιών διακίνησης, ελέγχοντας τις παραπάνω διαδικασίες. Μία από αυτές είναι η πρωτεΐνη SARA, η οποία εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από τον TGFβ και σε γεγονότα κυστιδιακής μεταφοράς. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε σάρωση διπλού υβριδίου προκειμένου να ανιχνευτούν πρωτεΐνες-τελεστές της SARA. Από τις ταυτοποιηθείσες πρωτεΐνες επιλέξαμε για περαιτέρω μελέτη την RNF11, μια RING-H2 πρωτεΐνη που συμμετέχει σε διαδικασίες ουβικιτίνωσης και μεταγωγής σήματος, με στόχο:

- την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη SARA
- την μελέτη της κυτταρικής της κατανομής σε σχέση με αυτήν της πρωτεΐνης SARA και
- την διαλεύκανση του ρόλου της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11/SARA, στην κυστιδιακή διακίνηση και τη μεταγωγή σήματος υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.

2 **ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1 **ΥΛΙΚΑ**

2.1.1 **Αντισώματα και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες**

Ο ανασυνδυασμένος αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1 (Transforming growth factor-β1, TGFβ1) αγοράστηκε από την εταιρία Peprotech (New Jersey, USA), η ακτιβίνη A (Activin A) προσφέρθηκε από τον Yuzuru Etoh (Ajinomoto Co., Japan) και τον Marko Hyvonen (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK), ενώ ο hEGF ή ο Rh-EGF αγοράστηκαν από την εταιρεία ImmunoTools (GmbH, Friesoythe, Germany). Το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου α-EEA1 προσφέρθηκε από τον Marino Zerial (MPI-CBG, Dresden, Germany). Τα αντισώματα α-Lamp1 (DSHB), α-EEA1 (Transduction Laboratories), α-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), α-HA (Roche), α-SARA (Santa Cruz), α-EGFR (Santa Cruz), α-Dynamin (Transduction Laboratories), α-SMAD4 (Santa Cruz), α-SMAD2/3 (Santa Cruz), α-SMAD2 (Zymed), α-SMAD3 (Zymed), α-GFP (Roche), α-actin (Chemicon), α-tubulin (DSHB) χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες ανοσοφθορισμού, ανοσοκατακρημνίσεων (IP) ή ανοσοαποτύπωσης (IB). Το 9E10 (α-myc) μονοκλωνικό αντίσωμα καθарίστηκε από το αντίστοιχο υβρίδωμα (hybridoma) χρησιμοποιώντας κλασσικές τεχνικές. Πολυκλωνικό αντίσωμα προερχόμενο από κουνέλι δημιουργήθηκε σε συνεργασία με την εταιρία Davids Biotechnology (Germany) (<http://www.dabio.de/>), χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-RNF11 και καθарίστηκε με τη western strip δοκιμασία όπως περιγράφεται στην ιστοσελίδα <http://ivaan.com/protocols/121.html>. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει μόνο την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη σε πειράματα ανοσοφθορισμού ή ανοσοαποτύπωσης. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με την ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP, Horse raddish peroxidase) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης ή τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθειανική φλουερεσκεΐνη ή ισοθειανική ροδαμίνη ή κυανίνη-5 (FITC, TRITC ή CY5) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες του ανοσοφθορισμού, αγοράστηκαν από την εταιρία Jackson-Dianova (GmbH, Hamburg, Germany).

2.1.2 Φορείς έκφρασης πρωτεϊνών και siRNAs

Ο hRNF11 cDNA κλώνος της πλήρους μήκους πρωτεΐνης (IRATp970A1119D) αγοράστηκε από την εταιρία imaGenes. Οι pcDNA3.1 RNF11, pcDNA3.1 RNF11-HA, pcDNA3 HA-RNF11, pcDNA3.1 RNF11-HA G2A, pcDNA3.1 RNF11-HA Y40A, pcDNA3.1 RNF11-HA C99A, pcDNA3.1 RNF11-HA Δ59-95, pEGFP-N1-RNF11, pcDNA3-RNF11-mcherry, Pgem-RNF11-HA, PGEX-6P-1 RNF11, PGEX-6P-1 RNF11Δ59-95, PGEX-6P-1 RNF11Δ1-58, PGEX-6P-1 RNF11Δ96-154, PGEX-6P-1 RNF11 59-95, pcDNA3-HA-SARA1, pcDNA3-HA-SARA2, pcDNA3-HA-SARA3, pEGFP-C2-SARA and Pgem-FLAG-SARA δημιουργήθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές που περιγράφονται στον πίνακα 2.1 και/ή με κλασσικές τεχνικές κλωνοποίησης. Η σωστή κωδική αλληλουχία όλων των κατασκευών επιβεβαιώθηκε με DNA ανάλυση (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany). Το συμπληρωματικό DNA των RNF11-Y40A και RNF11-C99A προσφέρθηκε από τον Edward Harhaj¹⁷⁴. Οι pcDNA3-myc-ENDOFIN, Pgem-Myc-STAM2, pcDNA3-myc-Eps15, pcDNA3-myc-Eps15β και pcDNA-myc-HRS προσφέρθηκαν από τον Harald Stenmark (The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway). PCB-HA-Dynamin-I K44A, PCB-HA-Dynamin-I and pcDNA3-myc-Rabenosyn5 προσφέρθηκαν από τον Σάββα Χριστοφορίδη (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική σχολή, Ελλάδα). Οι κατασκευές των pEGFP-C3-rab4a, pEGFP-C3-Rab11, pEGFP-C3-hRab5a, pEGFP-C1-Rab7, pEGFP-N1-Caveolin1, pEYFP-C1-Rabankyrin-5 προσφέρθηκαν από τον Marino Zerial (MPI-CBG, Dresden, Germany). Τα ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής (siRNA) ενάντια των hRNF11 (ID: 134279), hZFVVE9 (hSARA) (ID: 107537), hDynamin-2 (ID: 15581, ID: 15488), καθώς και το siRNA control (ID: AM4642) αγοράστηκαν από την εταιρία Applied Biosystems, ενώ ο shRNAmir κλώνος έναντι της mZFVVE9 (mSARA) (V2MM_205693) από την Thermo Scientific.

2.1.3 Εκκινητές και κλωνοποίηση

Τα ολιγονουκλεοτίδια που περιγράφονται στον πίνακα 2.1, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και το προϊόν της κάθε φορά αντίδρασης κλωνοποιήθηκε σε ενδιάμεσους φορείς, pcr2.1-TOPO ή pcr-BLUNT (Invitrogen). Έπειτα από έλεγχο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (MWG-Biotech,

Ebersberg, Germany), ακολούθησε κλωνοποίηση του ενθέματος στους τελικούς πλασμιδιακούς φορείς.

κατασκευή	εμπρόσθιος εκκινητής	αντίστροφος εκκινητής
pcDNA3.1 RNF11, pcDNA3 HA-RNF11, PGEX-6P-1 RNF11	GGATCCATGGGGAAGCTGCCTCAA	CTCGAGTCAATTAGTCTCATAGGATGA
pcDNA3.1 RNF11-HA, pcDNA3.1 RNF11-HA Y40A, pcDNA3.1 RNF11-HA C99A	CTCGAGCCACCATGGGGAAGCTGCCTCAAAT	GAATTCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGATATCATTAGTCTCATA
pcDNA3.1 RNF11-HAG2A	CTCGAGCCACCATGGCGAAGCTGCCTCAAAT	GAATTCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGATATCATTAGTCTCATA
pcDNA3.1 RNF11-HA Δ59-95	CTCGAGCCACCATGGGGAAGCTGCCTCAAAT CCTAGCCAGACTCGGCTAATCCGGAGTGTGTGATC	ACAGATCACACACTCCCGGATTA GCCGAGTCTGGCTAGG GAATTCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGATATCATTAGTCTCATA
pcDNA3-RNF11-mcherry	AAGCTTCCACCATGGGGACTTGCCTCAAAT	GGATCCGATTAGTCTCATAGGATGAAAG
PGEX-6P-1 RNF11Δ59-95	GGATCCATGGGGAAGCTGCCTCAA CCTAGCCAGACTCGGCTAATCCGGAGTGTGTGATC	ACAGATCACACACTCCCGGATTA GCCGAGTCTGGCTAGG CTCGAGTCAATTAGTCTCATAGGATGA
PGEX-6P-1 RNF11Δ1-58	GAATTCGGATCCGCAACTCAGCTGACTGAA	CTCGAGTCAATTAGTCTCATAGGATGA
PGEX-6P-1 RNF11Δ96-154	GGATCCATGGGGAAGCTGCCTCAA	CTCGAGTCACTTTTTTCTGATCCATCTCT
PGEX-6P-1 RNF11 59-95	GAATTCGGATCCGCAACTCAGCTGACTGAA	CTCGAGTCACTTTTTTCTGATCCATCTCT
pcDNA3-HA-SARA1	GAATTCTGCCTCAAGCCAGAGCC	CCGCGGGTCTGACTCATTACTGCCAAGGAAACTTTG
pcDNA3-HA-SARA2	GAATTCTGCAGGGAATGTGGTGTAG	GGTACCTCATCCATTTGCTTTATATTCTGATC
pcDNA3-HA-SARA3	GAATTCTGACAAGAACGTTAGCAAGG	GGTACCTTATACGATGTTTTCCAGAAT

Πίνακας 2.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για την δημιουργία των επιθυμητών κατασκευών.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ & ΑΔΕΝΟΪΟΙ

2.2.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβες ομφάλιων λώρων

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα απομονώθηκαν από φλέβες ομφάλιων λώρων (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells) νεογνών σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Jaffe *et al.*¹⁷⁶. Συνοπτικά, μετά από ψηλάφηση εντοπίστηκε η φλέβα του λώρου και πλύθηκε με 50 ml διαλύματος φωσφορικών PBS (Phosphate buffer saline). Τα άκρα της φλέβας του λώρου κλείστηκαν ερμητικά με τη βοήθεια βαλβίδων τριών σημείων (three way stop cocks) και ακολούθησε διαποτισμός της φλέβας με 0.1% διαλύματος κολλαγενάσης (Collagenase type IA, Sigma) σε PBS και επώαση του λώρου στους 37°C, για 12 min. Έπειτα από συλλογή του παραπάνω διαλύματος και των αποκολλημένων κυττάρων, ακολούθησε απενεργοποίηση της κολλαγενάσης με θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% ορό βοός (FCS, Fetal calf serum). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 1000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 10 ml θρεπτικού υλικού M199, εμπλουτισμένο με 20% FCS (Fetal calf serum), 1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial cell growth supplement) και 0,05 U/ml ηπαρίνης.

2.2.2 Καλλιέργεια και διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών

Ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου απομονώθηκαν από φλέβες ομφάλιων λώρων (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells) και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2-5 και η διαμόλυνση τους έγινε με το λιπίδιο Metafectene-Pro (Biontex). Καρκινικά κύτταρα HeLa και κύτταρα NIH3T3 καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FCS και διαμολύνθηκαν με το λιπίδιο Effectene (Qiagen). Κύτταρα HEK293 (Human embryonic kidney) διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI1640 εμπλουτισμένο με 10% FCS και διαμολύνθηκαν με το λιπίδιο Fugene 6 (Roche). Τα κύτταρα HEK293A, που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των αδενοϊών, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FCS, 1% NEA (non essential aminoacids) και 4,8gr/L D-

γλυκόζης. Η καλλιέργεια των κυττάρων BHK (Baby hamster kidney) πραγματοποιήθηκε σε Glasgow MEM θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 5% FCS και 10% tryptose phosphate και 1% γλουταμίνης, ενώ η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Οι σταθερές σειρές κυττάρων HeLa που φέρουν την μη σημασμένη RNF11 πρωτεΐνη ή τον φορέα μάρτυρα pcDNA3.1, καθώς και των κυττάρων NIH3T3, που σταθερά δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη SARA, επιλέχτηκαν και καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό υλικό που περιέχει 0.8 μg/ml and 4.5 μg/ml πουρομυκίνη (puromycin) (Sigma-Aldrich), αντίστοιχα. Τα ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής (siRNA) (20nM) εισήχθησαν στα κύτταρα με τη βοήθεια του λιπιδίου RNAimax (Invitrogen). Η τρανσφερίνη (Transferrin) συζευγμένη με Alexa-488 ή FITC (50 μg/ml) (Molecular Probes) και ο LysoTracker (50nM) (Molecular Probes) χορηγήθηκαν στα κύτταρα για 30 λεπτά στους 37°C. Όλα τα θρεπτικά υλικά (Invitrogen) εμπλουτίστηκαν με 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 2 mM glutamine και οι λιπιδιακές διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εταιρειών. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C με 5% CO₂ και συνθήκες επαρκούς υγρασίας.

2.2.3 Έκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα BHK με τη βοήθεια της T7 RNA πολυμεράσης του συστήματος του ιού της vaccinia

Κύτταρα BHK (Baby hamster kidney) μολύνθηκαν με τον ιό της Vaccinia για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε θρεπτικό υλικό Optimem I (Gibco). Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακές κατασκευές, με τη βοήθεια του λιπιδίου Lipofectamine (Invitrogen) σε θρεπτικό υλικό Optimem I, παρουσία 10mM υδροξουρίας και έκφραση των πρωτεϊνών υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή. Έπειτα από 4 ώρες, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων ή μονιμοποίηση με παραφολμαδεΐδη (PFA). Ο ιός της vaccinia περιέχει την T7 πολυμεράση, που οδηγεί την έκφραση των πρωτεϊνών υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή.

2.2.4 Κατασκευή και τιτλοδότηση ανασυνδυσασμένων αδενοϊών

Οι ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν τις FLAG-SARAΔ1-664, FLAG-SARA, GFP-SARA, RNF11-GFP, RNF11-GFP C99A, RNF11-GFP Δ59-95 και GFP πρωτεΐνη κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τους He *et al.*¹⁷⁷ και περιγράφεται αναλυτικά στην διαδικτυακή ιστοσελίδα www.coloncancer.org/adeasy.htm. Για την κατασκευή των αδενοϊών της πλήρους μήκους πρωτεΐνης SARA, η θέση περιορισμού Pac I της κωδικής περιοχής καταργήθηκε με μεταλλαξιγένεση σημειακής θέσης. Όλοι οι φορείς και τα στελέχη βακτηρίων για την δημιουργία των αδενοϊών, ήταν ευγενική προσφορά του Bert Vogelstein (The John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD). Για την αναπαραγωγή ανασυνδυσασμένων αδενοϊών, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά πακεταρίσματος HEK293A (packaging line), η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των παραγόμενων αδενοϊών προμηθεύοντας τους με τα προϊόντα των γονιδίων που τους λείπουν, E1 και E3.

Η τιτλοποίηση των αδενοϊών έγινε με την δοκιμασία των ιικών πλακών (plaque assay). Κύτταρα HEK293A καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 φρεατίων (5x10⁵ κύτταρα ανά φρεάτιο) μέχρι το 80-90% της πληρότητας τους. Την επόμενη μέρα, μολύνθηκαν με 5μl από διαφορετικές αραιώσεις του ιού (10⁻²-10⁻⁵). Μετά από 4 ώρες μόλυνσης, τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με 4ml άγαρ επικάλυψης, το οποίο περιέχει 20mM Hepes, 12.5mM MgCl₂, 1% αγαρόζη (Gibco), σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Η καταμέτρηση των πλακών (μεμονωμένες εστίες λύσης των κυττάρων) έγινε μετά από 9 μέρες. Από τον αριθμό των ιικών πλακών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά φρεάτια και τις διαφορετικές αραιώσεις του ιού, υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος (ισωμάτια/μl).

2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Απομόνωση RNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης-PCR (qRT-PCR)

Ολικό RNA απομονώθηκε με τη βοήθεια του RNeasy Midi kit (Qiagen). Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

πραγματοποιήθηκε με το κυκλικό θερμοποιητή LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics) με τη βοήθεια του kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) ενός σταδίου, που περιέχει όλα τα απαραίτητα ένζυμα και χρωστικές. Τα αποτελέσματα της qRT-PCR ομαλοποιήθηκαν με τη χρήση ενός ενδογενούς γονιδίου αναφοράς, της ακτίνης (actin). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού DnaStar, συντέθηκαν στην MWG-Operon (Γερμανία) και περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

γονίδιο	εμπρόσθιος εκκινητής	αντίστροφος εκκινητής
mZFYVE9 (mSARA)	TGGCGCCAGTTTCTTTGTGTTTC	GATCTGTTCTGGGGGTCCTCTG
mActin	TGGCTGGCCGGGACCTGAC	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATGA
<i>hRNF11</i>	TTCCAGTCTACCACCCAACACC	GTCCCCATAAACAAAGTCCATCA

Πίνακας 2.2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).

2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός και στατιστική ανάλυση του συνεντοπισμού

Κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων με PBS και μονιμοποίηση με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA) 3,7% για 15 λεπτά. Έπειτα από πλύση με PBS, ακολούθησε επώαση με 50mM NH₄Cl (σε PBS) για άλλα 15 λεπτά, προκειμένου να μειωθεί ο αυτοφθορισμός, πλύση με PBS και επώαση με Triton-X 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά, για να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με ορό 10% (FCS) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με το πρωτογενές αντίσωμα σε 10% FBS για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, ακλούθησε πλύση δύο φορές με PBS και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε 10% FBS για 1 ώρα. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με διάλυμα ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) και οι παρατηρήσεις των δειγμάτων έγιναν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP1 (Βιολογική Χημεία, Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Leica TCS, ή Leica SP5 (Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών/ΙΒΕ-ΙΤΕ, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite.

Τα ποσοστά του συνεντοπισμού (>50% αλληλοεπικάλυψη των κυστιδίων) υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα MotionTrack (<http://www.kalaimoscope.com/>) (Kalaidzidis Y, MPI-CBG, Dresden, Germany), ενώ η μέτρηση της έντασης του φθορισμού των φωτογραφιών, υπολογίστηκε με το πρόγραμμα ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ελήφθησαν με διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS) που περιείχε 1% SDS και 100μM αναστολέα πρωτεασών phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF). Στη συνέχεια, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπέρηχους (Branson Digital Sonifier), 1-3 φορές για 10 δευτερόλεπτα και έπειτα από βρασμό για 15 λεπτά, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.200g για 20 λεπτά, απ' όπου συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Στις περιπτώσεις των ανοσοκατακρημνίσεων και των καταβυθίσεων, τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διαλύματα λύσης που περιγράφονται παρακάτω.

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα, μετά το πέρας των δοκιμασιών, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% ή 10% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Schleicher and Schuell, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με 0,1% Ponceau S για 1 λεπτό και ξεβάφτηκαν με νερό.

Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western (10mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1% Tween-20, και 150 mM NaCl), για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων και επώαση των μεμβρανών με τα αρχικά αντισώματα. Η τελευταία διαδικασία πραγματοποιήθηκε, είτε για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, είτε στους 4°C ολονυχτίως, σε 5% άπαχο γάλα ή 2% διαλύματος ζελατίνης σε διάλυμα Western. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο σύντομες πλύσεις σε διάλυμα Western, και τρεις πλύσεις των 10 λεπτών στο ίδιο διάλυμα. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP, Horse raddish peroxidase) διαλυμένα σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western, για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως αναφέρεται παραπάνω. Η εμφάνιση του

σήματος έγινε με το αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Enhanced chemiluminescence) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) ή της εταιρείας Pierce.

2.3.4 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των συνολικών πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (PIERCE) ή η μέθοδος Bradford (Biorad), ανάλογα με τη συμβατότητα των αντιδραστηρίων των διαλυμάτων λύσης. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA (Bovine serum albumin). Μετά από επώαση των δειγμάτων μετρήθηκε η απορρόφηση στα 562nm ή 595nm, αντίστοιχα.

2.3.5 Καθαρισμός GST-πρωτεϊνών

Οι κατασκευές που εκφράζουν τις χημειοσυνθετικές GST πρωτεΐνες, αρχικά μετασηματίστηκαν στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli*, BL21. Στη συνέχεια, τα μετασηματισμένα βακτήρια καλλιεργήθηκαν στους 37°C, μέχρι η απορρόφηση στα 600nm να φτάσει την τιμή 0,5-0,6. Ακολούθησε επαγωγή με IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) (300μM) για δύο ώρες στους 37°C, φυγοκέντρηση στις 6000 rpm (Sorval, SLA-4000) και επαναιώρηση των βακτηρίων σε διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε 20mM Tris-HCl pH7.8, 100mM NaCl και αναστολείς των πρωτεασών (Roche). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με μηχανική πίεση (French pressure cell, SIM-AMINCO, 1000 PSI). Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και αμέσως φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 rpm (Sorval, κεφαλή SS-34), για 30 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο καθαρίστηκε με τη χρήση στήλης σφαιριδίων γλουταθειόνης (glutathione sepharose beads) (GE Healthcare) και μετά από πλύση με το διάλυμα λύσης, ακολούθησε έκλουση των πρωτεϊνών σε κλάσματα, με 10mM ανηγμένης γλουταθειόνης (reduced glutathione) σε διάλυμα λύσης. Ακολούθησε διαπίδυση των θετικών με τη GST-πρωτεΐνη κλασμάτων, με διάλυμα 150mM NaCl και 20mM Tris-HCl στους 4°C για 16 ώρες, υπό ανάδευση.

2.3.6 Δοκιμασία πρωτεϊνικής καταβύθισης (Glutathione S-transferase pull-down assays)

Στις δοκιμασίες πρωτεϊνικής καταβύθισης (in vitro pull down assays), 20 µg GST-συντηγημένης ή GST πρωτεΐνης επώαστηκαν για μία ώρα, στους 4⁰C, υπό ανάδευση με 15 µl σφαιριδίων γλουταθειόνης (glutathione-agarose beads) (GE Healthcare), σε διάλυμα που περιέχει 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40 και αναστολείς των πρωτεασών (Roche). Ακολούθησε πλύση των σφαιριδίων τρεις φορές με το παραπάνω διάλυμα και επώαση με κυτταρικά εκχυλίσματα, που υπερεκφράζουν τις προς εξέταση πρωτεΐνες. Έπειτα από επώαση 4 ωρών, στους 4⁰C, υπό ανάδευση, ακολούθησε πλύση 5 φορές με το παραπάνω διάλυμα και έκλυση με διάλυμα Laemmli.

2.3.7 Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης (Immunoprecipitation assays)

Κύτταρα που υπερεκφράζουν την κάθε φορά πρωτεΐνη, λύθηκαν σε διάλυμα που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 (Fluka), 10% Glycerol και αναστολείς των πρωτεασών (Roche). Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά, στους 4⁰C, υπό ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 20 λεπτά. Το υπερεκείμενο επώαστηκε με σφαιρίδια G (GE Healthcare) ή A (Sigma-Aldrich), για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που προσκολλώνται στα σφαιρίδια μη ειδικά και έπειτα από φυγοκέντρηση, το υπερεκείμενο επώαστηκε με ειδικά ή μη ειδικά αντισώματα (1µg αντισώματος/300µg εκχυλίσματος) για 12-18 h, στους 4⁰C, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκε 15µl σφαιριδίων για 4 ώρες στους 4⁰C, υπό ανάδευση και ακολούθησε πλύση, πέντε φορές με το διάλυμα λύσης. Στις περιπτώσεις των δοκιμασιών της ανοσοκατακρήμνισης, που χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια ομοιοπολικά συζευγμένα με το αντίσωμα FLAG (ANTI-FLAG M2 Agarose beads, Sigma), ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Το κυτταρικό εκχύλισμα επώαστηκε με τα FLAG-σφαιρίδια για 4 ώρες στους 4⁰C και έπειτα από πλύση, ακολούθησε έκλυση των συμπλόκων από τα σφαιρίδια με διάλυμα γλυκίνης 0.1M pH 2.3, 5 λεπτά, στους 4⁰C. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και μετά την παραλαβή του υπερεκκειμένου, ακολούθησε αποκατάσταση του pH του διαλύματος με έκθεση σε αέρια αμμωνία.

2.3.8 Παρακολούθηση της αποικοδόμησης του EGFR

Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNAs ή μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς. 72 ώρες έπειτα από την διαμόλυνση ή 24 ώρες μετά την μόλυνση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε στέρηση ορού (0,2% FCS) για 5 ώρες και επαγωγή με τον αυξητικό παράγοντα EGF (Epidermal growth factor) (100ng/ml), για 30 λεπτά. Έπειτα από την επαγωγή, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και προστέθηκε καινούριο, υπό συνθήκες στέρησης ορού και παρουσία κυκλοξαμιδίου (Cycloheximide, Sigma, 25μg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα.

2.3.9 Ενδοκυττάρωση του ¹²⁵I-EGF

Κύτταρα HeLa, διαμολύνθηκαν με ειδικά siRNA και 72 ώρες αργότερα ακολούθησε επώαση με 1 ng/ml ¹²⁵I-EGF (GE Healthcare), σε θρεπτικό υλικό MEM (Minimum essential medium) χωρίς HCO₃⁻, παρουσία 0.1% BSA, στους 37°C, για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα 3.20 (πάνω). Στο χρονικό σημείο 0, τα κύτταρα επώαστηκαν με ¹²⁵I-EGF στους 4°C, για 1 λεπτό. Ακολούθησε πλύση τρεις φορές με παγωμένο PBS και απελευθέρωση του ¹²⁵I-EGF που έχει δεσμευθεί στη μεμβράνη των κυττάρων, με διάλυμα 0.2M οξικού (acetate) pH 2.8 που περιέχει 0.5 M NaCl, για 10 λεπτά, στους 4°C. Έπειτα τα κύτταρα λύθηκαν με 1 M NaOH στους 4°C, για 60 min και ακολούθησε μέτρηση τόσο του ¹²⁵I-EGF που έχει ενδοκυτταρωθεί, όσο και του ¹²⁵I-EGF που έχει δεσμευθεί στη μεμβράνη, σε γ-μετρητή. Στο γράφημα της εικόνας 3.20 (πάνω), αναπαριστάται η αναλογία των cpm (counts per minute) του ¹²⁵I-EGF που έχει ενδοκυτταρωθεί σε σχέση με το δεσμευμένο ¹²⁵I-EGF της κυτταρικής μεμβράνης¹⁷⁸.

2.3.10 Ανακύκλωση και αποικοδόμηση του ¹²⁵I-EGF

Η μελέτη της ανακύκλωσης και της αποικοδόμησης του ραδιενεργά σημασμένου ¹²⁵I-EGF, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται στις παρακάτω αναφορές^{179 180}. Περιληπτικά, κύτταρα HeLA που έχουν διαμολυνθεί με ειδικά siRNA επώαστηκαν με 50 ng/ml EGF (¹²⁵I-EGF: μη σημασμένος EGF, σε αναλογία 1:50) σε διάλυμα HEPES που περιείχε 5 % FCS, για 15 min, στους 37°C. Ακολούθησε πλύση δύο φορές με παγωμένο PBS και δύο φορές με διάλυμα γλυκίνης (glycine) pH 3.0, για την απομάκρυνση του δεσμευμένου στη μεμβράνη ¹²⁵I-EGF/EGF. Στη συνέχεια, τα

κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα HEPES στους 37°C για 60, 120 και 180 λεπτά. Τελικά, το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε και μετά από κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με χρήση οξέος, στους 4°C, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και διαχωρίστηκαν σε υπερκείμενο (αποικοδομημένο-degraded ¹²⁵I-EGF) ή ίζημα (ανακυκλώσιμο-recycled ¹²⁵I-EGF). Τα κύτταρα λύθηκαν με 1 % SDS και οι τιμές των κυτταρικών τους εκχυλισμάτων αντιπροσωπεύουν τον ενδοκυτταρικό ¹²⁵I-EGF. Όλα τα κλάσματα μετρήθηκαν σε γ-μετρητή.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA

3.1.1 Ανίχνευση με το σύστημα του διπλού υβριδίου

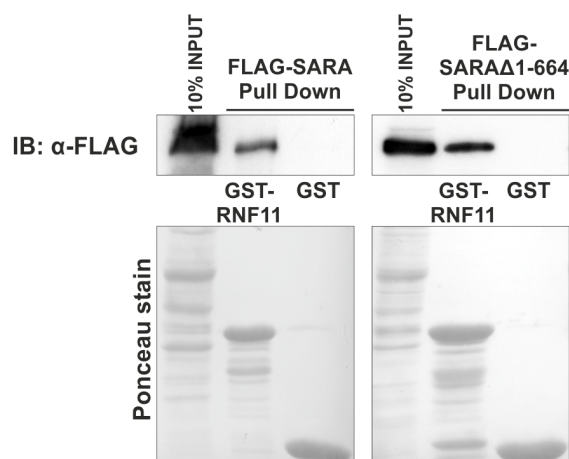
Η RNF11 ανακαλύφθηκε ως μια πρωτεΐνη που δυνητικά αλληλεπιδρά με την SARA σε μια σάρωση διπλού υβριδίου (υποενότητα 1.4.4). Η πρωτεΐνη RNF11 ανήκει στην κατηγορία αξιοπιστίας A (PBS, Predicted biological score), που σημαίνει ότι η πιθανότητα να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SARA είναι μεγάλη. Η περιοχή αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης RNF11 με τη SARA εκτείνεται από το 62-154 αμινοξύ (αα) (Εικ.3.10Α).

3.1.2 Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11 και SARA με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull down)

Η μέθοδος του διπλού υβριδίου αποτελεί μια πρώτη ένδειξη ότι δύο πρωτεΐνες συνδέονται φυσικά. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης και με άλλες βιοχημικές μεθόδους.

Με στόχο την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11-SARA, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της *in vitro* πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull down). Για το σκοπό αυτό, καθαρή πρωτεΐνη RNF11 συντηγμένη με GST (Glutathione S-Transferase), επώαστηκε με εκχυλίσματα κυττάρων που υπερεκφράζουν είτε ολόκληρη την πρωτεΐνη SARA (FLAG-SARA) είτε το καρβοξυτελικό τμήμα αυτής (FLAG-SARA Δ 1-664), σημασμένες με τον επίτοπο FLAG. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1, η πρωτεΐνη SARA ανιχνεύεται μόνο στα δείγματα όπου υπάρχει η πρωτεΐνη GST-RNF11, ενώ δεν ανιχνεύεται σε εκείνα όπου υπάρχει η πρωτεΐνη GST.

Αξίζει ίσως να αναφερθεί ότι, εκτός από την πρωτεΐνη RNF11, έχει επιβεβαιωθεί με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής καταβύθισης η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης SARA και με τις πρωτεΐνες ETS2, NUP155 και beta-catenin (Πίνακας 1.2), γεγονός που προσδίδει ακόμα μεγαλύτερη αξιοπιστία στη μέθοδο του διπλού υβριδίου.



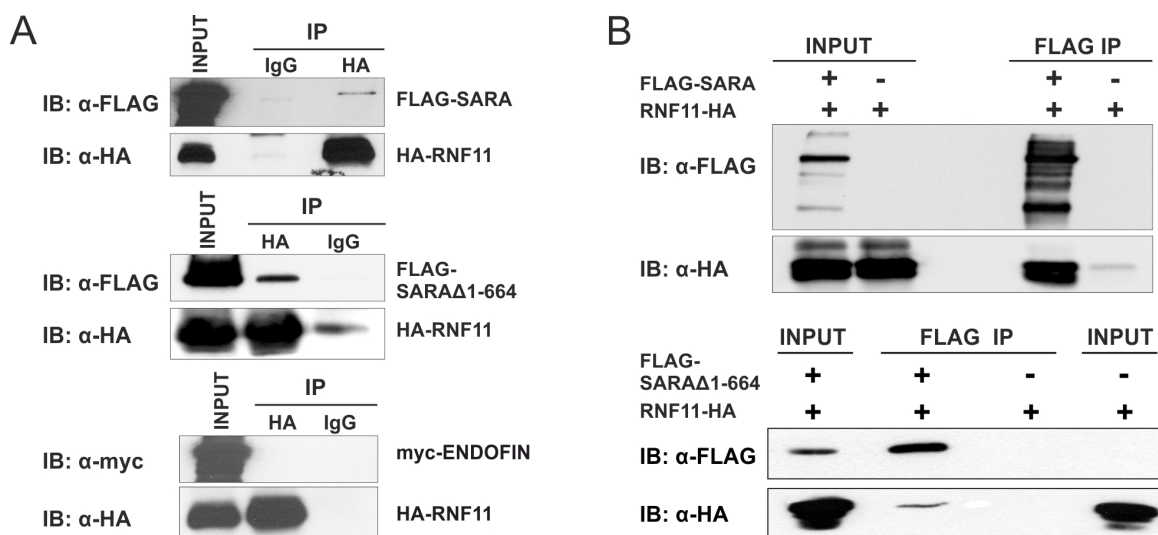
Εικόνα 3.1: Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των *RNF11/SARA* με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής καταβύθισης. Κύτταρα HEK293 μολύνθηκαν με αδenoϊούς που εκφράζουν την FLAG-SARA ή την FLAG-SARAΔ1-664 και τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάστηκαν με καθαρή GST-RNF11 ή GST πρωτεΐνη. Μετά από ανάλυση με SDS-PAGE, ακολούθησε ανοσοαποτύπωση (IB) με το αντίσωμα α-FLAG. Στο κάτω μέρος του σχήματος εμφανίζεται η χρώση των GST πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Ponceau S.

3.1.3 Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11 και SARA με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής ανοσοκατακρήμνισης (immunoprecipitation)

Η αλληλεπίδραση στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης. Η πρωτεΐνη RNF11, σημασμένη με τον επίτοπο HA (Human influenza hemagglutinin) υπερεκφράστηκε σε κύτταρα BHK (Baby hamster kidney) ή HEK293 (Human embryonic kidney) ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη FLAG-SARA ή FLAG-SARAΔ1-664, αντίστοιχα (Εικ.3.2A, πάνω και μέση). Έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση (IP, Immunoprecipitation) με το αντίσωμα α-HA ή με το μη ειδικό α-IgG αντίσωμα (αρνητικός μάρτυρας), παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη RNF11-HA συν-κατακρημνίζει την πρωτεΐνη SARA, κάτι που υποδηλώνει ότι οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν (Εικ.3.2A, πάνω και μέση). Σε αντίθεση, η ENDOFIN (Endosome-associated FYVE-domain protein), μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει αυξημένη ομολογία με την πρωτεΐνη SARA¹⁸¹, δεν δεσμεύεται με την πρωτεΐνη RNF11-HA, ένδειξη ότι ο σχηματισμός συμπλέγματος μεταξύ των RNF11/SARA είναι ειδικός (Εικ.3.2A, κάτω). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, όταν πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών FLAG-SARA (Εικ.3.2B, πάνω) ή FLAG-SARAΔ1-664 (Εικ.3.2B, κάτω) χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επίτοπου FLAG, διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη RNF11-HA συν-κατακρημνίζεται

με τη SARA, γεγονός που αποτελεί μια ακόμη ένδειξη ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν.

Συνοψίζοντας, οι παραπάνω βιοχημικές μελέτες αποδεικνύουν και θεμελιώνουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης RNF11 με την πρωτεΐνη SARA.



Εικόνα 3.2: Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των RNF11/SARA με ανοσοκατακρήμιση. (A) BHK (πάνω και κάτω) ή HEK293 (μέση) κύτταρα διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές RNF11-HA και FLAG-SARA ή FLAG-SARAΔ1-664 ή myc-ENDOFIN. Ακολούθησε λύση με 0.5% NP-40 και ανοσοκατακρήμιση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με α-HA ή IgG αντίσωμα. Ακολούθησε ανάλυση με SDS-PAGE και επώαση με το α-HA αντίσωμα, για να επιβεβαιώσουμε την RNF11-HA ανοσοκατακρήμιση, καθώς και με τα α-FLAG ή α-myc αντισώματα για να ανιχνεύσουμε τις FLAG-SARA, FLAG-SARAΔ1-664 ή myc-ENDOFIN. (B) BHK (πάνω) ή HEK293 (κάτω) κύτταρα διαμολύνθηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές της FLAG-SARA και RNF11-HA ή μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει την FLAG-SARAΔ1-664 και διαμολύνθηκαν με το RNF11-HA πλασμίδιο, αντίστοιχα. Οι FLAG πρωτεΐνες ανοσοκατακρημίστηκαν ειδικά, χρησιμοποιώντας σφαιρίδια αгарόζης συζευγμένα ομοιοπολικά με το α-FLAG αντίσωμα.

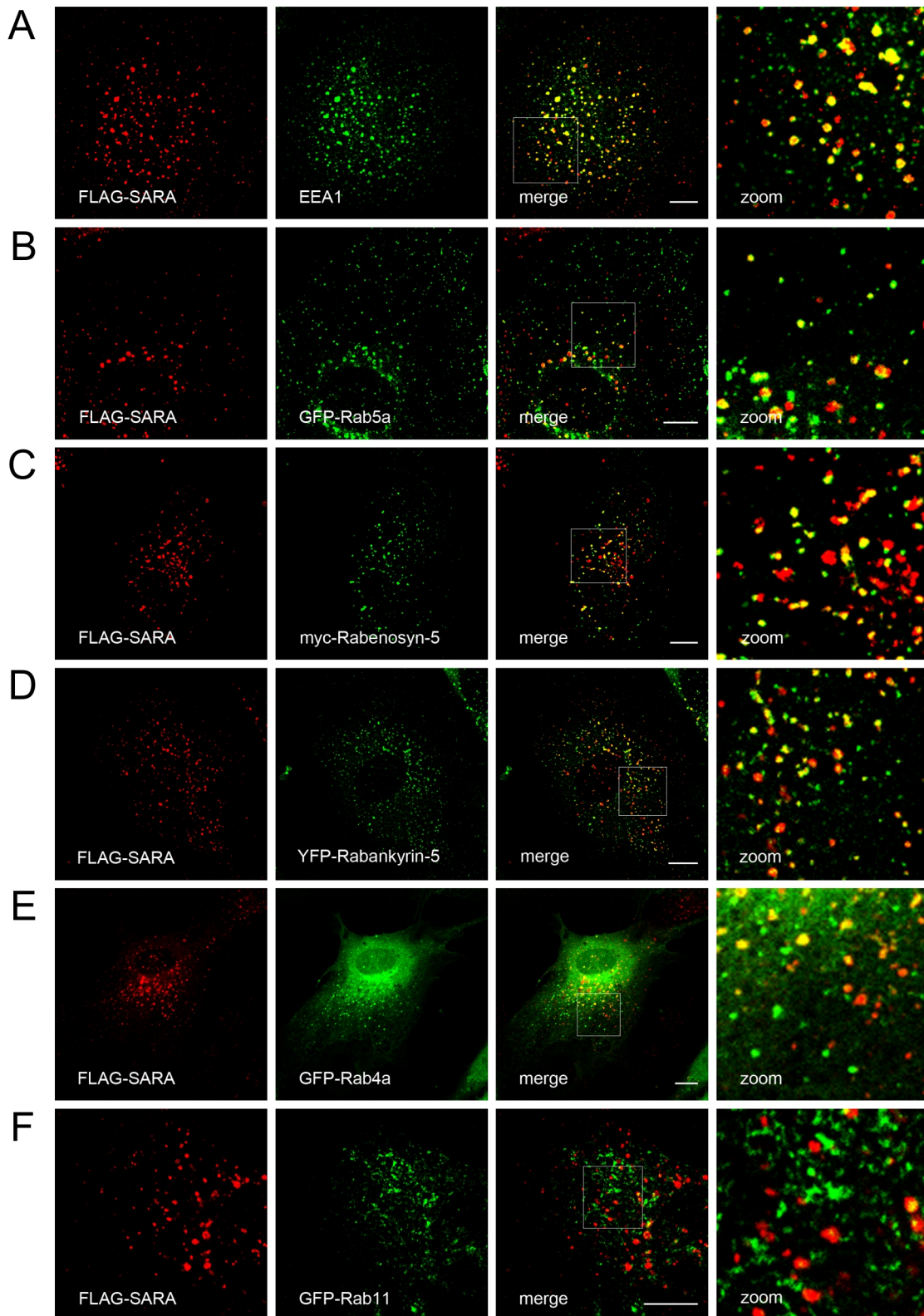
3.2 Η ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SARA ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΑ

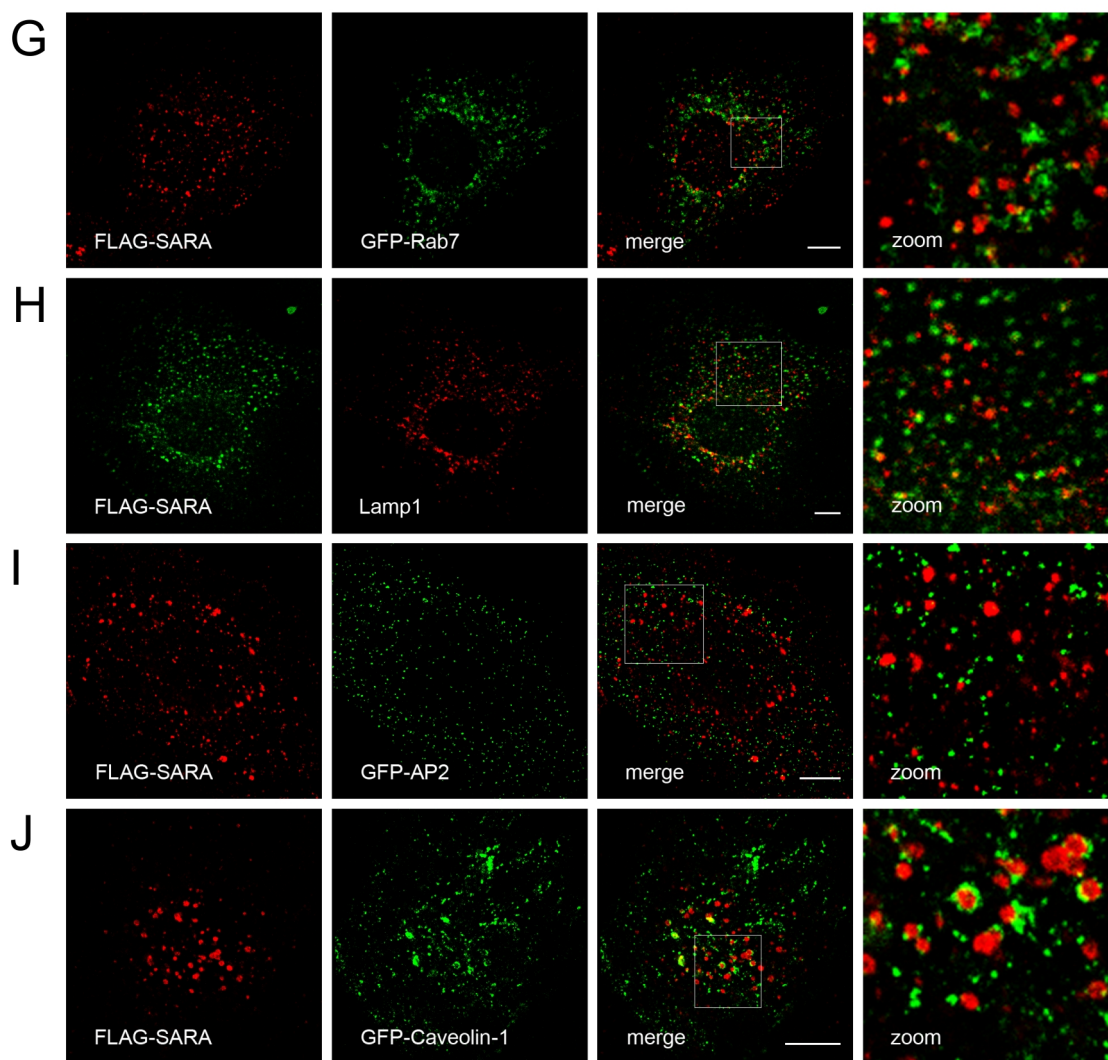
Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας, καθώς και από άλλες ερευνητικές ομάδες, έχουν δείξει πως η πρωτεΐνη SARA συνδέεται ισχυρά στο PtdIns(3)P λιπίδιο και εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα^{75 148}. Ωστόσο, ο συνεντοπισμός της με την EEA1 (Early endosomal antigen-1), κλασικό δείκτη των πρώιμων ενδοσωμάτων δεν είναι πλήρης^{147 148}, κάτι που υποδηλώνει πως η πρωτεΐνη SARA πιθανόν να

εντοπίζεται και σε κάποιο άλλο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα. Κρίναμε λοιπόν απαραίτητο, να μελετήσουμε ποιοτικά και ποσοτικά τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης SARA, χρησιμοποιώντας δείκτες των διαφόρων ενδοκυτταρικών μεμβρανικών μονοπατιών.

Για το σκοπό αυτό, μολύναμε ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβες ανθρώπινων ομφάλιων λώρων (HUVEC) με αδενοϊό που εκφράζει την πρωτεΐνη FLAG-SARA και ταυτόχρονα διαμολύναμε με πρωτεϊνικούς δείκτες των μεμβρανικών μονοπατιών. Στην περίπτωση που είχαμε στη διάθεση μας αντισώματα για την ανίχνευση των ενδογενών πρωτεϊνών-δεικτών, έγινε μόνο υπερέκφραση της FLAG-SARA πρωτεΐνης. Μετά από πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας διαπιστώσαμε ότι πράγματι η SARA συνεντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα με την EEA1, και μάλιστα σε ποσοστό που αγγίζει το 78,7^{±7,6}% (Εικ.3.3A). Αυξημένο είναι επίσης το ποσοστό συνεντοπισμού με τις Rab5a (Εικ.3.3B) και Rabenosyn-5 (Εικ.3.3C), 44,7^{±9}% και 62,6^{±9}% αντίστοιχα, επίσης δείκτες των πρώιμων ενδοσωμάτων. Η Rabenosyn-5 εντοπίζεται και στο γρήγορο μονοπάτι της ανακύκλωσης. Αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό συνεντοπισμού της πρωτεΐνης SARA με την Rabankyrin-5 (Εικ.3.3D) (58,8^{±6,7}%), μια πρωτεΐνη που παίρνει μέρος στη διαδικασία μακροπινοκύττωσης και εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα. Η πρωτεΐνη SARA, φαίνεται να εντοπίζεται και στο μονοπάτι της γρήγορης ανακύκλωσης προς την μεμβράνη, καθώς συνεντοπίζεται σε ποσοστό 31,3^{±6,7}% με την πρωτεΐνη Rab4a (Εικ.3.3E), ενώ αποκλείεται από το αργό μονοπάτι της ανακύκλωσης μιας και ο συνεντοπισμός με την Rab11 (Εικ.3.3F) είναι πολύ μικρότερου ποσοστού (9,1^{±3,4}%).

Μικρός, αλλά στατιστικά σημαντικός είναι ο συνεντοπισμός της πρωτεΐνης SARA με την πρωτεΐνη Rab7 (Εικ.3.3G) (13,8^{±8}%), δείκτη των όψιμων ενδοσωμάτων, καθώς και με την Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) (Εικ.3.3H) (17,52^{±7,2}%), μια πρωτεΐνη που κατανέμεται στην μεμβράνη των όψιμων ενδοσωμάτων και κυρίως στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων. Η πρωτεΐνη SARA δεν συνεντοπίζεται με την AP2 (Εικ.3.3I) (0,7^{±0,6}%), έναν δείκτη των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων του κλαθρινο-εξαρτώμενου μονοπατιού ενδοκυττάρωσης, ενώ συνεντοπίζεται σε ποσοστό 14^{±4}% σε κυστιδιακές δομές μεγάλης διαμέτρου, θετικές για την πρωτεΐνη Caveolin-1 (Εικ.3.3J).





Εικόνα 3.3: Ο συνεντοπισμός της πρωτεΐνης SARA με δείκτες των διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων. HUVE κύτταρα μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει την πρωτεΐνη FLAG-SARA και διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακές κατασκευές των πρωτεϊνών GFP-Rab5a (B), *myc-Rabenosyn-5* (C), YFP-Rabankyrin-5 (D), GFP-Rab4a (E), GFP-Rab11 (F), GFP-Rab7 (G), GFP-AP2 (I) ή GFP-Caveolin-1 (J). Στις περιπτώσεις των EEA1 (A) και Lamp1 (H), χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι των ενδογενών πρωτεϊνών, ενώ η ανίχνευση της υπερεκφρασμένης *myc-Rabenosyn-5* (C) έγινε χρησιμοποιώντας το α -*myc* αντίσωμα. Ράβδος κλίμακας, 10 μ m.

Στον πίνακα 3.1, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά κατανομής της πρωτεΐνης SARA στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα.

Marker	%Colocalisation
EEA1	78,7 ^{±7,6}
Rab5a	44,7 ^{±9}
Rabenosyn-5	62,6 ^{±9}
Rabankyrin-5	58,8 ^{±6,7}
Rab7	13,8 ^{±8}
Lamp1	17,52 ^{±7,2}
AP2	0,7 ^{±0,6}
Caveolin-1	14 ^{±4}
Rab11	9,1 ^{±3,4}
Rab4a	31,3 ^{±6,7}

Πίνακας 3.1: Πίνακας που συνοψίζει τα ποσοστά συνεντοπισμού της πρωτεΐνης SARA με όλους τους πρωτεϊκούς δείκτες των μεμβρανικών κυστιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην υποενότητα 3.2. EEA1 (Early endosomal antigen-1), AP2 (Adaptor protein-2), Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein-1)

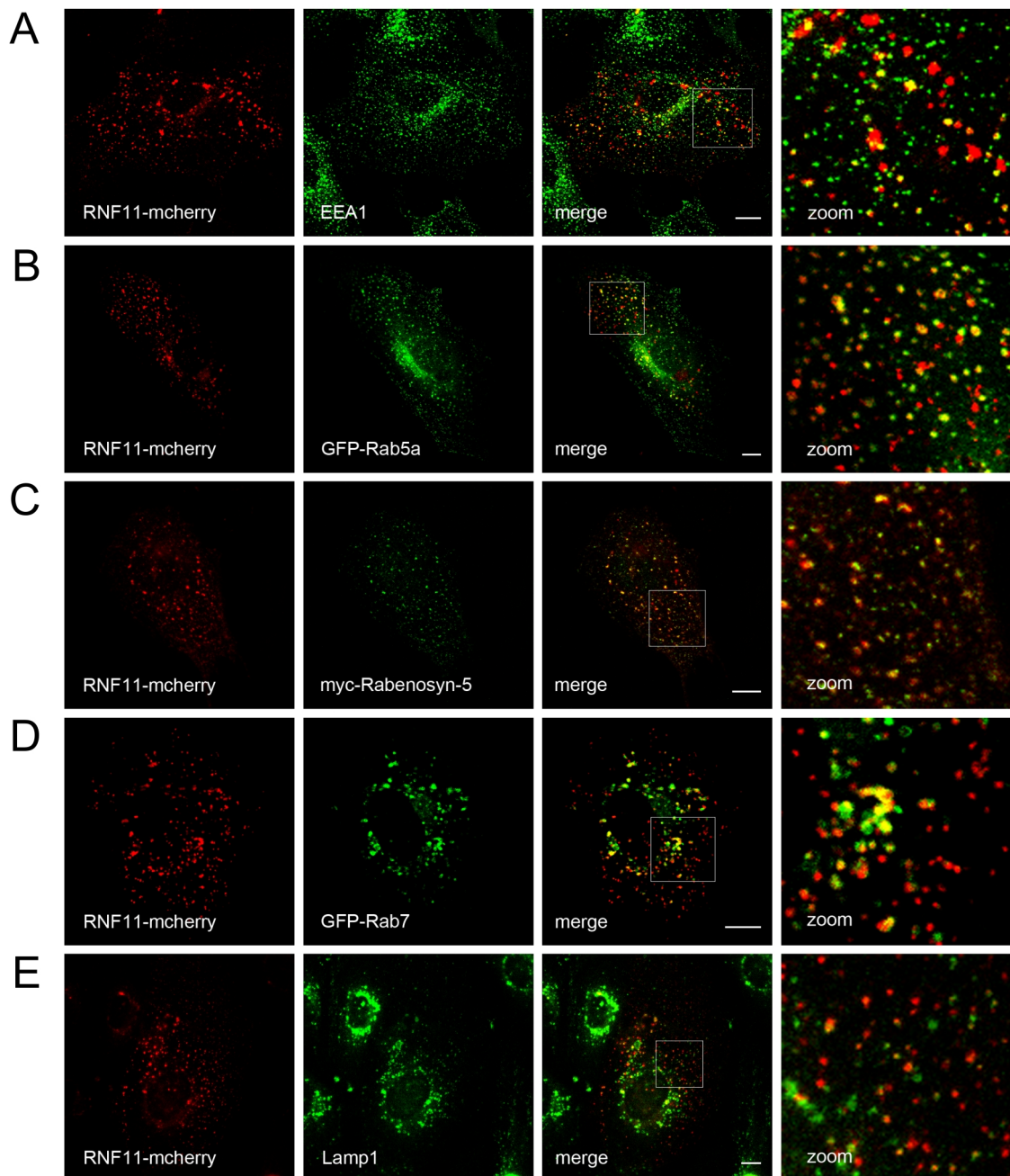
3.3 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ, ΣΤΑ ΟΨΙΜΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗΣ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ, ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA

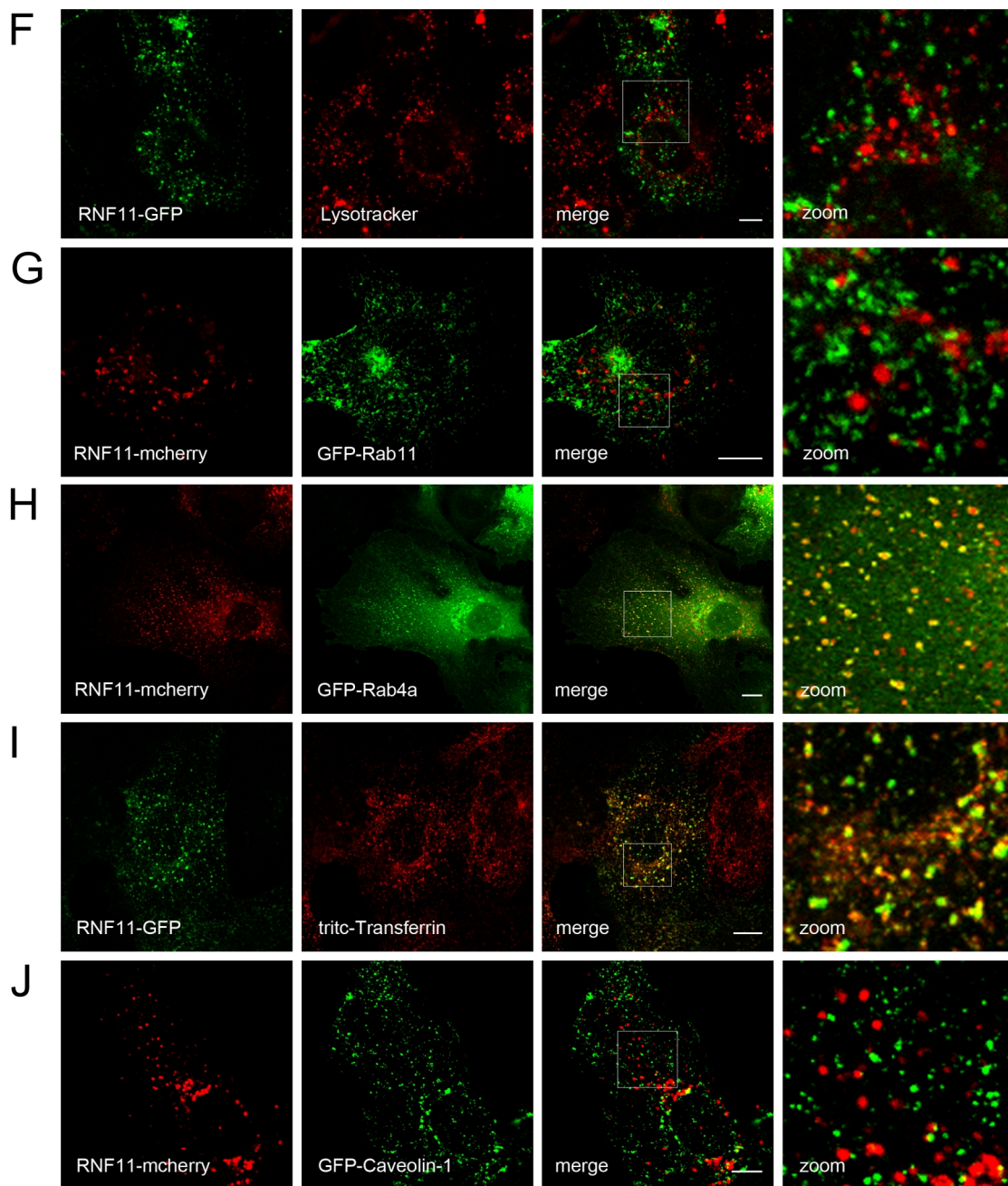
3.3.1 Η κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης RNF11

Έχοντας μελετήσει εκτενώς την κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης SARA, θελήσαμε στη συνέχεια να ερευνήσουμε τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης RNF11. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιώντας γνωστούς δείκτες για κάθε ένα από τα διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Στην εικόνα 3.4 παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη RNF11 εμφανίζεται σπικτική κατανομή και συνεντοπίζεται με τις πρωτεΐνες EEA1 (Εικ.3.4A), Rab5a (Εικ.3.4B) και Rabenosyn-5 (Εικ.3.4C), δείκτες του πρώιμου ενδοσώματος⁷⁷. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη Rabenosyn-5 εντοπίζεται και στα ενδοσώματα γρήγορης ανακύκλωσης. Ο βαθμός του συνεντοπισμού της πρωτεΐνης RNF11 με τις Rab5, EEA1 and Rabenosyn-5 είναι 46^{±8}%, 33^{±5,7}% και 34^{±7,5}%, αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη RNF11 συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό (53^{±17}%) με τη Rab7 (Εικ.3.4D), έναν δείκτη των όψιμων ενδοσωμάτων, ενώ ο συνεντοπισμός με τους λυσοσωματικούς δείκτες Lamp1 (Εικ.3.4E) και LysoTracker (3.4F) είναι μικρός ή ελάχιστος, αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη RNF11 δεν εντοπίζεται στα ενδοσώματα της αργής ανακύκλωσης, γνωστό και ως ενδοκυτταρικό διαμέρισμα ανακύκλωσης (ERC, Endocytic

recycling compartment), αφού δεν συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη Rab11, δείκτη του μονοπατιού αυτού (Εικ.3.4,G). Αντίθετα συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις Rab4a (Εικ.3.4,H) και Transferrin (Εικ.3.4,I), δείκτες του γρήγορου διαμερίσματος ανακύκλωσης. Τέλος, η RNF11 δεν συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη Caveolin-1 (εικ.3.4,J), δείκτη των caveolae.



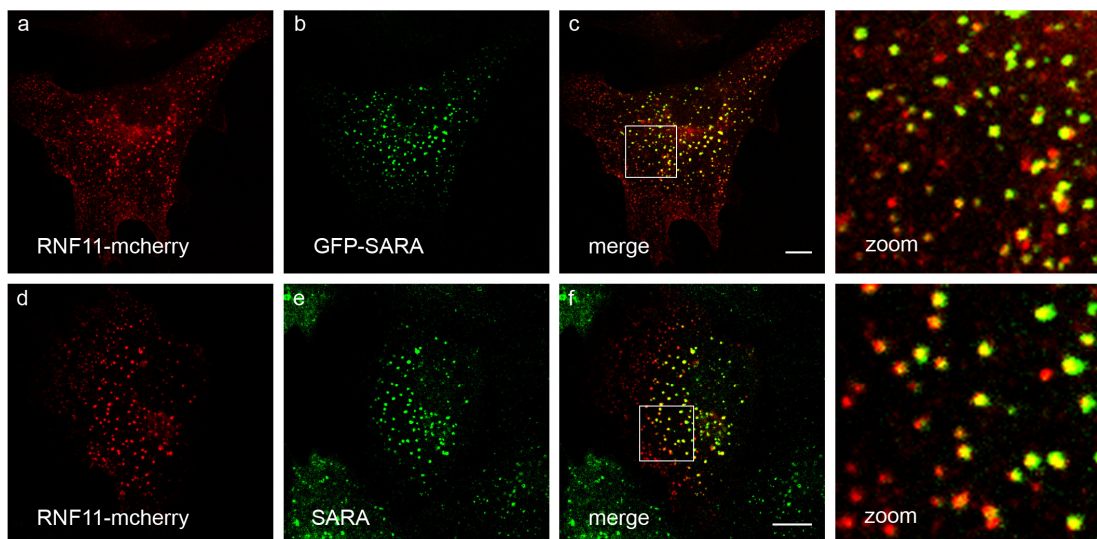


Εικόνα 3.4: Ο συνεντοπισμός της πρωτεΐνης RNF11 με δείκτες των ενδοκυτταρικών μεμβρανικών μονοπατιών. HUVE κύτταρα διαμολύνθηκαν με RNF11-mcherry ταυτόχρονα με τις GFP-Rab5a (B), *myc-Rabenosyn-5* (C), GFP-Rab7 (D), GFP-Rab11 (G), GFP-Rab4a (H) ή GFP-Caveolin-1 (J). Στις περιπτώσεις των EEA1 (A) και Lamp1 (E), χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι των ενδογενών πρωτεϊνών, ενώ η ανίχνευση της υπερεκφρασμένης *myc-Rabenosyn-5* (C) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το α -*myc* αντίσωμα. Η Transferrin (I) και η Lysotracker (F) χορηγήθηκαν στα κύτταρα για 30 λεπτά στους 37°C. Ράβδος κλίμακας, 10 μ m.

Συμπερασματικά λοιπόν, από τα παραπάνω πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη RNF11 παρουσιάζει κυστιδιακό πρότυπο κυτταρικής εντόπισης και διακοσμεί το πρώιμο, το όψιμο και το γρήγορης ανακύκλωσης ενδόσωμα, με τους δείκτες των οποίων παρουσίασε εκτεταμένο συνεντοπισμό.

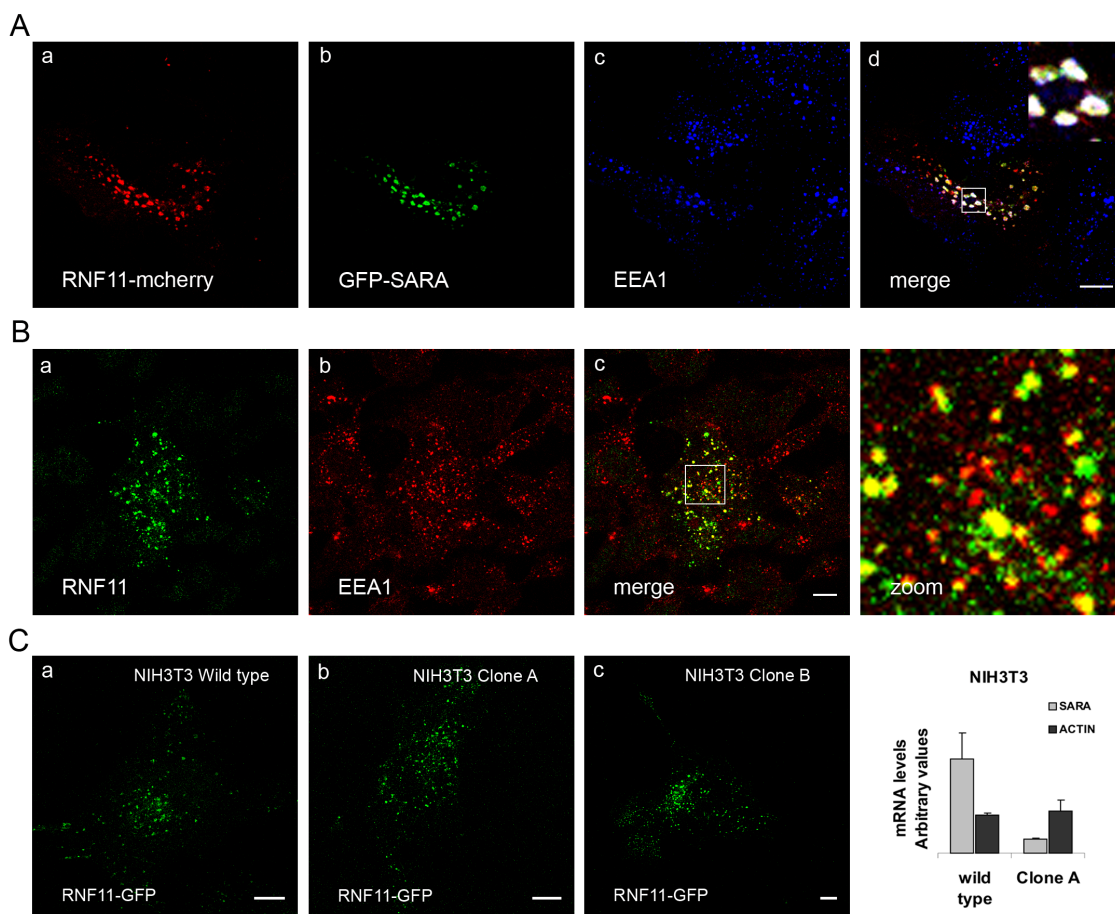
3.3.2 Η πρωτεΐνη RNF11 συνεντοπίζεται με την SARA στο πρώιμο ενδόσωμα

Έχοντας χαρτογραφήσει την κυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών SARA και RNF11 και γνωρίζοντας ότι αλληλεπιδρούν, θελήσαμε να ερευνήσουμε εάν οι δύο πρωτεΐνες συναντώνται στο ίδιο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα. Σε συμφωνία με τα βιοχημικά αποτελέσματα, μετά από υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-mcherry σε κύτταρα HUVE διαπιστώσαμε ότι συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη GFP-SARA, σε ποσοστό $42^{\pm 5}\%$ (RNF11/SARA) (Εικ.3.5,a-c), καθώς επίσης και με την ενδογενή SARA ($47^{\pm 12}\%$) (Εικ.3.5,d-f). Επιπρόσθετα, ταυτόχρονη χρώση και με το δείκτη EEA1 απέδειξε ότι οι πρωτεΐνες RNF11 και SARA συνεντοπίζονται στο πρώιμο ενδόσωμα (Εικ.3.6A,a-d).



Εικόνα 3.5: Η πρωτεΐνη RNF11 συνεντοπίζεται με την υπερέκφρασμένη ή την ενδογενή SARA. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με RNF11-mcherry (d-f) ή ταυτόχρονα με GFP-SARA (a-c). Η ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης έγινε με ειδικό αντίσωμα έναντι της SARA. Ράβδος κλίμακας, 10 μ m.

Θέλοντας να αποκλείσουμε κάθε ενδεχόμενο τροποποίησης του ενδοκυτταρικού εντοπισμού από τη σήμανση της πρωτεΐνης RNF11, υπερεκφράσαμε τη μη σημασμένη RNF11 πρωτεΐνη και μετά από ταυτόχρονη χρώση με α -EEA1 και α -RNF11 (ανιχνεύει μόνο την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη) διαπιστώσαμε πως η μη σημασμένη πρωτεΐνη, καταρχήν εμφανίζει σπικτική κατανομή και κατά δεύτερον εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα (Εικ.3.6B,a-c).



Εικόνα 3.6: (A) Η πρωτεΐνες RNF11 και SARA συνεντοπίζονται στο πρώιμο ενδόσωμα. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με RNF11-mcherry και GFP-SARA, μονιμοποιήθηκαν με παραφολμαδεΰδη (PFA) και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα α -EEA1. (B) Η μη σημασμένη RNF11 πρωτεΐνη συνεντοπίζεται με την EEA1. Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με μια κατασκευή που εκφράζει τη μη σημασμένη RNF11 πρωτεΐνη και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με τα αντισώματα α -RNF11 και α -EEA1. (C) Η πρωτεΐνη RNF11 εντοπίζεται στα ενδοσώματα ανεξάρτητα από τη πρωτεΐνη SARA. Κύτταρα NIH3T3 αγρίου τύπου (a) ή σταθεροί κλώνοι αυτών, που φέρουν μια shRNA κατασκευή της SARA (b and c), διαμολύνθηκαν προσωρινά με RNF11-GFP και ακολούθησε ανοσοφθορισμός και σάρωση με συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών SARA και ακτίνης (ACTIN) ποσοτικοποιήθηκαν με qRT-PCR χρησιμοποιώντας ολικό *m*-RNA που απομονώθηκε από τα NIH3T3 κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στο C. Ράβδος κλίμακας, 10 μ m.

3.3.3 Η πρωτεΐνη RNF11 στοχεύεται στο πρώιμο ενδόσωμα ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης SARA

Στη συνέχεια, έχοντας αποδείξει ότι οι πρωτεΐνες SARA/RNF11 αλληλεπιδρούν και συνεντοπίζονται, ελέγξαμε εάν η πρωτεΐνη SARA προσελκύει την πρωτεΐνη RNF11 στα ενδοσώματα. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε μια σταθερή σειρά κυττάρων NIH3T3, η οποία φέρει μια SARA-shRNAmir κατασκευή και μόνιμα καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης SARA (γράφημα, Εικ.3.6C). Μετά από υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-GFP, σε δύο διαφορετικούς σταθερούς κλώνους στους οποίους η SARA είχε εξαλειφτεί (Εικ.3.6C,b και c), διαπιστώσαμε ότι η κατανομή της πρωτεΐνης RNF11, παρά την απουσία της πρωτεΐνης SARA, παραμένει σικτική με πρότυπο πανομοιότυπο με αυτό των κυττάρων φυσικού τύπου (Εικ.3.6C,α).

3.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΥΦΙΣΤΑΤΑΙ ΜΥΡΙΣΤΟΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΟ ΑΚΡΟ ΚΑΙ ΓΡΗΓΟΡΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

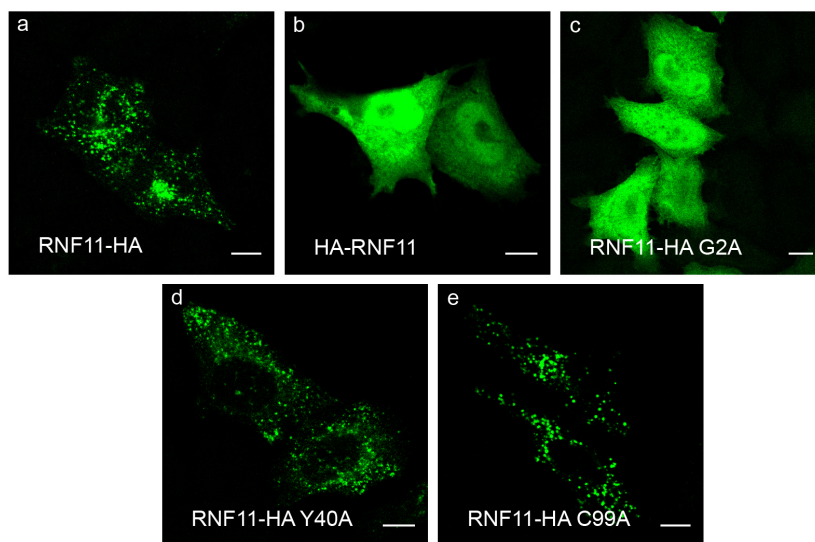
3.4.1 Η πρωτεΐνη RNF11 υφίσταται μυριστοϋλίωση

Έχοντας αποκλείσει το ενδεχόμενο προσέλκυσης της πρωτεΐνης RNF11 στα ενδοσώματα από την πρωτεΐνη SARA, θελήσαμε να εμβαθύνουμε περισσότερο στο μηχανισμό στόχευσης της πρωτεΐνης RNF11 στις ενδοσωματικές μεμβράνες. Η πρωτεΐνη RNF11 διαθέτει διάφορες χαρακτηρισμένες δομικές περιοχές και μοτίβα, όπως το PY μοτίβο στο αμινοτελικό και την RING δομική περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο. Ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, προβλέπει ότι η RNF11 είναι μια πρωτεΐνη που ενδεχομένως να υφίσταται μυριστοϋλίωση ([Myristoylator,http://ca.expasy.org/cgi-in/myristoylator/myristoylator.pl](http://ca.expasy.org/cgi-in/myristoylator/myristoylator.pl)) (<http://elm.eu.org/>). Η τελευταία είναι μια μη αντιστρεπτή, μετα-μεταφραστική τροποποίηση, στην οποία μια ομάδα μυριστοϋλίου ενώνεται ομοιοπολικά στην ακραία γλυκίνη του αμινοτελικού άκρου της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης.

Για να διαλευκάνουμε τη συνεισφορά των διαφόρων υποπεριοχών της πρωτεΐνης RNF11 στην ενδοσωματική του εντόπιση, ερευνήσαμε την κυτταρική εντόπιση μεταλλαγμένων μορφών που επηρεάζουν τη λειτουργία των δομικών της περιοχών, σε

σύγκριση με την κυτταρική εντόπιση της φυσικού τύπου πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη της τυροσίνης στη θέση 40 σε αλανίνη (Y40A) καταργεί το PY μοτίβο, ενώ η μετάλλαξη της κυστεΐνης στη θέση 99 σε αλανίνη (C99A) καταργεί τη λειτουργικότητα της RING δομικής περιοχής. Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa, η υπερεκφρασμένη RNF11 φυσικού τύπου και οι μεταλλαγμένες μορφές RNF11 C99A και RNF11 Y40A σημασμένες με τον επίτοπο HA στο καρβοξυτελικό τους άκρο (RNF11-HA, RNF11-HA C99A, RNF11-HA Y40A) παρουσίασαν παρόμοια στικτή διαμερισματοποίηση (Εικ.3.7a,d και e). Αντίθετα καταργώντας τη μυριστοϋλίωση, είτε σημαίνοντας την πρωτεΐνη στο αμινοτελικό της άκρο με τον επίτοπο HA (HA-RNF11) (Εικ.3.7b), είτε προκαλώντας μια σημειακή μετάλλαξη στη γλυκίνη της θέσης 2 σε αλανίνη της καρβοξυτελικά HA-σημασμένης πρωτεΐνης (RNF11-HA G2A) (Εικ.3.7c), η πρωτεΐνη δεν εμφανίζει στικτή κατανομή, αλλά βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.

Η τελευταία παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τροποποίηση της μυριστοϋλίωσης είναι απαραίτητη για την ενδοσωματική στόχευση της πρωτεΐνης RNF11, ενώ η παρουσία του PY μοτίβου και της RING περιοχής φαίνεται να μην παίζει ρόλο στην ενδοκυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.7: Η πρωτεΐνη RNF11 υφίσταται μυριστοϋλίωση στο αμινοτελικό της άκρο. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν προσωρινά με RNF11-HA (a), HA-RNF11 (b), RNF11-HA G2A (c), RNF11-HA Y40A (d) ή RNF11-HA C99A (e). Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων με PFA, ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με το α -HA αντίσωμα. Ράβδος κλίμακας, 10 μ m.

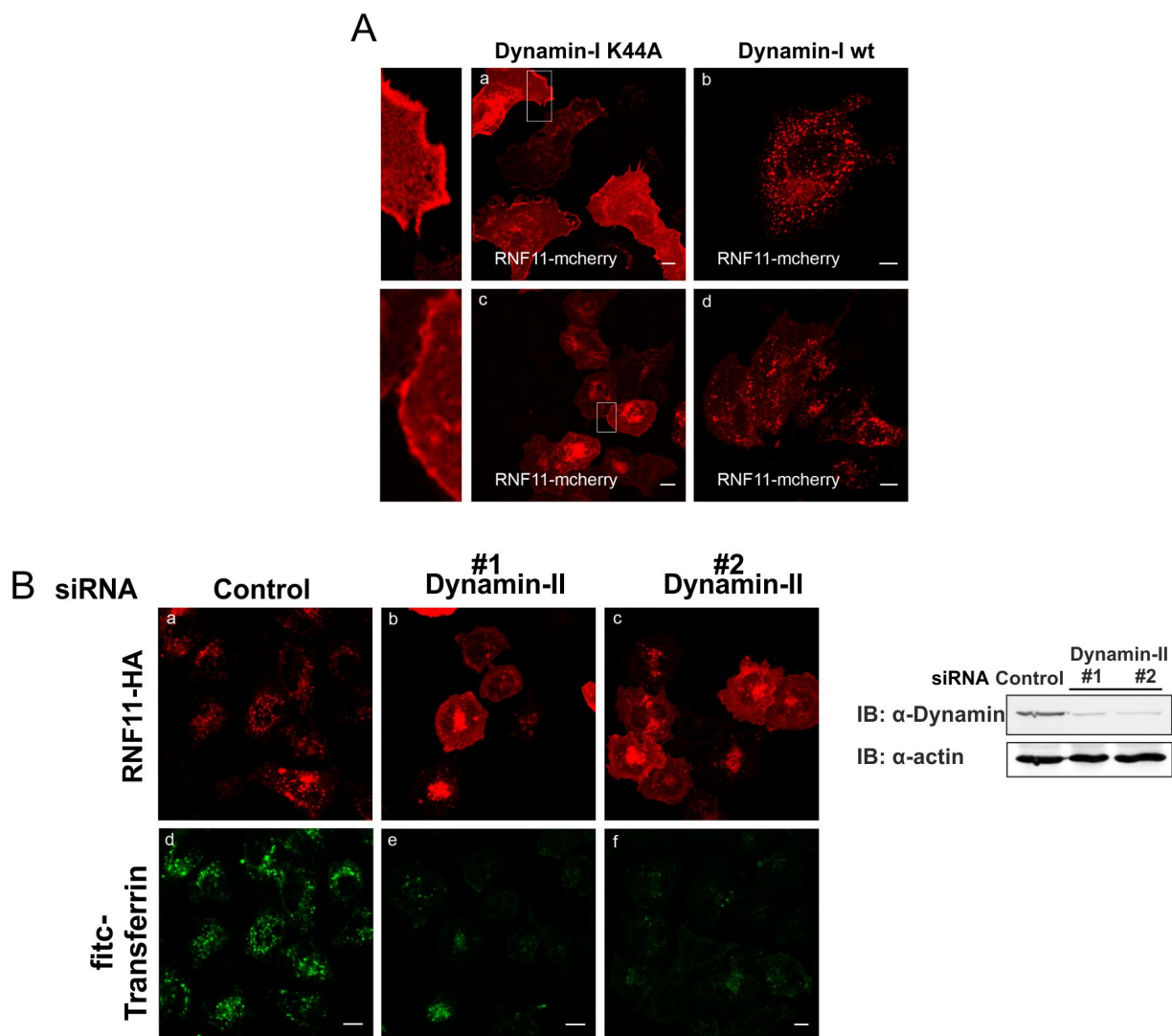
3.4.2 Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης επηρεάζει την κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης RNF11

Η μυριστοϋλίωση δεν θεωρείται ως μια τροποποίηση ειδική για τη στόχευση των πρωτεϊνών σε κάποιο ενδοκυτταρικό μεμβρανικό διαμέρισμα, αλλά είναι γνωστό πως σε συνδυασμό με άλλες τροποποιήσεις βοηθά γενικά στην αγκυροβόληση πρωτεϊνών σε μεμβράνες. Σε όλες τις μελέτες μικροσκοπίας που πραγματοποιήσαμε, δεν ανιχνεύσαμε κάποιο σημαντικό ποσοστό της πρωτεΐνης RNF11 στην πλασματική μεμβράνη. Υποθέσαμε λοιπόν ότι η πρωτεΐνη RNF11 θα πρέπει, μετά την σύνθεση και τη στόχευσή της στην πλασματική μεμβράνη, να ενδοκυτταρώνεται γρήγορα και να μετακινείται προς τα πρώιμα, τα όψιμα και γρήγορης ανακύκλωσης ενδοσώματα.

Για να αποδείξουμε το παραπάνω ενδεχόμενο, αναστείλαμε την ενδοκυττάρωση από την πλασματική μεμβράνη χρησιμοποιώντας μια μεταλλαγμένη μορφή της Dynamin-I (K44A). Η πρωτεΐνη αυτή φέρει στη λυσίνη της θέσης 44 αλανίνη, μπλοκάροντας με τον τρόπο αυτό την εκτομή των κυστιδίων από την πλασματική μεμβράνη. Πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφέρουμε, πως η Dynamin παίζει ρόλο τόσο στην κλαθρινο-εξαρτώμενη (CDE), όσο και την εξαρτώμενη από Caveolin-1 ενδοκυττάρωση (CIE), οπότε η αναστολή της λειτουργίας της επηρεάζει και τα δύο μονοπάτια. Ταυτόχρονη υπερέκφραση των RNF11-mcherry και Dynamin-I K44A, τόσο σε κύτταρα HUVE (Εικ.3.8A,a) όσο και σε κύτταρα HeLa (Εικ.3.8A,c), προκάλεσε δραματική αλλαγή στην κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης RNF11, η οποία φαίνεται να μένει παγιδευμένη στην κυτταρική μεμβράνη (Εικ.3.8A,a και c). Σε αντίθεση, η ταυτόχρονη υπερέκφραση της RNF11-mcherry μαζί με την Dynamin-I φυσικού τύπου, δεν επέφερε καμία αλλαγή στον εντοπισμό της πρωτεΐνης RNF11, τόσο σε κύτταρα HUVE όσο και σε κύτταρα HeLa (Εικ.3.8A,b και d).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επαληθεύτηκαν και με μια άλλη προσέγγιση, αυτή της αποσιώπησης του γονιδίου της *DNM-2* (Dynamin-II) με δυο διαφορετικά ειδικά ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής (siRNA), σε κύτταρα HeLa. Η ικανότητα αποσιώπησης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western (Εικ.3.8B), καθώς και με αναστολή της ενδοκυττάρωσης της τρανσφερίνης (Εικ.3.8B,e και f). Η τελευταία, είναι γνωστό ότι συνδεόμενη με τον αντίστοιχο υποδοχέα, χρησιμοποιεί την κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση για την είσοδο της μέσα στο κύτταρο, διαδικασία που αναστέλλεται με την εξάλειψη της πρωτεΐνης Dynamin. Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης με αποσιώπηση

του γονιδίου της *DNM-2* παγιδεύει την πρωτεΐνη RNF11 (RNF11-HA) στην κυτταρική μεμβράνη (Εικ.3.8B,b και c), ενώ στη περίπτωση του siRNA-μάρτυρα, η εντόπιση της πρωτεΐνης RNF11 είναι σπικτική (Εικ.3.8B,a), παρόμοια με αυτή της τρανσφερίνης (Εικ.3.8B,d).



Εικόνα 3.8: Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης επηρεάζει την κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης RNF11. (A) Κύτταρα HUVE (a and b) ή HeLa (c και d) διαμολύνθηκαν με RNF11-mcherry ταυτόχρονα με την μεταλλαγμένη μορφή της Dynamin-I (K44A) (a και c) ή την πρωτεΐνη αγρίου τύπου (Dynamin-I wt) (b and d). (B) Σε κύτταρα HeLa που έχουν διαμολυνθεί με siRNA έναντι του γονιδίου *DNM-2* (Dynamin-II) ή με siRNA-μάρτυρα, υπερεκφράστηκε η πρωτεΐνη RNF11-HA για 24 ώρες και ακολούθησε επώαση με fitc-Transferrin για 30 λεπτά, στους 37°C. Μετά τη μονιμοποίηση με PFA, ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα α -HA. Παράλληλα, έγινε λύση των κυττάρων με SDS και ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα α -Dynamin και α -actin. Ράβδος κλίμακας, 10 μ m.

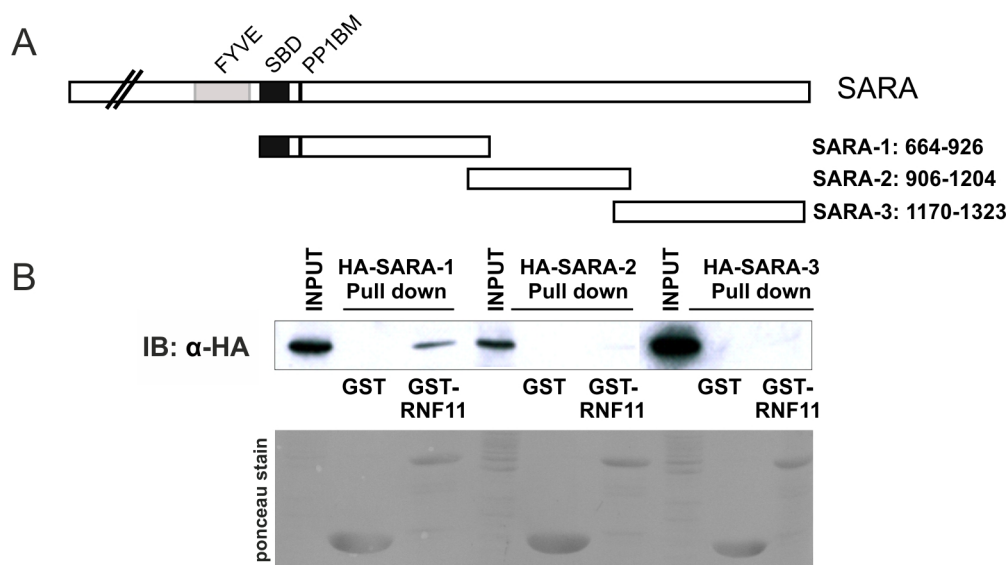
Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη RNF11 μετά τη σύνθεσή της οδηγείται στην πλασματική μεμβράνη και από εκεί, πολύ πιθανά, αλληλεπιδρώντας και σχηματίζοντας συμπλέγματα με άλλες πρωτεΐνες ή λιπίδια, ενδοκυτταρώνεται και συσσωρεύεται στα ενδοσωματικά μεμβρανικά διαμερίσματα.

3.5 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RNF11 ΚΑΙ SARA

3.5.1 Εύρεση της περιοχής της πρωτεΐνης SARA που αλληλεπιδρά με την RNF11

Με στόχο να χαρτογραφήσουμε την περιοχή της πρωτεΐνης SARA που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη RNF11, κατασκευάσαμε τρεις αλληλοεπικαλυπτόμενες κατασκευές του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης SARA, που χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα στην αρχική σάρωση του διπλού υβριδίου (Υποενότητα 1.4.4). Οι κατασκευές αυτές σημάνθηκαν με τον επίτοπο HA και είναι ως εξής: HA-SARA1 (664-926αα), HA-SARA2 (906-1024αα) και HA-SARA3 (1170-1323αα) (Εικ.3.9Α). Οι παραπάνω κατασκευές υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293 και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με καθαρή GST-RNF11 ή GST πρωτεΐνη σε πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.9B, η RNF11 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά μόνο με το πρώτο HA-SARA-1 τμήμα της πρωτεΐνης SARA, που εκτείνεται από το 664-926 αμινοξύ, και όχι με τις HA-SARA-2 και HA-SARA-3.

Η περιοχή από το 664-926 αμινοξύ, καθοδικά από την FYVE δομική περιοχή, που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την RNF11, φαίνεται πως αποτελεί μια λειτουργικά σημαντική περιοχή της πρωτεΐνης SARA, διότι μεσολαβεί την αλληλεπίδραση και με άλλες πολύ σημαντικές πρωτεΐνες, όπως τις SMAD2/3 και την PP1a φωσφατάση. Πρόσφατα, στο εργαστήριό μας βρέθηκε ότι η περιοχή αυτή, είναι υπεύθυνη και για την αλληλεπίδραση με την ERBIN, μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τον TGF-β¹⁹³.



Εικόνα 3.9: Χαρτογράφηση των περιοχών της SARA που αλληλεπιδρούν με την RNF11. (A) Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης SARA και των κατασκευών που δημιουργήθηκαν για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης με την RNF11. (B) Εκχυλίσματα HEK293 κυττάρων που υπερεκφράζουν την HA-SARA-1, HA-SARA-2 ή την HA-SARA-3 επώαστηκαν με GST-RNF11 ή GST πρωτεΐνη. Τα συμπλέγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το α-HA αντίσωμα. Στο κάτω μέρος του σχήματος εμφανίζεται η χρώση των GST πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Ponceau S.

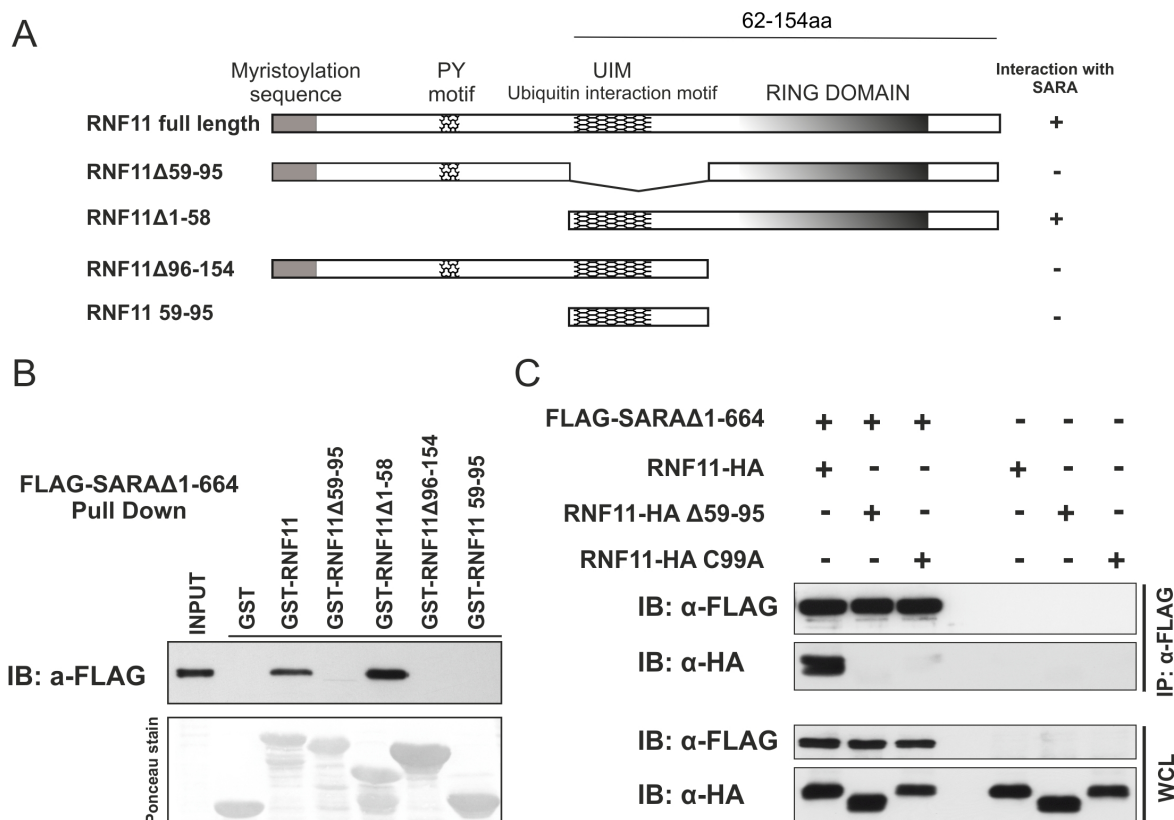
3.5.2 Η σημασία των δομικών περιοχών και μοτίβων της πρωτεΐνης RNF11 για τη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη SARA

Από τους θετικούς κλώνους της πρωτεΐνης RNF11 στη σάρωση του διπλού υβριδίου, γνωρίζαμε ότι η περιοχή αλληλεπίδρασής της RNF11 με την πρωτεΐνη SARA εκτείνεται από το 62-154 αμινοξύ (Εικ.3.10A). Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει την υποτιθέμενη περιοχή πρόσδεσης με την ουβικιτίνη (UIM, Ubiquitin interacting motif) και την RING δομική περιοχή. Θέλοντας να περιορίσουμε την περιοχή σύνδεσης ή να μελετήσουμε τη συνεισφορά των παραπάνω περιοχών της πρωτεΐνης RNF11 στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη SARA, δημιουργήθηκαν διάφορες κατασκευές της πρωτεΐνης RNF11 που αποκλείουν ή περικλείουν την προβλεπόμενη UIM ή την RING περιοχή. Οι κατασκευές αυτές περιγράφονται σχηματικά στην εικόνα 3.10A και είναι οι ακόλουθες: η RNF11Δ59-95 που υπολείπεται της πιθανής περιοχής σύνδεσης με την ουβικιτίνη, η RNF11Δ1-58 που υπολείπεται 58 αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο αλλά περιέχει το προβλεπόμενο μοτίβο UIM και την περιοχή RING, RNF11Δ96-154 που υπολείπεται μόνο της RING περιοχής και η RNF11 59-95 που είναι ένα μικρό τμήμα της πρωτεΐνης που περιέχει μόνο

το προβλεπόμενο UIM μοτίβο. Κάθε μια από τις παραπάνω, καθώς και η φυσικού τύπου πρωτεΐνη RNF11, εκφράστηκαν συντηγμένες με την πρωτεΐνη GST σε βακτήρια *E. Coli*. Μετά από καθαρισμό, μελετήθηκε η ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης SARA (SARAΔ1-664), ακολουθώντας τη δοκιμασία της πρωτεϊνικής καταβύθισης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μόνο η πρωτεΐνη φυσικού τύπου και η RNF11Δ1-58 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA, ενώ στις περιπτώσεις των πρωτεϊνών RNF11Δ59-95, RNF11Δ96-154 και RNF11 59-95, όπου έχουμε παρέμβει εξαλείφοντας, είτε την RING είτε την περιοχή από το 59-95 αα, η αλληλεπίδραση χάνεται (Εικ.3.10B).

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες (Εικ.3.10C). Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακούς φορείς είτε της φυσικού τύπου πρωτεΐνης RNF11-HA, είτε της RNF11-HA Δ59-95, που υπολείπεται της αμινοξικής αλληλουχίας για το προβλεπόμενο UIM μοτίβο, είτε της RNF11-HA C99A, που φέρει μια σημειακή μετάλλαξη στη κυστεΐνη 99 κάνοντας την RING δομική περιοχή μη λειτουργική. Μετά από ταυτόχρονη μόλυνση με αδενοϊό που εκφράζει ή όχι την πρωτεΐνη FLAG-SARAΔ1-664, ακολούθησε επώαση του κυτταρικού εκχυλίσματος με ειδικά σφαιρίδια ομοιοπολικά συνδεδεμένα με το αντίσωμα FLAG και ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης FLAG-SARAΔ1-664. Ανοσοαποτύπωση με το α-HA αντίσωμα έδειξε ότι μόνο η πρωτεΐνη φυσικού τύπου αλληλεπιδρά και όχι οι πρωτεΐνες RNF11-HA Δ59-95 και RNF11-HA C99A (Εικ.3.10C).

Από τις παραπάνω βιοχημικές μελέτες οδηγούμαστε στο συμπέρασμα, πως τόσο τα αμινοξέα 59-95, όσο και η RING δομική περιοχή είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης RNF11 με την SARA. Φαίνεται πως στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης RNF11, η αναδίπλωση της περιοχής 59-95 (UIM) μαζί με την RING-H2 δομή, σχηματίζουν την θέση σύνδεσης με την πρωτεΐνη SARA.



Εικόνα 3.10: Χαρτογράφηση των περιοχών της RNF11 που αλληλεπιδρούν με την SARA (A) Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης RNF11 με όλες τις γνωστές ή προβλεπόμενες δομικές περιοχές και μοτίβα, καθώς και οι κατασκευές που δημιουργήθηκαν για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης της RNF11 με την πρωτεΐνη SARA. (B) Εκχυλίσματα κυττάρων HEK293 που έχουν μολυνθεί με τον αδενοϊό FLAG-SARAΔ1-664, επώαστηκαν με τις GST ή GST-RNF11 φυσικού τύπου ή GST-RNF11Δ59-95 ή GST-RNF11Δ1-58 ή GST-RNF11Δ96-154 ή GST-RNF11 59-95 πρωτεΐνες. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το α-FLAG αντίσωμα. Στο κάτω μέρος του σχήματος εμφανίζεται η χρώση των GST πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Ponceau S. (C) Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές RNF11-HA, RNF11-HAΔ59-95 ή RNF11-HA C99A και ακολούθησε μόλυνση με τον αδενοϊό FLAG-SARAΔ1-664 ή αδενοϊό μάρτυρα. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα ομοιοπολικά με το α-FLAG αντίσωμα.

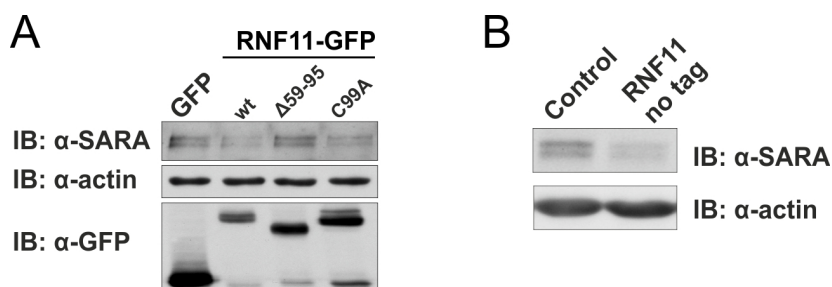
3.6 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RNF11 ΟΔΗΓΕΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ SARA ΣΕ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

3.6.1 Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 μειώνει τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης SARA

Έχοντας επιβεβαιώσει τον σχηματισμό του συμπλέγματος και χαρτογραφήσει τις περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών SARA/RNF11, θελήσαμε να ερευνήσουμε τη βιολογική σπουδαιότητα αυτής της αλληλεπίδρασης. Για την πρωτεΐνη RNF11, έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι αλληλεπιδρά τόσο με HECT-type E3 λιγάσες ουβικιτίνης (Nedd4, AIP4, Smurf1 και Smurf2), όσο και με πρωτεΐνες που προκαλούν αποουβικιτίνωση, όπως η AMSH^{168 171}. Θεωρήσαμε λοιπόν πολύ πιθανό το ενδεχόμενο, η RNF11 να επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης SARA. Για το σκοπό αυτό υπερεκφράσαμε με τη βοήθεια αδενοϊών, την πρωτεΐνη RNF11 φυσικού τύπου που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SARA (RNF11-GFP wt), καθώς και την RNF11-GFP Δ59-95 που δεν φέρει το προβλεπόμενο UIM μοτίβο ή την RNF11-GFP C99A που φέρει μια μετάλλαξη στη RING περιοχή, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA (Εικ.3.11A). Μετά από λύση των κυττάρων και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντίσωμα της έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης SARA, διαπιστώσαμε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-GFP μειώνει, σε σημαντικό βαθμό, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης SARA. Όσον αφορά τις δύο μεταλλαγμένες μορφές (RNF11-GFP Δ59-95 και RNF11-GFP C99A) που δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA, παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο η κάθε μια. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-GFP Δ59-95, η οποία δε φέρει το προβλεπόμενο μοτίβο αλληλεπίδρασης με την ουβικιτίνη, φαίνεται να μην επηρεάζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης SARA, διότι τα επίπεδά της είναι πανομοιότυπα με αυτά της περίπτωσης που υπερεκφράζουμε την πρωτεΐνη GFP. Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-GFP C99A επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης SARA, μειώνοντας τα βασικά της επίπεδα (Εικ.3.11A). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η περιοχή της RNF11 μεταξύ των 59-95 αα συμμετέχει ενεργά στην RNF11-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης SARA.

Η μείωση των βασικών επιπέδων της πρωτεΐνης SARA που προκαλείται από την πρωτεΐνη RNF11 παρατηρήθηκε και με υπερέκφραση της μη σημασμένης, φυσικού

τύπου, πρωτεΐνης RNF11. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε σταθερά σε κύτταρα HeLa και τα επίπεδα της πρωτεΐνης SARA ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western (Εικ.3.11B). Η παραπάνω παρατήρηση, αποκλείει την πιθανότητα μη ειδικής μείωσης των επιπέδων της πρωτεΐνης SARA, εξαιτίας της σύντηξης της πρωτεΐνης RNF11 με την πρωτεΐνη GFP.

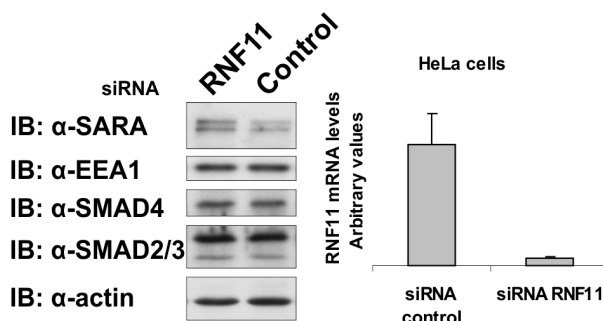


Εικόνα 3.11: Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 μειώνει τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης SARA. (A) Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε την πρωτεΐνη GFP, είτε τις RNF11-GFP φυσικού τύπου (wt), Δ59-95, που δεν διαθέτει το UIM μοτίβο ή C99A, που φέρει σημειακή μετάλλαξη στη RING περιοχή. Έπειτα από 24 ώρες απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SARA, actin και GFP. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά western εκχυλισμάτων κυττάρων που σταθερά φέρουν μια κατασκευή μάρτυρα ή μια κατασκευή που εκφράζει τη μη σημασμένη RNF11 πρωτεΐνη φυσικού τύπου.

Από την άλλη μεριά, η αποσιώπηση του RNF11 γονιδίου με ειδικό siRNA έδειξε αύξηση των βασικών επιπέδων της πρωτεΐνης SARA (Εικόνα 3.12), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της φυσικού τύπου πρωτεΐνης. Αυτό δεν παρατηρείται στην περίπτωση της EEA1, μιας πρωτεΐνης που επίσης εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα και φέρει FYVE περιοχή. Επίσης, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SMAD2/3, πρωτεϊνών που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος των TGFβ και ακτιβίνης και αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη SARA, καθώς επίσης και της SMAD4 που σχηματίζει σύμπλεγμα με τις SMAD2/3. Και σε αυτή την περίπτωση, η εξάλειψη της πρωτεΐνης RNF11 δεν επηρέασε τα επίπεδα των SMAD2/3/4. Η ικανότητα μείωσης του mRNA του γονιδίου RNF11 μετρήθηκε με ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), και αγγίζει το 90% (γράφημα, Εικόνα 3.12).

Με βάση όλα τα παραπάνω, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη RNF11 προκαλεί μείωση των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης SARA, ωστόσο η μείωση αυτή

φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του σχηματισμού συμπλέγματος μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.12: Αποσιώπηση του RNF11 γονιδίου αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SARA.

Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι του RNF11 ή με μη ειδικά ολιγονουκλεοτίδια. Μετά από 72 ώρες απομονώθηκε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα και ακολούθησε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά western. Στο γράφημα φαίνεται η ικανότητα των siRNA ολιγονουκλεοτιδίων να μειώνουν το mRNA του RNF11 γονιδίου.

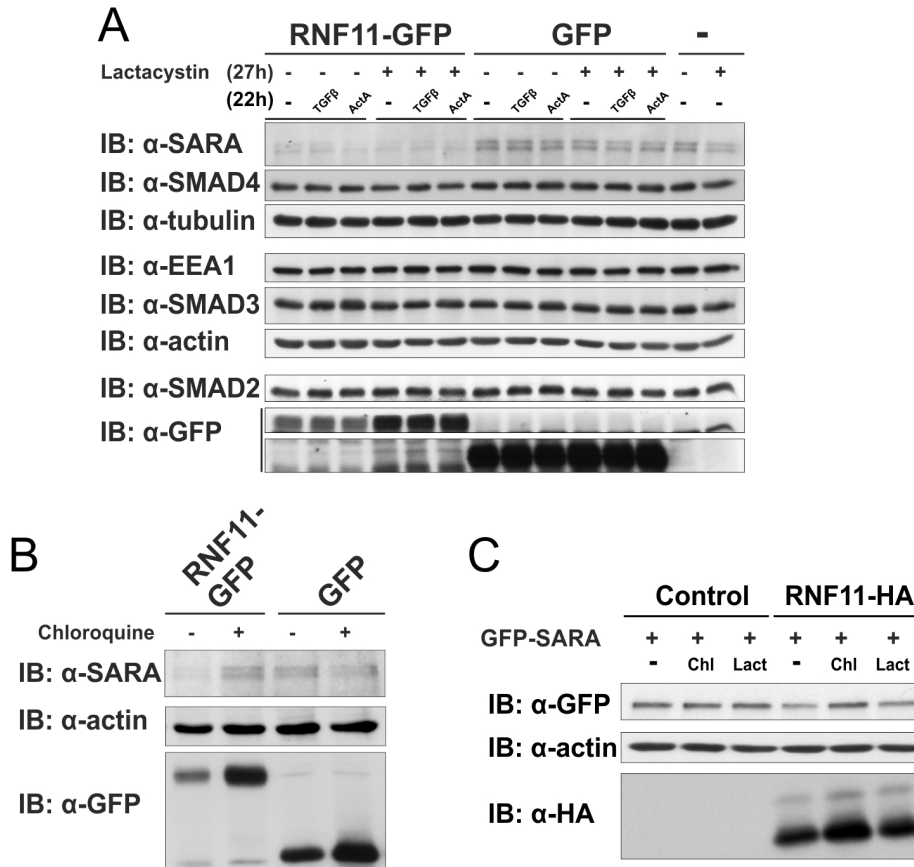
3.6.2 Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 αποικοδομεί τη SARA στο λυσόσωμα.

Ο κύριος μηχανισμός αποικοδόμησης των πρωτεϊνών στο κύτταρο ρυθμίζεται μέσω των μονοπατιών του πρωτεασώματος. Το πρωτεάσωμα, είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που αναγνωρίζει και καταστρέφει τις πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί με αλυσίδες ουβικιτίνης (poly-ubiquitin chains). Υποθέσαμε λοιπόν, πως η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης SARA από την πρωτεΐνη RNF11 οφείλεται σε αυξημένη αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Σε παρόμοιες μελέτες χρησιμοποιείται ο αναστολέας λακτακυστίνη (Lactacystin), μια ουσία που προσδένεται ομοιοπολικά και μη αντιστρεπτά στη β-υπομονάδα του πρωτεασώματος, εμποδίζοντας τη λειτουργία του. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη SARA έχει χαρακτηριστεί πολύ καλά ως μια πρωτεΐνη-ρυθμιστής του μονοπατιού μεταγωγής σήματος από τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β και ακτιβίνη. Υποθέσαμε λοιπόν πως, η αποικοδόμηση της SARA παρουσία RNF11 ελέγχεται από τους παραπάνω αυξητικούς παράγοντες και πραγματοποιείται στο πρωτεάσωμα. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, υπερεκφράσαμε την πρωτεΐνη RNF11-GFP ή την GFP σε κύτταρα HeLa. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν ή όχι με TGF-β ή

ακτιβίνη (ActA), παρουσία ή όχι της λακτακυστίνης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.13A, η πρωτεΐνη RNF11-GFP προκαλεί μείωση της πρωτεΐνης SARA, ενώ η παρουσία των αυξητικών παραγόντων TGF-β ή ακτιβίνης, καθώς και η ταυτόχρονη χορήγηση λακτακυστίνης, δεν την αναστρέφει. Σε αυτό το σημείο, ελέγχτηκε το βασικό επίπεδο και άλλων πρωτεϊνών, όπως των EEA1 και SMAD2/3/4, χωρίς όμως η πρωτεΐνη RNF11-GFP να προκαλεί κάποια αλλαγή σε αυτές (Εικόνα 3.13A). Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης SARA που προκαλείται από την πρωτεΐνη RNF11 είναι ανεξάρτητη του πρωτεασώματος και πιθανόν, να σχετίζεται με κάποιο άλλο μηχανισμό.

Προς αυτήν την κατεύθυνση, ελέγξαμε το ενδεχόμενο λυσοσωματικής αποικοδόμησης της πρωτεΐνης SARA από την πρωτεΐνη RNF11. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε έναν αναστολέα των λυσοσωματικών ενζύμων, τη χλωροκίνη (Cloroquine) και ελέγξαμε εάν αναστέλλεται η μεσολαβούμενη από την RNF11 μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης SARA. Πράγματι, επώαση μολυσμένων με RNF11-GFP ή GFP κυττάρων με χλωροκίνη, ανέστειλε πλήρως την εξάλειψη της ενδογενούς πρωτεΐνης SARA, παρόλη την περίσσεια της RNF11 πρωτεΐνης (Εικόνα 3.13B).

Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και με μια διαφορετική προσέγγιση. Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακούς φορείς της πρωτεΐνης GFP-SARA, ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη RNF11-HA ή φορέα μάρτυρα και έπειτα χορηγήθηκε χλωροκίνη ή λακτακυστίνη, ουσίες που αναστέλλουν τη δράση του λυσοσώματος ή του πρωτεασώματος, αντίστοιχα. Η χρήση των φαρμάκων δε μετέβαλε τα επίπεδα της GFP-SARA στα κύτταρα χωρίς υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-HA. Η παρουσία της RNF11-HA προκαλεί μείωση της πρωτεΐνης GFP-SARA, η οποία αναστέλλεται με τη χορήγηση χλωροκίνης (αναστολέας του λυσοσώματος), αλλά όχι με τη χορήγηση λακτακυστίνης (αναστολέας του πρωτεασώματος) (Εικόνα 3.13C). Το γεγονός ότι η GFP-SARA εκφράζεται υπό τον έλεγχο ενός διαφορετικού υποκινητή, από αυτό της ενδογενούς πρωτεΐνης SARA, εξαλείφει την πιθανότητα δράσης της πρωτεΐνης RNF11 στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου (*zFYVE9*) της πρωτεΐνης SARA. Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως η πρωτεΐνη RNF11 προκαλεί τη λυσοσωματική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA.

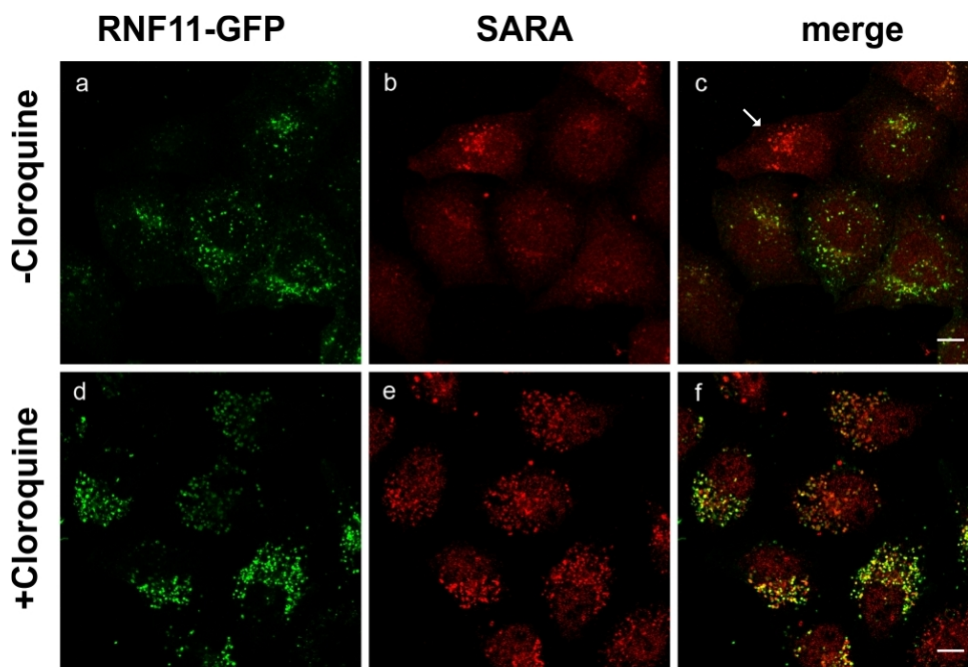


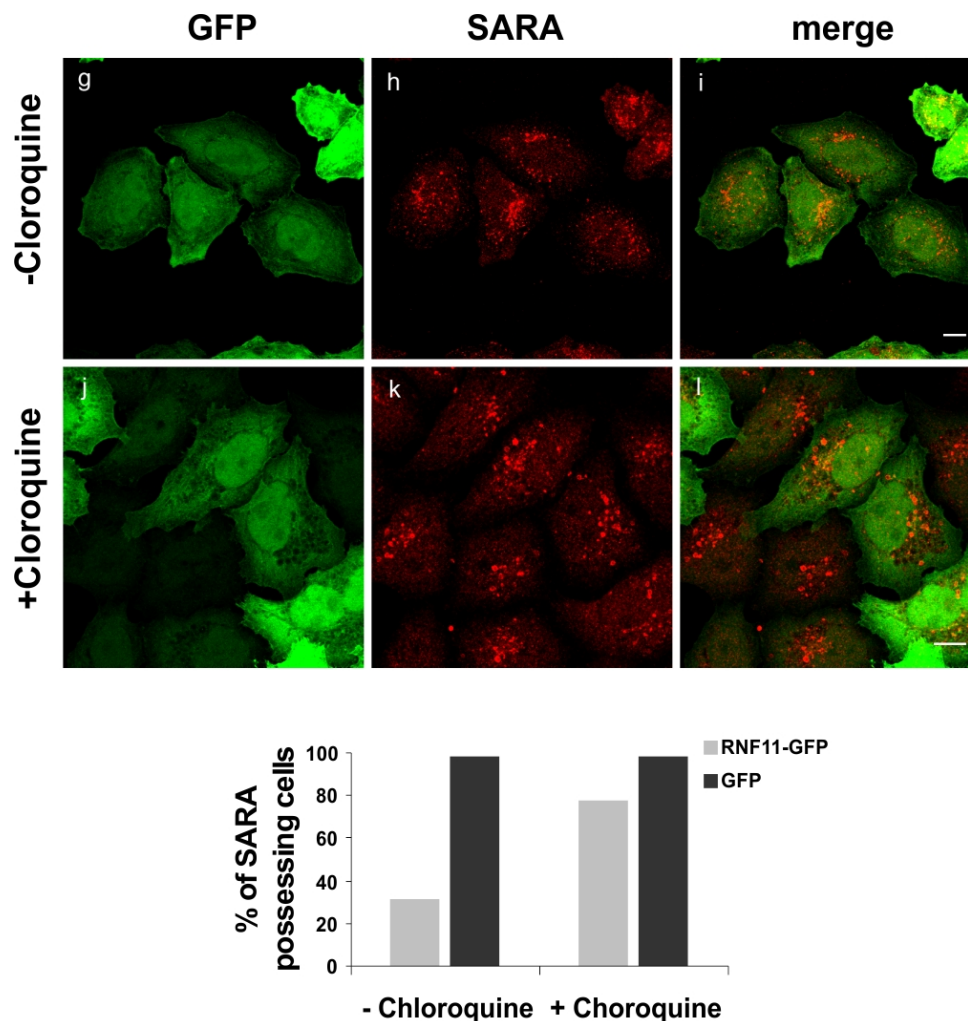
Εικόνα 3.13: Η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης SARA που προκαλείται από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11, σχετίζεται με λυσοσωματική και όχι προτεασωμική αποικοδόμηση. (A) Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την RNF11-GFP ή την GFP πρωτεΐνη. 8 ώρες αργότερα, μειώθηκε ο ορός από το θρεπτικό υλικό και χορηγήθηκε στα κύτταρα λακτακυστίνη (Lactacystin) σε συγκέντρωση 10μM. Μετά από 5 ώρες έγινε επαγωγή με TGF-β (2,5ng/ml) ή ActA (50ng/ml) για 22 ώρες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των SARA, SMAD4, tubulin, EEA1, SMAD3, actin, SMAD2 και GFP πρωτεϊνών. (B) Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την RNF11-GFP ή την GFP πρωτεΐνη. Μετά από 8 ώρες, χορηγήθηκε στα κύτταρα χλωροκίνη (chloroquine) σε συγκέντρωση 100μM, για 20 ώρες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα έναντι των SARA, actin, και GFP πρωτεϊνών. (C) HEK293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με GFP-SARA ταυτόχρονα με RNF11-HA ή κατασκευή μάρτυρα. Μετά από 18 ώρες στα κύτταρα χορηγήθηκε χλωροκίνη (Chl) ή λακτακυστίνη (Lact) για 24 ώρες. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανοσοαποτύπωση κατά western με τα αντισώματα α-GFP, α-actin και α-HA.

Επιπρόσθετα, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα ανοσοφθορισμού. Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την RNF11-GFP ή την πρωτεΐνη GFP και κατόπιν, επώαστηκαν με τον αναστολέα των λυσοσωμικών

ενζύμων χλωροκίνη. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.14, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11-GFP προκαλεί την αποικοδόμηση της ενδογενούς πρωτεΐνης SARA, ενώ στα κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί με τον αδενοϊό, η πρωτεΐνη SARA εκφράζεται και δεν αποικοδομείται (Εικ.3.14,a-c, βέλος). Ποσοτικοποιώντας τις παρατηρήσεις μας, διαπιστώσαμε ότι από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη RNF11, μόνο το 30% διαθέτει ανιχνεύσιμα ποσά της πρωτεΐνης SARA (Εικ.3.14, γράφημα). Επιάζοντας τα κύτταρα με χλωροκίνη αμέσως μετά από την μόλυνση με τον αδενοϊό που εκφράζει RNF11-GFP, ανιχνεύουμε την πρωτεΐνη SARA σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό που αγγίζει το 80% (Εικ.3.14,d-f και γράφημα). Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση της GFP πρωτεΐνης δεν επιφέρει καμία αλλαγή στα επίπεδα της SARA (Εικ.3.14,g-i και j-l).

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις και χρησιμοποιώντας πολλές και διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η πρωτεΐνη RNF11, προκαλεί τη λυσοσωματική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA, πολύ πιθανά μέσω ενός μηχανισμού που δεν προϋποθέτει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, αλλά εξαρτάται από την περιοχή μεταξύ των 59-95 αα (UIM), της πρωτεΐνης RNF11.





Εικόνα 3.14: Η υπερέκφραση της RNF11 προκαλεί την αποικοδόμηση της ενδογενούς SARA. Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την RNF11-GFP ή την πρωτεΐνη GFP. Μετά από 12 ώρες, χορηγήθηκε στα κύτταρα χλωροκίνη (chloroquine) σε συγκέντρωση 100μM για 12 ώρες. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης SARA. Το γράφημα αναπαριστά το ποσοστό των κυττάρων με ανιχνεύσιμα επίπεδα της πρωτεΐνης SARA. Ράβδος κλίμακας, 10μm.

3.7 ΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΤΩΝ RNF11/SARA ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΙΣ ESCRT-0 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

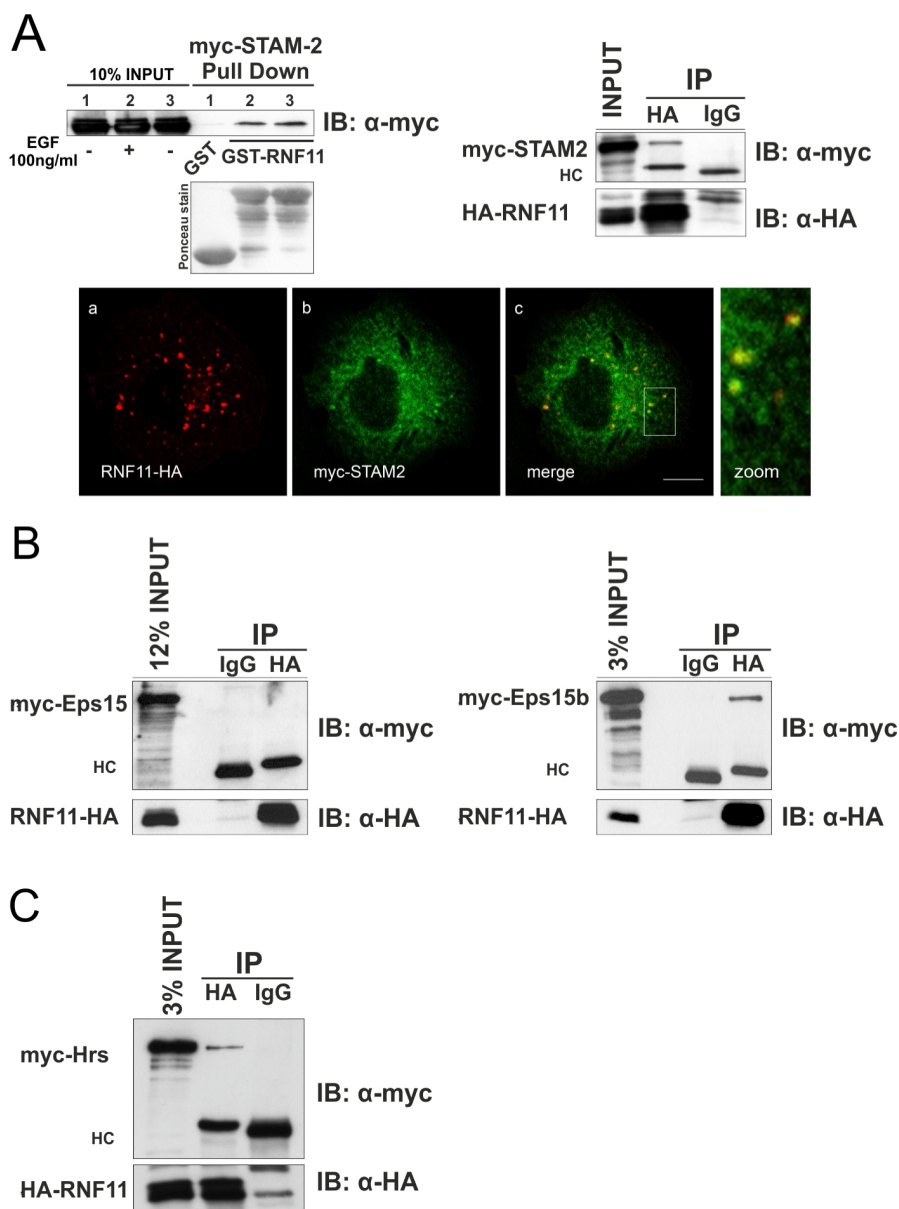
3.7.1 Η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τις STAM2, Eps15b και HRS

Η επιλεκτική μεταφορά των υποδοχέων που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη σε μία ή πολλαπλές θέσεις απαιτεί τη συντονισμένη δράση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, γνωστά ως ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport). Το πρώτο από αυτά, το

σύμπλεγμα ESCRT-0, αποτελείται από τις πρωτεΐνες HRS, STAM2 και την επικουρική Eps15b. Εκτενής περιγραφή των ιδιοτήτων αυτών των πρωτεϊνών, γίνεται στην υποενότητα της εισαγωγής 1.3.3.2.1. Στο σημείο αυτό θα υπενθυμίσουμε τη λειτουργία των παραπάνω πρωτεϊνών, οι οποίες μέσω των μοτίβων UIM που διαθέτουν, αλληλεπιδρούν με την ουβικιτίνη των σημασμένων υποδοχέων και τους οδηγούν στο λυσοσωμα για αποικοδόμηση. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η ανάστροφη μεταφορά τους προς την κυτταρική μεμβράνη, μέσω των μονοπατιών της ανακύκλωσης.

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η πρωτεΐνη RNF11 σε προηγούμενη σάρωση διπλού υβριδίου, έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες STAM2 και Eps15^{173 168}, κάτι που δεν έχει μέχρι στιγμής επιβεβαιωθεί βιοχημικά. Η Eps15, είναι μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση (CDE, clathrin-dependent endocytosis) και εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη ή στα καλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια (CCV, clathrin coated vesicles). Η Eps15b, είναι μια ισομορφή της Eps15, η οποία αλληλεπιδρά με την HRS *in vivo*, εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα και παίζει ρόλο στην αποικοδόμηση του EGFR υποδοχέα¹¹⁶.

Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η RNF11 πρωτεΐνη εντοπίζεται τόσο στο πρώιμο όσο και στο όψιμο ενδόσωμα και ότι επιπλέον, ενδεχομένως, διαθέτει ένα UIM μοτίβο, μας παρακίνησαν να ερευνήσουμε εάν η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος. Για το σκοπό αυτό, διαμολύναμε κύτταρα BHK με την πρωτεΐνη STAM2 και μετά από επώαση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με καθαρή πρωτεΐνη GST-RNF11, σε πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης, διαπιστώσαμε πως οι δυο πρωτεΐνες πράγματι αλληλεπιδρούν (Εικ.3.15A, πάνω αριστερά). Η STAM2/RNF11 αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε και σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, με ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο πρωτεϊνών (Εικ.3.15A, πάνω δεξιά). Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες myc-STAM2 και RNF11-HA υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK και μετά από ειδική ανοσοκατακρήμνιση των κυτταρικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιώντας το α-HA αντίσωμα, διαπιστώσαμε ότι η RNF11-HA συν-κατακρημνίζει την myc-STAM2, ένδειξη ότι αλληλεπιδρούν. Επιπρόσθετα, σε πειράματα ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα BHK, οι δυο πρωτεΐνες βρέθηκε να συνεντοπίζονται σε κυστίδια του κυτταροπλάσματος (Εικ.3.15A, κάτω).



Εικόνα 3.15: Η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που απαρτίζουν το ESCRT-0 σύμπλεγμα. (A) Οι πρωτεΐνες RNF11 και STAM2 αλληλεπιδρούν. (πάνω αριστερά) Η πρωτεΐνη myc-STAM2 υπερεκφράστηκε σε κύτταρα BHK με τη βοήθεια της T7 RNA πολυμεράσης του συστήματος του ιού της vaccinia, παρουσία ή απουσία EGF (100ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με καθαρές πρωτεΐνες GST-RNF11 ή GST ακινητοποιημένες σε Glutathione S-transferase σφαιρίδια. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το α-myc αντίσωμα. (πάνω δεξιά) Οι RNF11-HA και myc-STAM2 υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK και τα εκχυλίσματα ανοσοκατακρήνιστηκαν με α-HA ή IgG αντίσωμα. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση των συμπλόκων με το α-myc αντίσωμα. (κάτω) Κύτταρα BHK που υπερεκφράζουν τις RNF11-HA και myc-STAM2 ακινητοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με τα αντισώματα έναντι των HA και myc επιτόπων. Ράβδος κλίμακας, 10μm. (B) Η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με την Eps15b αλλά όχι με την Eps15 πρωτεΐνη: Οι RNF11-HA και myc-Eps15 ή myc-Eps15b πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK και ακολούθησε ανοσοκατακρήνιση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με το α-HA ή α-IgG αντίσωμα.

Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με α -HA και α -myc αντισώματα. (C) **Η RNF11 σχηματίζει σύμπλεγμα με την HRS πρωτεΐνη:** Οι RNF11-HA και myc-HRS υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με το α -HA ή α -IgG αντίσωμα και ανοσοαποτύπωση με τα α -HA και α -myc αντισώματα.

Στη συνέχεια, ερευνήσαμε την πιθανότητα αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RNF11/Eps15 ή RNF11/Eps15b. Η πρωτεΐνη RNF11-HA υπερεκφράστηκε σε κύτταρα BHK ταυτόχρονα με την myc-Eps15 ή την myc-Eps15b και τα εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με α -HA ή με μη ειδικό IgG αντίσωμα. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.15B, η RNF11-HA συν-κατακρημνίζει μόνο την Eps15b και όχι την Eps15. Οι δυο ισομορφές διαφέρουν μόνο στα πρώτα 100 αμινοξέα του αμινοτελικού τους άκρου (λείπουν από το Eps15b), παρόλα αυτά η κυτταρική τους εντόπιση είναι διαφορετική¹¹⁶. Το ίδιο φαίνεται συμβαίνει και με τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια, επειδή οι πρωτεΐνες STAM2 και Eps15b βρίσκονται σε σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη HRS, ερευνήσαμε την πιθανότητα αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης RNF11 με την πρωτεΐνη HRS. Εξετάζοντας πιο αναλυτικά την αλληλουχία της πρωτεΐνης RNF11, διαπιστώσαμε ότι περιέχει μια αλληλουχία δι-λευκίνης (di-leucine) που έπεται μιας ομάδας όξινων καταλοίπων ασπαραγίνης (11-DDISSLL-16). Η αλληλουχία αυτή βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης RNF11 και θα μπορούσε να αποτελέσει θέση δέσμησης της VHS περιοχής της STAM2 ή της HRS πρωτεΐνης. Μετά λοιπόν από υπερέκφραση της πρωτεΐνης myc-HRS ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη RNF11-HA και ανοσοκατακρήμνιση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με α -HA, διαπιστώσαμε ότι οι πρωτεΐνες HRS/RNF11 αλληλεπιδρούν, πολύ πιθανά μέσω της αλληλουχίας 11-DDISSLL-16 της πρωτεΐνης RNF11 και της VHS περιοχής της πρωτεΐνης HRS (Εικ.3.15C).

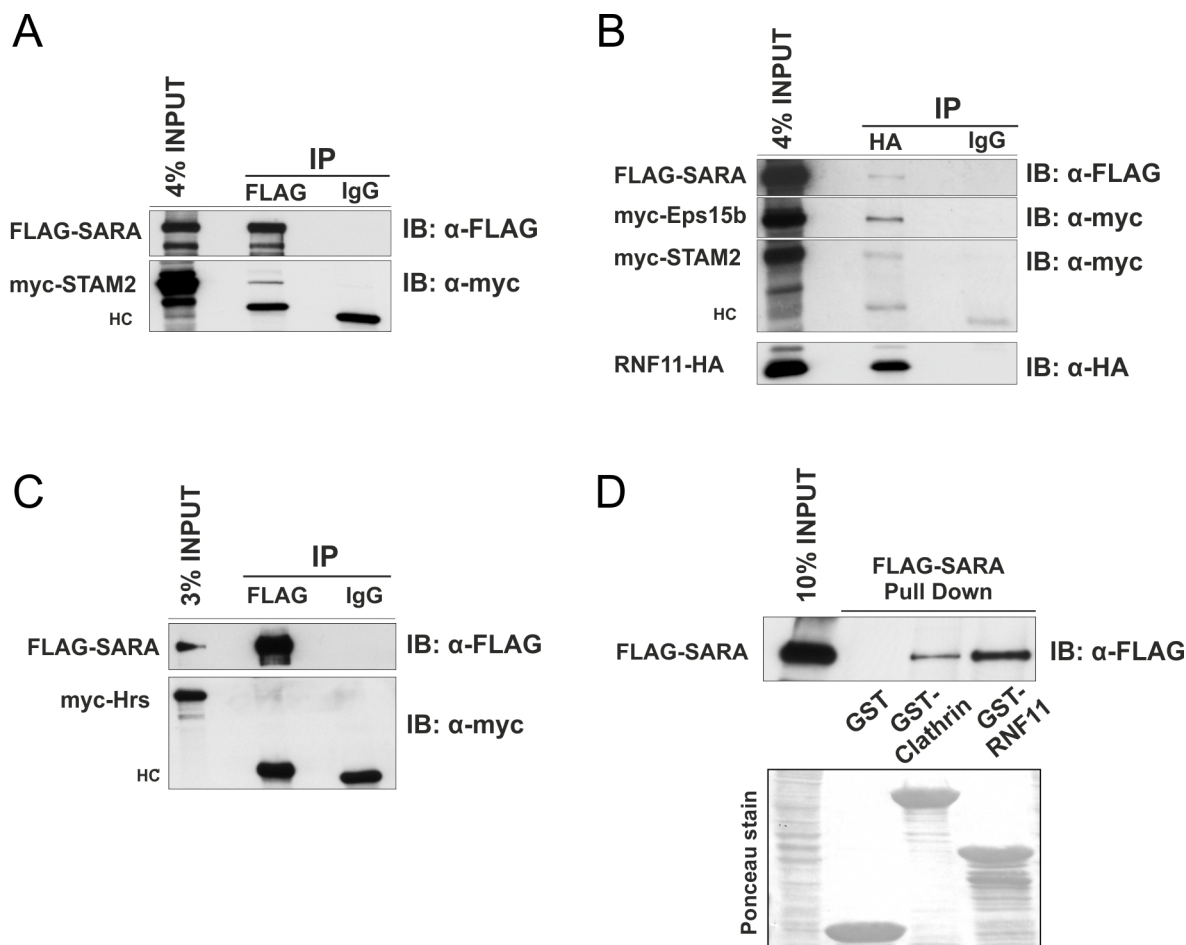
Από όλες τις παραπάνω βιοχημικές προσεγγίσεις είναι φανερό ότι η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με τις STAM2, Eps15b και HRS, πρωτεΐνες που εντοπίζονται, κυρίως, στο πρώιμο ενδόσωμα και την εξωτερική μεμβράνη των πολυκυστιδιακών σωμάτων, απαρτίζοντας το ESCRT-0 σύμπλεγμα.

3.7.2 Η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες STAM2 και κλαθρίνη, αλλά όχι με την πρωτεΐνη HRS

Εφόσον η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SARA καθώς και με τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος, ερευνήσαμε την πιθανότητα αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης SARA με την πρωτεΐνη STAM2. Κύτταρα BHK διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακές κατασκευές των myc-STAM2 και FLAG-SARA και τα εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με α -FLAG ή μη ειδικό IgG αντίσωμα. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.16A, η πρωτεΐνη SARA συν-κατακρημνίζει την πρωτεΐνη STAM2 ειδικά, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι αλληλεπιδρούν.

Στη συνέχεια, θέλοντας να αποδείξουμε την υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες SARA και RNF11 βρίσκονται ταυτόχρονα σε σύμπλεγμα με τις ESCRT-0 πρωτεΐνες, υπερέκφρασαμε σε κύτταρα BHK τις πρωτεΐνες RNF11-HA, FLAG-SARA, myc-STAM2 και myc-Eps15b και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης RNF11-HA με το αντίσωμα α -HA. Ανοσοαποτύπωση των συμπλόκων με τα αντισώματα α -FLAG και α -myc έδειξε ότι η RNF11-HA συν-κατακρημνίζει, ταυτόχρονα, τις πρωτεΐνες STAM2, Eps15b και SARA (Εικ.3.16B). Αν και το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να είχε προκύψει από τρία διαφορετικά και ανεξάρτητα συμπλέγματα της πρωτεΐνης RNF11 με κάθε μια από τις παραπάνω πρωτεΐνες, η άμεση αλληλεπίδραση των παραπάνω πρωτεϊνών μεταξύ τους (Colland 2004 και η παρούσα διατριβή) συνηγορεί ισχυρά υπέρ του συμπεράσματος ότι οι τέσσερις πρωτεΐνες, ενδεχομένως, σχηματίζουν ταυτόχρονα ένα σύμπλεγμα.

Από την άλλη μεριά, δεν ανιχνεύσαμε αλληλεπίδραση των FLAG-SARA και myc-HRS, μετά από ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα BHK και α -FLAG ανοσοκατακρήμνιση των κυτταρικών εκχυλισμάτων (Εικ.3.16C). Είναι, λοιπόν, πολύ πιθανό, η πρωτεΐνη SARA να σχηματίζει ένα εναλλακτικό σύμπλεγμα με τις STAM2/EPS15b/RNF11 στο οποίο δεν εμπεριέχεται η HRS, ενώ η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά τόσο με το παραπάνω σύμπλεγμα, όσο και το ESCRT-0, που περιέχει την πρωτεΐνη HRS.



Εικόνα 3.16: (A) **Οι πρωτεΐνες SARA και STAM2 αλληλεπιδρούν.** Οι FLAG-SARA και myc-STAM2 υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK με τη βοήθεια της T7 RNA πολυμεράσης του συστήματος του ιού της vaccinia και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με τα α-FLAG ή IgG αντισώματα. Ο σχηματισμός συμπλέγματος ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το α-myc αντίσωμα. (B) **Οι πρωτεΐνες SARA, Eps15b, STAM2 και RNF11 σχηματίζουν συν-κατακρημνίζονται:** Οι RNF11-HA, myc-Eps15b, myc-STAM2 και FLAG-SARA υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK και τα εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με α-HA ή IgG αντίσωμα. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση των δειγμάτων με το α-myc και το α-FLAG αντίσωμα και ανίχνευση των myc-Eps15b, myc-STAM2 και FLAG-SARA μόνο στην ανοσοκατακρήμνιση με το α-HA και όχι με το IgG αντίσωμα μάρτυρα. (C) **Η πρωτεΐνη SARA δεν αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HRS:** Οι FLAG-SARA και myc-HRS υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα BHK. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με το α-FLAG ή α-IgG αντίσωμα και ανοσοαποτύπωση με τα α-FLAG και α-myc αντισώματα. (D) **Η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη κλαθρίνη.** Καθαρές πρωτεΐνες GST, GST-Clathrin και GST-RNF11 επώαστηκαν με HEK293 κυτταρικά εκχυλίσματα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη FLAG-SARA. Τα συμπλέγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το α-FLAG αντίσωμα.

Ένα χαρακτηριστικό της HRS, είναι η ικανότητα να συνδέεται με την πρωτεΐνη κλαθρίνη, διαμέσου ενός μοτίβου σύνδεσης με κλαθρίνη (CB Clathrin binding motif) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε αύξηση της

συγκέντρωσης του συμπλέγματος ESCRT-0 σε συγκεκριμένες περιοχές των ενδοσωματικών μεμβρανών που έχουν κάλυμμα κλαθρίνης, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η λειτουργία του συμπλέγματος στη διαλογή του EGFR^{109 112 110}. Βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης SARA προβλέπει την ύπαρξη ενός μοτίβου αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη κλαθρίνη (<http://elm.eu.org/>). Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε εάν η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη κλαθρίνη, ακινητοποιήσαμε καθαρή πρωτεΐνη GST-clathrin, GST (αρνητικός μάρτυρας) και GST-RNF11 (θετικός μάρτυρας) σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκαταβύθισης, με κυτταρικά εκχυλίσματα μολυσμένα με τον αδενοϊό που εκφράζει την πρωτεΐνη FLAG-SARA. Ανάλυση των δειγμάτων και ανοσοαποτύπωση με το α-FLAG αντίσωμα έδειξε πως πράγματι η πρωτεΐνες κλαθρίνη και SARA αλληλεπιδρούν. Το γεγονός αυτό ενισχύει την πιθανότητα συμμετοχής της SARA στη δημιουργία ενός εναλλακτικού συμπλέγματος ESCRT-0.

3.8 Η RNF11 ΚΑΙ Η SARA ΠΑΙΡΝΟΥΝ ΜΕΡΟΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ EGFR ΓΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Ένα από τα φορτία που επιλέγεται από το σύμπλοκο ESCRT-0, στο πρώιμο ενδόσωμα, για λυσοσωματική αποικοδόμηση είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Οι υποδοχείς EGFR συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη με τον αντίστοιχο αυξητικό παράγοντα (EGF), γεγονός που προκαλεί τον διμερισμό, την αυτοφωσφορυλίωση και την ουβικιτίνωση των υποδοχέων EGFR σε πολλαπλές θέσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές βοηθούν στην προσέλκυση διαφόρων πρωτεϊνών, οι οποίες επιτρέπουν τη γρήγορη κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση των EGFR/EGF, τη συσσώρευση τους στο πρώιμο ενδόσωμα και τη μετέπειτα αποικοδόμηση τους στα λυσοσώματα. Τόσο ο ρυθμός ενδοκυττάρωσης, όσο και οι κινητικές αποικοδόμησης και ανακύκλωσής τους προς την κυτταρική μεμβράνη, μπορούν εύκολα να μελετηθούν, κάνοντας έτσι τον EGF και τον υποδοχέα του, σημαντικό εργαλείο για μελέτες που αφορούν τις παραπάνω διαδικασίες.

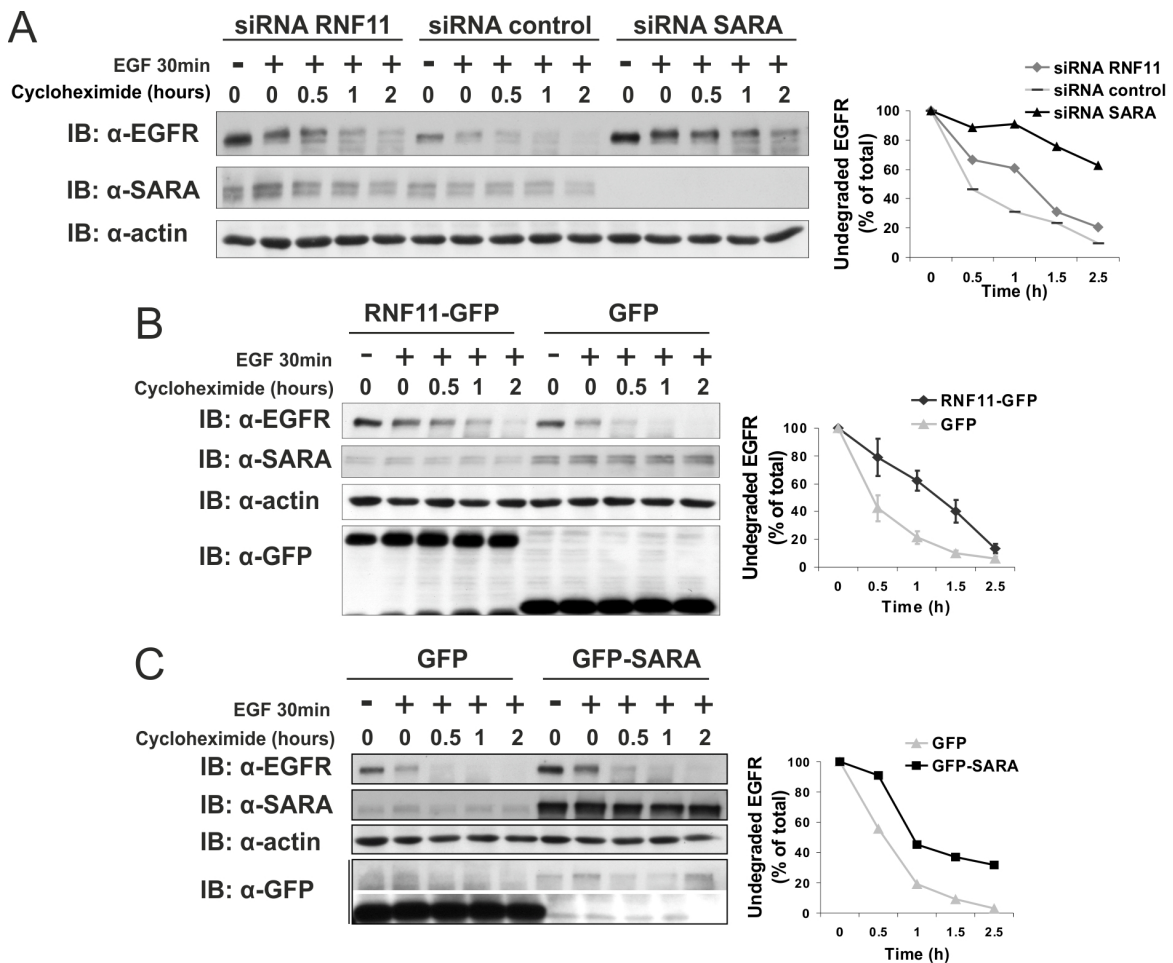
3.8.1 Απορύθμιση των επιπέδων των πρωτεϊνών RNF11 και SARA καθυστερεί την αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR

Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών SARA και RNF11 με τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος, μας παρότρυναν να μελετήσουμε την πιθανότητα συμμετοχής τους στη λειτουργία διαλογής του EGFR/EGF προς το λυσόσωμα. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη RNF11 έχει βρεθεί να επηρεάζει τα επίπεδα του υποδοχέα EGFR σε καρκινικά κύτταρα ¹⁶⁶.

Προς αυτή την κατεύθυνση, μελετήσαμε την αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR μετά από επαγωγή με τον αντίστοιχο αυξητικό παράγοντα EGF, υπό συνθήκες εξάλειψης ή υπερέκφρασης των πρωτεϊνών RNF11 και SARA. Σε κύτταρα HeLa, στα οποία το γονίδιο *RNF11* ή *zFYVE9* (SARA) έχει αποσιωπηθεί με siRNA ολιγονουκλεοτίδια, έγινε επαγωγή με EGF για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, αφαιρέσαμε το θρεπτικό υλικό που περιείχε τον EGF και καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, στο οποίο είχαμε προσθέσει κυκλοεξαμίδιο (cycloheximide), μια ουσία που σταματά την πρωτεϊνική σύνθεση. Τελικά μελετήσαμε την κινητική της αποικοδόμησης του EGFR σε σχέση με το χρόνο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.17A, στην περίπτωση που έχουμε διαμολύνει τα κύτταρα με control-μη ειδικά siRNA ολιγονουκλεοτίδια, η επαγωγή με EGF προκαλεί την σταδιακή αποικοδόμηση του υποδοχέα. Ήδη από τα πρώτα 30 λεπτά μετά την επαγωγή με EGF το 50% του υποδοχέα σε σχέση με το αρχικό ποσό έχει αποικοδομηθεί, μια διαδικασία που ολοκληρώνεται μετά από δύομιση περίπου ώρες. Στην περίπτωση που το *RNF11* γονίδιο έχει αποσιωπηθεί, η αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR είναι αισθητά μικρότερη, τόσο στα πρώτα 30 λεπτά (30% έχει αποικοδομηθεί), όσο και στα μετέπειτα χρονικά σημεία (Εικ.3.17A).

Παρόμοια πειράματα μετά από αποσιώπηση του γονιδίου *zFYVE9* (SARA), έδειξαν ότι και η εξάλειψη της πρωτεΐνης SARA καθυστερεί την αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό (Εικ.3.17A). Όπως φαίνεται από την καμπύλη του γραφήματος, καθώς και από την ανοσοαποτύπωση κατά western, το ποσό του υποδοχέα που οδηγείται στα λυσοσώματα για καταστροφή, μετά από διαμόλυνση με SARA-siRNA είναι πολύ μικρό, σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με control-siRNA. Το αποτέλεσμα είναι εμφανές τόσο στα πρώτα 30 λεπτά όσο και στα μετέπειτα χρονικά διαστήματα. Η ικανότητα εξάλειψης της πρωτεΐνης SARA φαίνεται στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα έναντι της ενδογενούς SARA,

ενώ η αποσιώπηση του *RNF11* γονιδίου ποσοτικοποιήθηκε με qRT-PCR και τα αποτελέσματα φαίνονται στο γράφημα της εικόνας 3.12. Οι παραπάνω παρατηρήσεις έχουν επιβεβαιωθεί με δύο διαφορετικά siRNA έναντι των *RNF11* και *zFYVE9* (SARA), ωστόσο στην εικόνα 3.17A παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός siRNA για κάθε πρωτεΐνη.



Εικόνα 3.17: Αύξηση ή μείωση των επιπέδων της *RNF11* ή της *SARA* πρωτεΐνης αναστέλλουν την αποικοδόμηση του *EGFR*. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με control siRNA ή ειδικά siRNA έναντι των *RNF11* και *SARA* (A), ή μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την *RNF11-GFP* και *GFP* πρωτεΐνη (B) ή μολύνθηκαν με αδενοϊούς της *GFP-SARA* και *GFP* πρωτεΐνης (C). 72 ώρες μετά την διαμόλυνση με τα siRNA ή 24 ώρες μετά την μόλυνση με τους αδενοϊούς, στα κύτταρα έγινε στέριση ορού για 5 ώρες και έπειτα ακολούθησε επαγωγή με *EGF* για 30 λεπτά. Ακολούθησε αφαίρεση του αυξητικού παράγοντα και προσθήκη κυκλοξαμιδίου για 30 λεπτά, 1 ώρα και 2 ώρες. Τα επίπεδα του *EGFR* εκτιμήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αντίσωμα. Στα γραφήματα αναπαριστάται το ποσοστό του *EGFR* που δεν έχει αποικοδομηθεί σε σχέση με τα αρχικά ποσά για κάθε περίπτωση. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε την ίδια δοκιμασία υπερέκφράζοντας τις πρωτεΐνες RNF11 και SARA. Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με κατάλληλους αδενοϊούς και τα επίπεδα του EGFR μελετήθηκαν, σε διάφορα χρονικά διαστήματα, μετά από επαγωγή με EGF και επώαση με κυκλοεξαμίδιο. Όπως και στην περίπτωση της εξάλειψης, έτσι και η υπερέκφραση των πρωτεϊνών RNF11-GFP (Εικ.3.17B) και GFP-SARA (Εικ.3.17C), οδηγεί σε αναστολή της αποικοδόμησης του υποδοχέα EGFR. Το αποτέλεσμα αυτό, φαίνεται τόσο από την ανοσοαποτύπωση κατά western όσο και από τα γραφήματα ποσοτικοποίησης, στα οποία υπολογίζεται το ποσοστό του υποδοχέα που δεν έχει αποικοδομηθεί, σε σχέση με το αρχικό ποσό πριν την επαγωγή των κυττάρων με EGF.

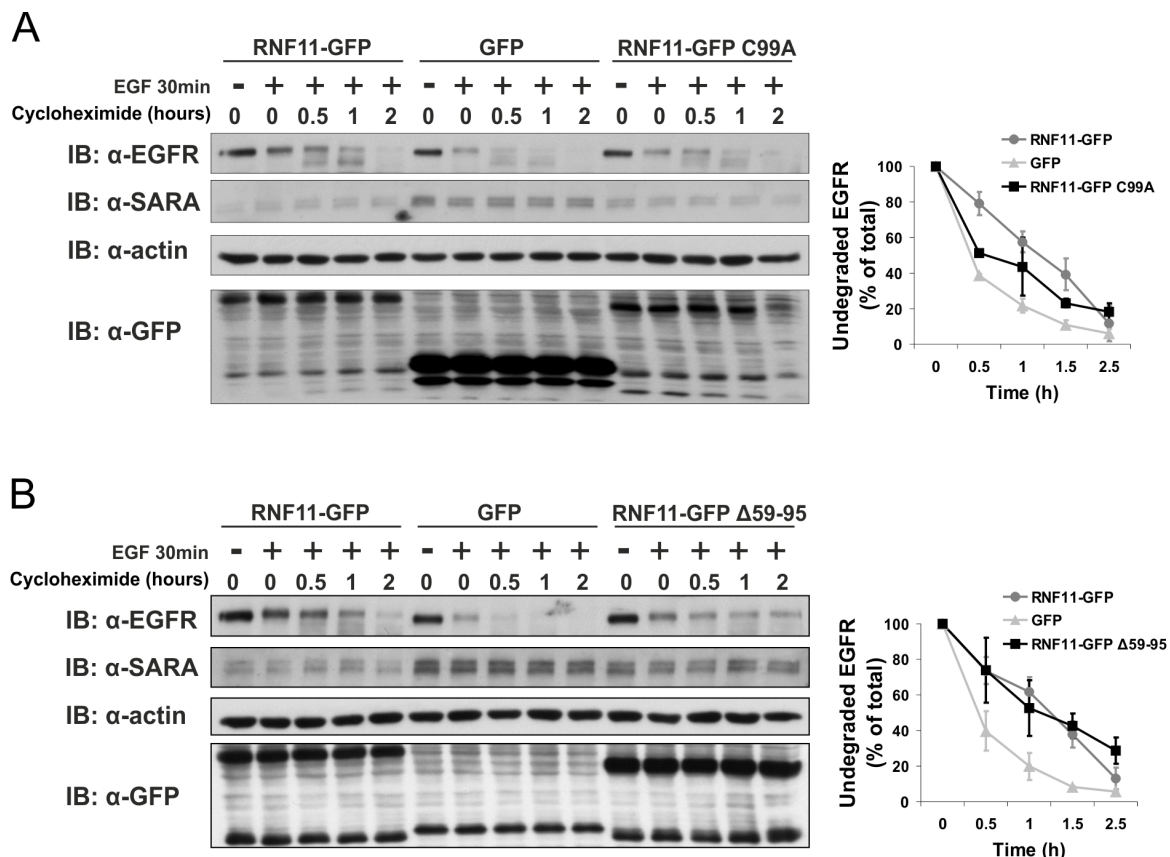
Συμπερασματικά λοιπόν, τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν ότι η απορύθμιση (αύξηση ή μείωση) των πρωτεϊνικών επιπέδων των RNF11 και SARA, επηρεάζουν το ρυθμό αποικοδόμησης του EGFR προς το λυσόσωμα. Η ιδιότητα αυτή, δηλαδή η αναστολή της αποικοδόμησης του EGFR, τόσο από την υπερέκφραση όσο και από την αποσιώπηση, είναι χαρακτηριστικό των μελών του ESCRT-0 συμπλέγματος, όπως των πρωτεϊνών HRS και Eps15b^{109 114 116}.

3.8.2 Η σημασία των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης RNF11 στην αποικοδόμηση του EGFR υποδοχέα.

Μέχρι στιγμής, έχουμε μελετήσει τη σημασία των αμινοξέων 59-95 και της RING περιοχής της πρωτεΐνης RNF11 στη σύνδεσή τους με την πρωτεΐνη SARA. Ακόμη, ερευνήσαμε τη σημασία των δύο περιοχών στη μείωση των βασικών επιπέδων της πρωτεΐνης SARA από την πρωτεΐνη RNF11. Έχοντας επίσης αποδείξει ότι η υπερέκφραση της RNF11-GFP καθυστερεί την αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR, θελήσαμε να διαλευκάνουμε τη σημασία αυτών των δομικών περιοχών στην αναστολή της αποικοδόμησης του EGF υποδοχέα, που προκαλείται από την πρωτεΐνη RNF11.

Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες RNF11-GFP, GFP ή RNF11-GFP C99A και τα επίπεδα του EGFR μελετήθηκαν μετά από επαγωγή με EGF, σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.18A, η σημειακή μετάλλαξη στη θέση 99 της RING δομικής περιοχής της πρωτεΐνης RNF11 αναστέλλει την αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR, αλλά σε μικρότερο βαθμό από την πρωτεΐνη φυσικού τύπου. Φαίνεται λοιπόν ότι η RING περιοχή της

πρωτεΐνης RNF11 συνεισφέρει στη διαλογή του EGFR προς το λυσόσωμα, πιθανότατα σε συνεργασία και με άλλες περιοχές της πρωτεΐνης.

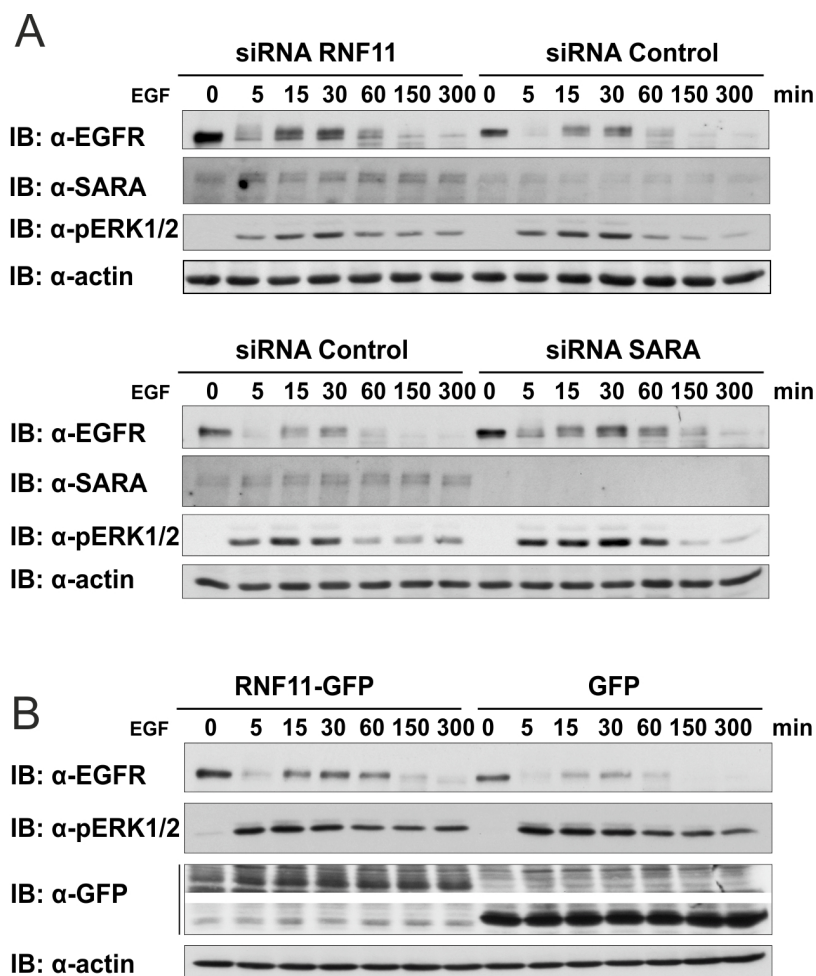


Εικόνα 3.18: Η σημασία των *UIM* και *RING* περιοχών της πρωτεΐνης *RNF11* στην αποικοδόμηση του *EGF* υποδοχέα. Κύτταρα *HeLa* μολύνθηκαν με αδenoϊούς που εκφράζουν την *RNF11-GFP*, *GFP* και *RNF11-GFP C99A* πρωτεΐνη (A), ή *RNF11-GFP*, *GFP* και *RNF11-GFP Δ59-95* πρωτεΐνη (B). 24 ώρες μετά την μόλυνση ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται στην εικόνα 3.17. Στα γραφήματα αναπαριστάται το ποσοστό του *EGFR* που δεν έχει αποικοδομηθεί σε σχέση με τα αρχικά ποσά για κάθε περίπτωση. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (*SD*, *Standard deviation*).

Στη συνέχεια εξετάσαμε, με όμοιες δοκιμασίες, την κινητική αποικοδόμησης του *EGFR* σε συνθήκες υπερέκφρασης της πρωτεΐνης *RNF11-GFP Δ59-95* που δεν φέρει την προβλεπόμενη περιοχή πρόσδεσης με την ουβικιτίνη (*UIM*). Η μεταλλαγμένη αυτή πρωτεΐνη δρα με παρόμοιο τρόπο με την πρωτεΐνη φυσικού τύπου, όσον αφορά την αποικοδόμηση του *EGFR*, οπότε καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η περιοχή από το 59-95 αα δεν είναι σημαντική για τη διαλογή του *EGFR* προς αποικοδόμηση.

3.9 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ *RNF11* ΚΑΙ *zFYVE9* (SARA) ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ EGF ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ERK1/2

Έχοντας αποδείξει πως η εξάλειψη των πρωτεϊνών *RNF11* και *SARA* αναστέλλουν την αποικοδόμηση, επομένως και τη μεταφορά του EGFR προς το λυσόσωμα, θελήσαμε να μελετήσουμε τον ρόλο αυτών των πρωτεϊνών στην επαγόμενη από τον EGF σηματοδότηση. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι των *RNF11* και *zFYVE9* (SARA) και τα επίπεδα της EGF-επαγόμενης φωσφορυλίωσης των ERK1/2 μελετήθηκαν με τη χρήση ειδικού αντισώματος με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western. Στην εικόνα 3.19A, παρατηρούμε ότι η εξάλειψη των πρωτεϊνών καθυστερεί την κινητική αποικοδόμησης του EGFR, καθώς και μεταβάλλει την κινητική φωσφορυλίωσης των ERK1/2. Στην περίπτωση αποσιώπησης του *RNF11* γονιδίου παρατηρούμε παρατεταμένη φωσφορυλίωση στα χρονικά διαστήματα μετά τα 30 λεπτά επαγωγής, ενώ όταν αποσιωπούμε το γονίδιο της *zFYVE9* (SARA), αυξάνονται τόσο τα επίπεδα όσο και η διάρκεια της φωσφορυλίωσης της ERK, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με αυτό της αποσιώπησης των γονιδίων γνωστών πρωτεϊνών του ESCRT-O συμπλέγματος. Πράγματι, η αποσιώπηση του γονιδίου της *HGS* (HRS) επηρεάζει την κινητική φωσφορυλίωσης των ERK1/2 πρωτεϊνών, οι οποίες παραμένουν φωσφορυλιωμένες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μετά από επαγωγή με EGF¹⁸². Από την άλλη μεριά, η υπερέκφραση της *RNF11*-GFP φαίνεται να μην επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των ERK1/2, μετά από επαγωγή με EGF (Εικ.3.19B).

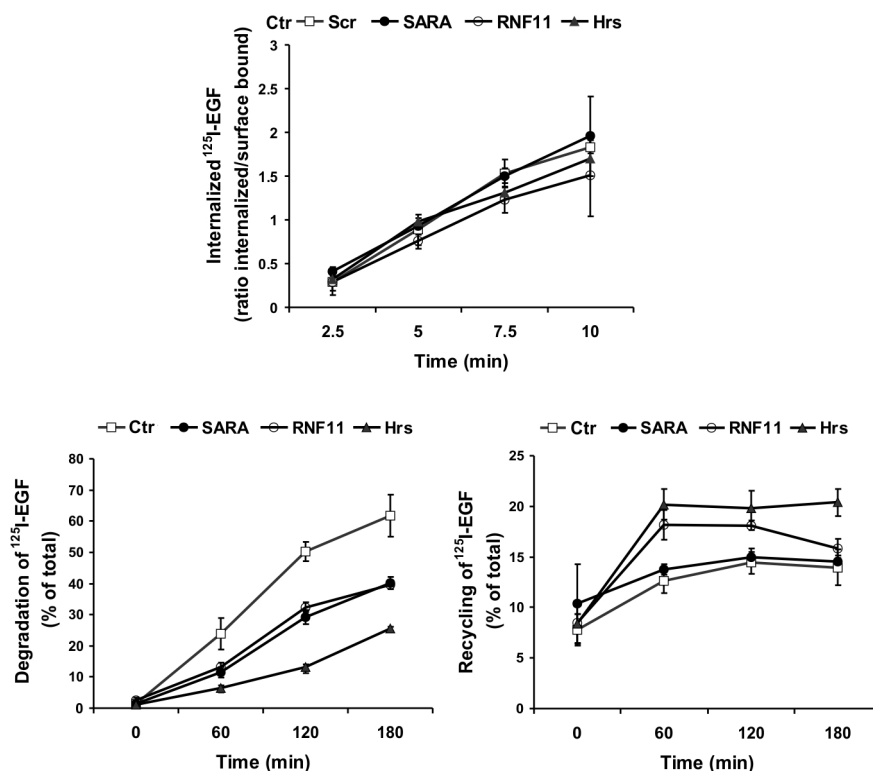


Εικόνα 3.19: Μείωση των επιπέδων της *RNF11* ή της *SARA* πρωτεΐνης αυξάνουν την EGF-επαγόμενη φωσφορυλίωση της ERK. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με control siRNA ή ειδικά siRNA για τις πρωτεΐνες *RNF11* και *SARA* (A), ή μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την *RNF11-GFP* ή *GFP* πρωτεΐνη (B). Ακολούθησε στέρηση ορού και επαγωγή με EGF (100ng/ml) για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα. Η φωσφορυλίωση των ERK1/2 εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ειδικό α-pERK1/2 αντίσωμα.

3.10 Η ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ *RNF11* ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ EGF, ΕΝΩ Η ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ *zFYVE9* (*SARA*) ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΔΕΝ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ

Η παρατεταμένη φωσφορυλίωση των ERK1/2 που παρατηρείται μετά από αποσιώπηση του γονιδίου *HGS* (*HRS*) έχει αποδοθεί στη μείωση της αποικοδόμησης του EGFR, αλλά και στην αύξηση της ανακύκλωσής του προς την κυτταρική μεμβράνη^{183 116}. Με αυτό ως δεδομένο, θελήσαμε να μελετήσουμε το αποτέλεσμα της αποσιώπησης των

RNF11 και *zFYVE* (SARA) γονιδίων στην ανακύκλωση του EGF αυξητικού παράγοντα. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι των *RNF11*, *zFYVE9* (SARA) και *HGS* (HRS) και μετά από επώαση των κυττάρων με ^{125}I -EGF μετρήθηκε η ενδοκυττάρωση, η αποικοδόμηση και η ανακύκλωσή του σε διάφορα χρονικά διαστήματα.



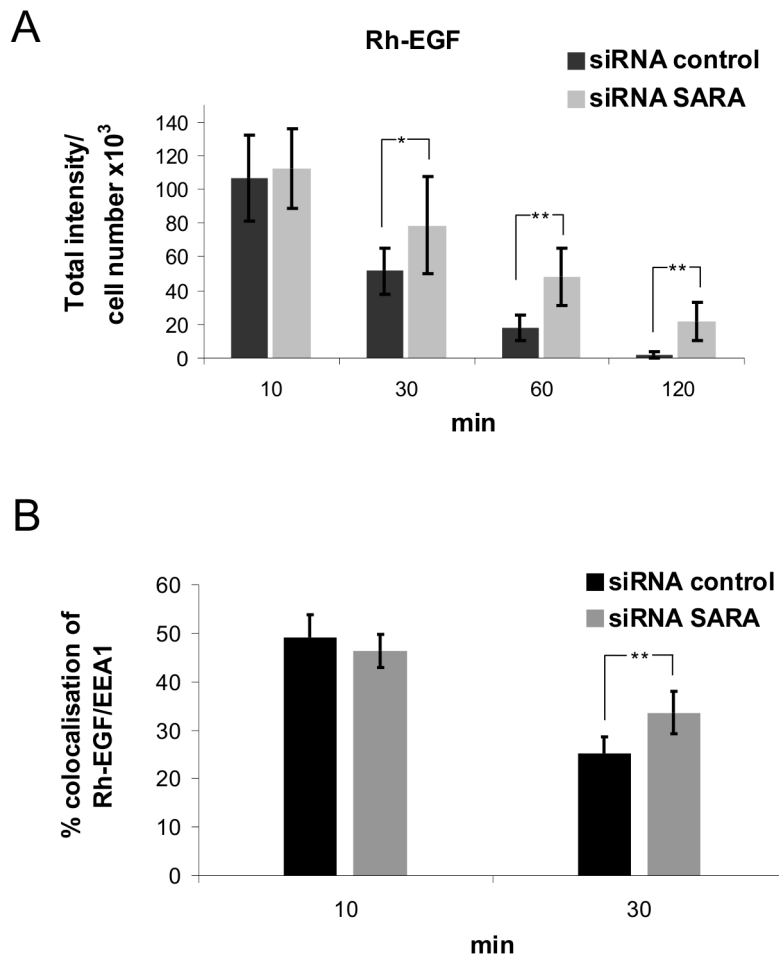
Εικόνα 3.20: Αποσιώπηση του *RNF11* γονιδίου αυξάνει την ανακύκλωση του ^{125}I -EGF προς την κυτταρική μεμβράνη. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι των *zFYVE9* (SARA), *RNF11*, *HGS* (HRS) ή με control siRNA. Έπειτα στα κύτταρα χορηγήθηκε ^{125}I -EGF και μελετήθηκε η ενδοκυττάρωση, ή η αποικοδόμηση, ή η ανακύκλωση του προς την κυτταρική μεμβράνη. Τα ακριβή βήματα των δοκιμασιών περιγράφονται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές SEM (Standard error of the mean).

Οι πρωτεΐνες *RNF11* και *SARA* δεν επηρεάζουν την ενδοκυττάρωση του ^{125}I -EGF (Εικ.3.20, πάνω), ωστόσο όπως ήταν αναμενόμενο, καθυστερούν αισθητά την αποικοδόμηση του ^{125}I -EGF (Εικ.3.20, κάτω και αριστερά). Σε δοκιμασίες που μας επιτρέπουν να μελετήσουμε την ανακύκλωση του ^{125}I -EGF, διαπιστώσαμε πως μετά από αποσιώπηση της *RNF11* προκαλείται αύξηση της ανακύκλωσης του ^{125}I -EGF προς την μεμβράνη, κάτι που επίσης παρατηρείται και με αποσιώπηση του γονιδίου *HGS* (HRS)¹¹⁶. Σε αντίθεση, η αποσιώπηση του γονιδίου *zFYVE* (SARA) δεν προκαλεί καμία αλλαγή στην

ανακύκλωση του I^{125} -EGF και ο ρυθμός ανακύκλωσής του είναι πανομοιότυπος με τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το siRNA μάρτυρα (Εικ.3.20, κάτω δεξιά).

Η αναστολή της αποικοδόμησης του EGF μετά από αποσιώπηση του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου, επιβεβαιώθηκε και με πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι του γονιδίου της πρωτεΐνης *zFYVE9* (SARA) και μετά από επαγωγή με EGF συζευγμένο με ροδαμίνη (Rh-EGF) για 5 λεπτά, πλύση και ανανέωση του θρεπτικού υλικού, ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων έπειτα από 10, 60 και 120 λεπτά. Στην εικόνα 3.21A, παρατηρούμε ότι στα πρώτα 10 λεπτά η ποσότητα του Rh-EGF που έχει εισέλθει στα κύτταρα είναι η ίση, παρουσία ή απουσία της πρωτεΐνης SARA. Έπειτα όμως από 30, 60 ή 120 λεπτά, παρατηρούμε ότι ο Rh-EGF που έχει απομείνει στα κύτταρα είναι αυξημένος στη περίπτωση της αποσιώπησης του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου. Θέλοντας να μελετήσουμε το ποσοστό του EGF που βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα μετά την ενδοκυττάρωσή του, βάψαμε τα κύτταρα και με την πρωτεΐνη EEA1. Παρατηρούμε πως στην περίπτωση που έχουμε εξαλείψει την πρωτεΐνη SARA, το ποσοστό του Rh-EGF που εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, 30 λεπτά μετά την ενδοκυττάρωσή του, είναι αυξημένο σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα, γεγονός που δικαιολογεί την παρατεταμένη ενεργοποίηση των ERK1/2 μετά από αποσιώπηση του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου (Εικ.3.21B). Σε μετέπειτα στάδια το ποσό του Rh-EGF στα κύτταρα μάρτυρας είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο, οπότε η ανάλυση του συνεντοπισμού του με την EEA1 είναι αδύνατη.

Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε πως στην περίπτωση της εξάλειψης της πρωτεΐνης RNF11, ο EGF καθυστερεί να αποικοδομηθεί και ανακυκλώνεται με πιο έντονο ρυθμό προς την κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, στην περίπτωση που εξαλείφεται η πρωτεΐνη SARA, η αναστολή της αποικοδόμησης του EGF δεν συνεπάγεται αύξηση της ανακύκλωσής του προς την κυτταρική μεμβράνη, αλλά παρατεταμένη παραμονή στο πρώιμο ενδοσώμα ή σε κάποιο συναφές ενδοσωματικό διαμέρισμα. Πράγματι, η συνεντόπιση του Rh-EGF με την EEA1 πρωτεΐνη είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη στην περίπτωση της αποσιώπησης του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου, σε σύγκριση με το μάρτυρα (Εικ.3.21B). Ωστόσο, παρόλο που ο μηχανισμός φαίνεται να είναι διαφορετικός, η εξάλειψη τόσο της πρωτεΐνης RNF11 όσο και της πρωτεΐνης SARA, οδηγεί σε αυξημένη EGF-επαγόμενη φωσφορυλίωση της ERK.



Εικόνα 3.21: Εξάλειψη της πρωτεΐνης SARA μειώνει την αποικοδόμηση του Rh-EGF. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι του γονιδίου zFYVE9 (SARA) ή με control siRNA. Έπειτα από 72 ώρες, στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε σέρηση ορού και επαγωγή με Rh-EGF (100ng/ml) για 5 λεπτά, στους 37°C. Ακολούθησε πλύση και προσθήκη θρεπτικού υλικού που περιείχε κυκλοεξαμίδιο (25 µg/ml) για 10,30, 60 και 120 λεπτά. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της EEA1. Στο (A) απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού του Rh-EGF ανά κύτταρο, ενώ στο (B) αναπαριστάται το ποσοστό του συνεντοπισμού της Rh-EGF με την πρωτεΐνη EEA1. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακοσίων περίπου κυττάρων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation) * $p < 0.02$, ** $p < 0.0001$.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα προηγούμενα χρόνια, το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών επικεντρώθηκε στη διαλεύκανση των μηχανισμών της ενδομεμβρανικής διακίνησης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, καθώς και στη σχέση της με τη μεταγωγή σήματος. Τα ευρήματα αυτών των μελετών έχουν αποκαλύψει πλήθος ρυθμιστικών μορίων που συνεργάζονται αρμονικά και συντονίζουν, τόσο τα αρχικά στάδια εισόδου των υποδοχέων στο κύτταρο, όσο και τη μετέπειτα διακίνησή τους στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Επίσης, απέδειξαν ότι υπάρχει μια αλληλένδετη σχέση των παραπάνω διαδικασιών με την ενεργοποίηση καθοδικών σηματοδοτικών μορίων.

Η πρωτεΐνη SARA, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, εμφανίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην σηματοδότηση από τον TGFβ, όσο και στην ενδοκυτταρική διακίνηση υποδοχέων (υποενότητες 1.4.2 και 1.4.1, αντίστοιχα). Για το λόγο αυτό στο εργαστήριο στο οποίο εκπονήθηκε η διατριβή, ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη SARA, χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων. Μια από αυτές ήταν η πρωτεΐνη RNF11, την οποία επιλέξαμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, για να μελετήσουμε τον ρόλο της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη SARA και την ενδεχόμενη συμμετοχή των RNF11/SARA στην ενδοκυτταρική διακίνηση και τη μεταγωγή σήματος.

Η πρωτεΐνη RNF11 είναι μια μικρή, RING-H2 E3 λιγάση, η οποία διαθέτει ένα PY μοτίβο, ένα προβλεπόμενο UIM μοτίβο και μια RING δομική περιοχή¹⁷¹. Η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με E3-λιγάσες, E2-ένζυμα σύζευξης και πολλές άλλες πρωτεΐνες και φαίνεται να εμπλέκεται σε πλήθος διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το TGFβ/SMAD, το EGF/ERK και το NF-κB μονοπάτι^{165 166 174}. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι αλληλεπιδρά και με πρωτεΐνες που προκαλούν αποουβικιτίνωση (DUB), όπως η AMSH¹⁶⁸. Φαίνεται λοιπόν ότι η πρωτεΐνη RNF11 διαδραματίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο, σε διαδικασίες που σχετίζονται με την ουβικιτίνωση πρωτεϊνών. Οι παραπάνω δομικές και μοριακές της ιδιότητες, καθιστούν την πρωτεΐνη RNF11 ως ένα ελκυστικό μόριο, για τη μελέτη της σημαντικότητας της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη SARA, τόσο στη μεταγωγή σήματος όσο και στην ενδοκυτταρική διακίνηση.

Πρωταρχικό μας μέλημα ήταν να επιβεβαιώσουμε την αλληλεπίδραση και με πρόσθετες βιοχημικές μεθόδους. Πράγματι, πειράματα πρωτεϊνικής καταβύθισης και ανοσοκατακρήμνισης απέδειξαν πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Στη συνέχεια μελετήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τόσο της πρωτεΐνης SARA όσο και της πρωτεΐνης RNF11. Σε συμφωνία με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα^{75 147 148}, πειράματα ανοσοφθορισμού και εκτεταμένη στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων έδειξαν, πως η πρωτεΐνη SARA εντοπίζεται κυρίως στο πρώιμο ενδόσωμα, αφού συνεντοπίζεται με τις πρωτεΐνες EEA1, Rab5a, Rabenosyn-5 και Rabankyrin. Η πρωτεΐνη SARA εντοπίζεται επίσης και στο ενδόσωμα γρήγορης ανακύκλωσης (Rab4 δείκτης), ωστόσο πολύ μικρότερα ποσοστά αυτής βρέθηκαν στο ενδόσωμα αργής ανακύκλωσης προς την κυτταρική μεμβράνη (Rab11 δείκτης). Η πρωτεΐνη SARA αποκλείεται από τα καλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια (AP2 δείκτης), ενώ μικρός αλλά στατιστικά σημαντικός φαίνεται να είναι ο συνεντοπισμός της με τους δείκτες του όψιμου ενδοσώματος (Rab7 δείκτης) και του λυσοσώματος (Lamp1 δείκτης).

Παράλληλα, εκτεταμένη ανάλυση του κυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης RNF11 έδειξε ότι εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, ενώ αποκλείεται από την κυτταρική μεμβράνη ή τον πυρήνα. Χρησιμοποιώντας δείκτες των διαφόρων ενδοσωματικών διαμερισμάτων, διαπιστώσαμε πως η πρωτεΐνη RNF11 διακοσμεί το πρώιμο ενδόσωμα, αφού συνεντοπίζεται με τις EEA1, Rab5a και Rabenosyn-5. Επιπρόσθετα, σημαντική ποσότητα της πρωτεΐνης RNF11 εντοπίζεται στο όψιμο ενδόσωμα, αλλά απουσιάζει από τα λυσοσωματικά διαμερίσματα. Παρόλο που η πρωτεΐνη RNF11 δεν βρέθηκε να συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη Rab11, δείκτη του ERC (Endocytic recycling compartment), σημαντική ποσότητα αυτής παρατηρήθηκε στα ενδοσώματα γρήγορης ανακύκλωσης προς την κυτταρική μεμβράνη (Rab4 δείκτης). Τα αποτελέσματα αυτά, είναι σε συμφωνία με μια πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά, όσον αφορά τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης RNF11¹⁶⁷ και αποδεικνύουν περαιτέρω ότι η πρωτεΐνη RNF11 εντοπίζεται και στο όψιμο ενδόσωμα.

Ταυτόχρονη υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 και SARA έδειξε ότι οι δυο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στο πρώιμο ενδόσωμα. Επιπρόσθετα, η μη σημασμένη φυσικού τύπου πρωτεΐνη RNF11 είναι ενδοσωματική και συνεντοπίζεται με την EEA1. Ωστόσο, η αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη SARA δεν ευθύνεται για την

ενδοσωματική της εντόπιση. Η αποσιώπηση του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου δεν επηρέασε την ενδοκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης RNF11. Επίσης, μεταλλάξεις που καταργούν το PY μοτίβο ή τη RING δομική περιοχή της πρωτεΐνης RNF11, δεν μεταβάλλουν την κυτταρική της διαμερισματοποίηση. Η σήμανση όμως στο αμινοτελικό άκρο είχε σαν αποτέλεσμα τη διάχυτα κυτταροπλασματική και πυρηνική της εντόπιση, ενώ η καρβοξυτελική σήμανση δεν επηρέασε τη στικτή της κατανομή. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούσαν υπέρ του συμπεράσματος ότι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης RNF11 είναι στόχος, μιας σημαντικής για την ενδοσωματική εντόπιση, τροποποίησης, η οποία εμποδίζεται από την σήμανση στο N-άκρο. Στο σημείο αυτό αξιοποιήσαμε την βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης RNF11, που προέβλεπε πως στο αμινοτελικό της άκρο υπάρχει μια αλληλουχία μυριστουΐλωσης. Μετάλλαξη της γλυκίνης στη θέση 2, της καρβοξυτελικά σημασμένης πρωτεΐνης RNF11, είχε σαν αποτέλεσμα την διάχυτα κυτταροπλασματική και πυρηνική της εντόπιση, αποδεικνύοντας πως πράγματι η τροποποίηση της μυριστουΐλωσης είναι υπεύθυνη για τον στικτό εντοπισμό της. Οι παραπάνω παρατηρήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα πρόσφατα ευρήματα των Santonico *et.al*, σύμφωνα με τα οποία η πρωτεΐνη RNF11, εκτός από μυριστουΐλωση, ενδεχομένως τροποποιείται και με παλμιτουΐλωση, σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 4¹⁶⁷. Μετάλλαξη της κυστεΐνης 4 σε αλανίνη, έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρωτεΐνης RNF11 στη συσκευή Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο¹⁶⁷.

Θα περίμενε κανείς ότι μια μυριστουΐλωμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στην περίπτωση της πρωτεΐνης RNF11. Υποθέσαμε λοιπόν, πως η πρωτεΐνη RNF11 πιθανόν ενδοκυτταρώνεται, αμέσως μετά τη στόχευση της στην κυτταρική μεμβράνη. Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης, με τη χρήση μιας μεταλλαγμένης-ανενεργής μορφής της Dynamin-I ή με αποσιώπηση του γονιδίου *DNM2* (Dynamin-II), είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρωτεΐνης RNF11 στην κυτταρική μεμβράνη, συμφωνώντας με την παραπάνω υπόθεση. Πράγματι τα 16 πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης RNF11, εκτός από την αλληλουχία μυριστουΐλωσης, φέρουν και ένα μοτίβο ενδοκυττάρωσης βασισμένο σε κατάλοιπα δι-λευκίνης (11-DDISLL-16)¹⁶⁷. Τα παραπάνω αποτελέσματα στο σύνολο τους δείχνουν ότι η πρωτεΐνη RNF11 αμέσως μετά τη σύνθεσή της φτάνει στην κυτταρική μεμβράνη, πιθανότατα μέσω της συνθετικής οδού

ή των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Σε αυτή τη διαδικασία, φαίνεται να είναι απαραίτητες τροποποιήσεις ακυλίωσης στο αμινοτελικό της άκρο. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του μοτίβου δι-λευκίνης, καθώς και αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες ή λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, η πρωτεΐνη RNF11 ενδοκυτταρώνεται και συσσωρεύεται στα κυστίδια του πρώιμου και όψιμου ενδοκυτταρικού μονοπατιού.

Χαρτογραφώντας τις περιοχές αλληλεπίδρασης των δυο πρωτεϊνών, διαπιστώσαμε ότι η περιοχή που μεσολαβεί την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης RNF11 με την πρωτεΐνη SARA, εκτείνεται από το 664-926 αα. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει και άλλες καλά χαρακτηρισμένες δομικές περιοχές, όπως τη SBD και τη PP1BM που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με τις SMAD2/3 και PP1, αντίστοιχα^{151 155}. Αναφορικά με τις δομικές περιοχές της πρωτεΐνης RNF11 που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τη SARA, φαίνεται ότι τόσο η περιοχή από το 59-95 αα, που περιλαμβάνει το υποτιθέμενο UIM, όσο και η RING δομική περιοχή της πρωτεΐνης RNF11 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο.

Από λειτουργική σκοπιά, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 προκαλεί σχεδόν εξαφάνιση των επιπέδων της ενδογενούς πρωτεΐνης SARA. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, αποσιώπηση του *RNF11* γονιδίου προκαλεί αύξηση των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης SARA, ωστόσο αφήνει ανεπηρέαστα τα επίπεδα της EEA1, μιας άλλης πρωτεΐνης του πρώιμου ενδοσώματος, ή των SMAD2/3, πρωτεϊνών με τις οποίες η SARA έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά και σχετίζεται λειτουργικά¹⁴⁸. Θέλοντας να διαλευκάνουμε το μηχανισμό αποικοδόμησης της πρωτεΐνης SARA από την πρωτεΐνη RNF11, χρησιμοποιήσαμε αναστολείς των δύο καλά μελετημένων μονοπατιών αποικοδόμησης του κυττάρου, του λυσοσώματος και του πρωτεασώματος. Η αναστολή του πρωτεασώματος με τη χρήση λακτακυστίνης δεν απέτρεψε την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA, η χορήγηση όμως χλωροκίνης, ενός αναστολέα των λυσοσωματικών ενζύμων, πλήρως ανέστειλε την αποικοδόμησή της. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα έπειτα από ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο πρωτεϊνών. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 προκαλεί τη λυσοσωματική και όχι την πρωτεασωματική αποικοδόμηση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης GFP-SARA. Επιπρόσθετα, η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA, δια μέσου των λυσοσωμάτων, επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ανοσοφθορισμού.

Ο ακριβής μηχανισμός της RNF11-διαμεσολαβούμενης αποικοδόμησης της πρωτεΐνης SARA δεν είναι σαφής. Τα πειράματα με τις μεταλλαγμένες μορφές της RNF11 έδειξαν ότι μόνο η περιοχή από το 59-95 αα συμμετέχει στην αποικοδόμηση της SARA, ενώ η RING δομική περιοχή φαίνεται να μη συνεισφέρει. Αξίζει να τονιστεί ότι οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές της RNF11 δεν συνδέονται φυσικά με την SARA (Εικ.3.10B και C). Φαίνεται λοιπόν ότι η αποικοδόμηση της SARA από τη RNF11 πρωτεΐνη δεν προϋποθέτει τη φυσική σύνδεση των δύο πρωτεϊνών. Το γεγονός πως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 δεν προκαλεί πρωτεασωμική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA, αποτελεί ένδειξη ότι η πρωτεΐνη RNF11 δεν προωθεί την K48 πολυουβικιτίνωσή της. Αν και το τελευταίο συμπέρασμα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, πιστεύουμε πως η σήμανση με ουβικιτίνη σε μία ή πολλαπλές λυσίνες της πρωτεΐνης SARA, ευθύνεται για την RNF11-διαμεσολαβούμενη λυσοσωματική της αποικοδόμηση. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν πως πράγματι η πρωτεΐνη SARA υφίσταται μονή ή πολλαπλή ουβικιτίνωση (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), κάτι που υποδηλώνει πως η πρωτεΐνη SARA θα μπορούσε να αποτελέσει φορτίο για λυσοσωματική αποικοδόμηση, αν και τα μέχρι τώρα γνωστά φορτία που αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο ESCRT είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς ¹¹. Ενδεχομένως, η πρωτεΐνη RNF11 σχετίζεται και με μηχανισμούς λυσοσωματικής αποικοδόμησης ανεξάρτητους από το σύμπλεγμα ESCRT ^{184 185 186}, οι οποίοι διαμεσολαβούνται από εναλλακτικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την ενδεχόμενη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών RNF11 και SARA με τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος και της συμμετοχής τους στις διαδικασίες διαλογής του ουβικιτινιωμένου υποδοχέα EGFR, η λυσοσωματική αποικοδόμηση του οποίου είναι καλά χαρακτηρισμένη. Πράγματι, η πρωτεΐνη RNF11 βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τα δύο καλά χαρακτηρισμένα μέλη του ESCRT-0, την HRS και την STAM2, καθώς και με την επικουρική πρωτεΐνη Eps15b. Η σύνδεση της πρωτεΐνης RNF11 με τις πρωτεΐνες HRS και STAM ενδεχομένως πραγματοποιείται μέσω του μοτίβου δι-λευκίνης της πρωτεΐνης RNF11 και των VHS δομικών περιοχών των πρωτεϊνών STAM και HRS. Το μοτίβο αυτό της πρωτεΐνης RNF11, έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με την VHS δομική περιοχή της πρωτεΐνης GGA1 ¹⁶⁷. Γενικά, είναι γνωστό ότι το μοτίβο δι-λευκίνης διαμεσολαβεί τη σύνδεση πρωτεϊνών που το φέρουν με τις πρωτεΐνες GGA, ωστόσο αυτό δεν αποτελεί κοινή αλληλουχία για πρόσδεση με τις VHS περιοχές ¹⁸⁷. Η

εξειδίκευση της πρόσδεσης φαίνεται να σχετίζεται, τόσο με την ακριβή αλληλουχία του μοτίβου, όσο και με παράπλευρες δομικές περιοχές ή αλληλουχίες. Σίγουρα, συμπληρωματικά πειράματα είναι απαραίτητα, προκειμένου να διαλευκανθεί, εάν όντως το μοτίβο δι-λευκίνης και η VHS περιοχές, είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση της RNF11 με τις HRS και STAM2. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη Eps15b, αλληλεπιδρά με την HRS και συμβάλει στη σωστή λειτουργία του ESCRT-0 συμπλέγματος ως μηχανής διαλογής του υποδοχέα EGFR¹¹⁶. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η RNF11 αλληλεπιδρά με την ενδοσωματική Eps15b και όχι με την Eps15, η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης RNF11 με τα μέλη του ESCRT-0, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η πρωτεΐνη RNF11 αποτελεί ένα ακόμη μέλος του παραπάνω συμπλέγματος.

Επειδή η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά στο πρώιμο ενδόσωμα και με την πρωτεΐνη SARA, θελήσαμε να διερευνήσουμε και την πιθανότητα αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης SARA με τα μέλη του ESCRT-0. Βιοχημικά πειράματα έδειξαν πως η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη STAM2, αλλά όχι με την πρωτεΐνη HRS. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη RNF11 κατάφερε την ταυτόχρονη ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών SARA, STAM2 και Eps15b, υποδεικνύοντας τη δυνητική ύπαρξη ενός συμπλέγματος μεταξύ των παραπάνω πρωτεϊνών. Το γεγονός ότι, δεν ανιχνεύσαμε αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HRS και SARA, υποδηλώνει πως οι δύο πρωτεΐνες δεν βρίσκονται στο ίδιο σύμπλεγμα. Ωστόσο, η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες SARA, STAM2 και Eps15b^{173 168} και με δεδομένο ότι η SARA αλληλεπιδρά άμεσα με την RNF11¹⁷³ και πιθανά με την πρωτεΐνη STAM2, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι RNF11/SARA/STAM/Eps15b συγκροτούν ένα εναλλακτικό ESCRT-0 σύμπλεγμα, το οποίο δεν περιλαμβάνει την HRS. Η κατοχύρωση της παραπάνω υπόθεσης απαιτεί περαιτέρω πειράματα καθαρισμού και απομόνωσης των συμπλεγμάτων. Όπως έχει προαναφερθεί, το ESCRT-0 είναι το λιγότερο συντηρημένο από τα υπόλοιπα ESCRT και το σενάριο εναλλακτικών ESCRT-0 συμπλεγμάτων είναι πολύ πιθανό. Υποθέσεις θέλουν τις πρωτεΐνες GGA ως πιθανούς υποψήφιους σε αυτό το εναλλακτικό σενάριο¹¹. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά άμεσα με τις

πρωτεΐνες GGA ¹⁶⁷, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα συμμετοχής των πρωτεϊνών SARA/RNF11 στο σχηματισμό ενός ESCRT-0-ανεξάρτητου συμπλέγματος.

Όπως αναφέραμε εκτενώς στην εισαγωγή, η συναρμολόγηση των ESCRT συμπλεγμάτων πραγματοποιείται σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης του ενδοσώματος, οι οποίες καλύπτονται από την πρωτεΐνη κλαθρίνη ¹⁰⁹. Η πρωτεΐνη κλαθρίνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HRS, μέσω ενός συντηρημένου μοτίβου πρόσδεσης (CB, Clathrin Box), αυξάνοντας τη συγκέντρωση των μορίων της HRS τοπικά ¹⁰⁹. Βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης SARA (ELM), προτείνει την ύπαρξη ενός μοτίβου αλληλεπίδρασης με την κλαθρίνη LLYMD (637-641 αα), το οποίο βρίσκεται μέσα στην FYVE δομική περιοχή. Προκαταρκτικά πειράματα ανοσοκαταβύθισης έδειξαν πως πράγματι η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη κλαθρίνη. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπόθεση πως, η πρωτεΐνη SARA μπορεί να σχηματίζει ένα εναλλακτικό ESCRT-0 σύμπλεγμα και η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη κλαθρίνη ενδεχομένως συντονίζει, όπως και στην περίπτωση της HRS, τη συναρμογή του στη μεμβράνη του πρώιμου ενδοσώματος.

Η πρωτεΐνη HRS, αλληλεπιδρά και με την UEV δομική περιοχή της πρωτεΐνης TSG101, μέσω ενός συντηρημένου P(S/T)XP μοτίβου ^{188 107}. Με τον τρόπο αυτό πιστεύεται πως το σύμπλεγμα ESCRT-0 προσελκύει το ESCRT-I στο πρώιμο ενδόσωμα. Η πρωτεΐνη SARA διαθέτει μια PTPP (947-950 αα) αλληλουχία, συμβατή με το P(S/T)XP μοτίβο και ενδεχομένως αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TSG101, προσελκύνοντας το ESCRT-I στο ενδόσωμα. Σε αυτή την περίπτωση, η SARA θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένα πλήρως λειτουργικό εναλλακτικό ESCRT-0 σύμπλεγμα. Η επιβεβαίωση του παραπάνω σεναρίου, απαιτεί περαιτέρω ερευνητική μελέτη.

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας EGFR αποτελεί ένα τυπικό ουβικιτινωμένο φορτίο που αναγνωρίζεται από το ESCRT σύμπλεγμα και υφίσταται λυσοσωματική αποικοδόμηση. Η πρωτεΐνη HRS διαμεσολαβεί την αρχική διαλογή του φορτίου και υπερέκφραση ή εξάλειψη των επιπέδων της, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR ¹¹⁴. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της υπερέκφρασης ή της εξάλειψης της βοηθητικής Eps15b ¹¹⁶. Παρόμοιο είναι και το πρότυπο αποικοδόμησης του υποδοχέα EGFR, μετά από εξάλειψη ή υπερέκφραση των πρωτεϊνών RNF11 και SARA. Και στις δυο περιπτώσεις των πρωτεϊνών αυτών,

παρατηρήθηκε μείωση της αποικοδόμησης του υποδοχέα EGFR. Το γεγονός ότι η υπερέκφραση και η αποσιώπηση προκαλούν το ίδιο αποτέλεσμα, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που αποτελούν τα ικρίωματα (scaffolds), πάνω στα οποία συναρμολογούνται πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Εάν τα ικρίωματα είναι σημαντικά σε μια διαδικασία, τότε μείωση των επιπέδων τους οδηγεί σε μη αποδοτική δημιουργία του συμπλέγματος. Η υψηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών-ικριωμάτων έχει το ίδιο αποτέλεσμα, διότι μόρια που συναρμολογούνται και ενεργοποιούνται σε σειρά έχουν μειωμένη πιθανότητα να δεσμευτούν στο ίδιο ικρίωμα^{189 190}. Η μείωση της κινητικής της αποικοδόμησης του EGFR υποδοχέα, η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση ή την εξάλειψη των πρωτεϊνών SARA και RNF11, αποτελεί ένδειξη ότι οι δύο πρωτεΐνες συμμετέχουν ενεργά στη λειτουργία του ESCRT συμπλέγματος. Το γεγονός ότι η απορύθμιση των επιπέδων τους παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο συμπεριφοράς με τα χαρακτηρισμένα μέλη του συμπλέγματος ESCRT-0, ενισχύει περαιτέρω την παραπάνω παρατήρηση.

Επιπρόσθετα, η εξάλειψη των πρωτεϊνών HRS και Eps15b αυξάνει την ανακύκλωση του EGF αυξητικού παράγοντα^{183 116}, διότι το σύμπλεγμα ESCRT-0 δεν μπορεί να αναγνωρίσει το φορτίο που φέρει ουβικιτίνες, αποτρέποντας την ανακύκλωσή του προς την κυτταρική μεμβράνη. Στην περίπτωση αποσιώπησης του γονιδίου *HGS* (HRS), η αυξημένη ανακύκλωση του υποδοχέα ενοχοποιείται και για την παρατεταμένη φωσφορυλίωση των ERK1/2, μετά από επαγωγή με EGF. Παρομοίως, σε κύτταρα με μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης TSG101, παρατηρείται μειωμένη αποικοδόμηση του EGFR, αυξημένη ανακύκλωσή του προς την μεμβράνη και ενίσχυση της ενεργοποίησης των ERK1/2¹⁹¹. Η αποσιώπηση του *RNF11* γονιδίου προκαλεί αύξηση της ανακύκλωσης του Rh-EGF προς την κυτταρική μεμβράνη, όπως συμβαίνει και με την εξάλειψη των γονιδίων *HGS* (HRS), *Eps15b* και *TSG101*. Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη RNF11, μέσω των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά ή μέσω της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης AMSH, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύλληψη και στη συσσώρευση του φορτίου προς αποικοδόμηση. Όπως και στις περιπτώσεις των HRS και TSG101¹⁸², εξάλειψη της RNF11 οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών ERK1/2.

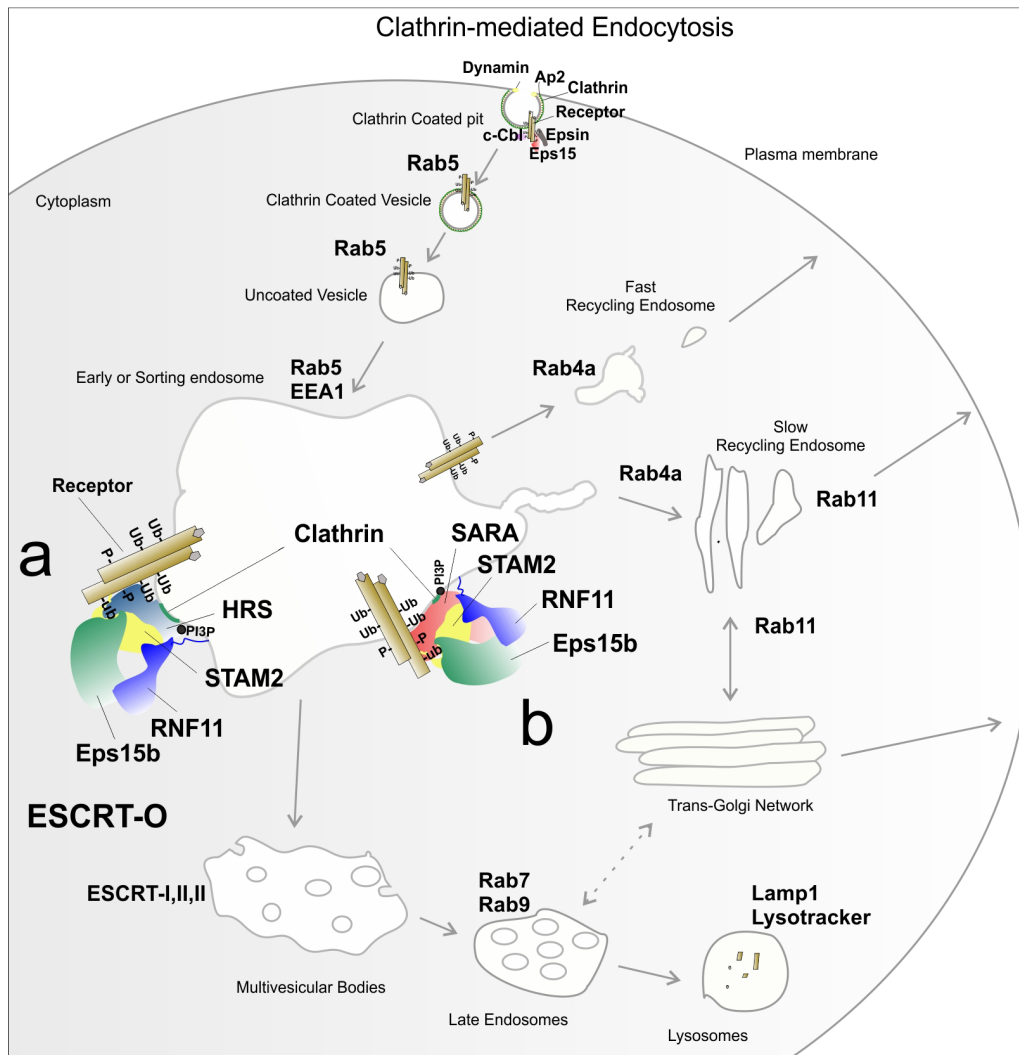
Μπορούμε να κάνουμε πολλές υποθέσεις για τον τρόπο δράσης της πρωτεΐνης RNF11, ως πιθανού μέλους του συμπλέγματος ESCRT-0. Η AMSH είναι μια DUB που

αλληλεπιδρά με τα μέλη του ESCRT-0 και ενδεχομένως αφαιρεί τις ουβικιτίνες από το φορτίο, επιτρέποντας την ανακύκλωσή του. Μειώνοντας τα επίπεδα της πρωτεΐνης AMSH, η πρωτεΐνη RNF11 θα μπορούσε να εξασφαλίσει την αποικοδόμηση του φορτίου που φέρει ουβικιτίνες. Επιπλέον, η πρωτεΐνη RNF11 αλληλεπιδρά με πλήθος E3-λιγασών ουβικιτίνης και E2-ενζύμων σύζευξης¹⁷¹. Επιπρόσθετα η RNF11, μέσω της RING δομικής περιοχής, ενδεχομένως φέρει εγγενή δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης⁵². Η πρωτεΐνη RNF11 θα μπορούσε δυνητικά να μεταβάλει την κατάσταση ουβικιτινίωσης των υποδοχέων ή των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του EGFR. Πράγματι οι HRS και STAM υφίστανται μονοουβικιτινίωση και μάλιστα η τροποποίηση αυτή θεωρείται πως σχετίζεται με τη λειτουργικότητα των παραπάνω πρωτεϊνών¹⁴⁶. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη RNF11 πιθανόν φέρει ένα UIM μοτίβο (αα 59-95). Στην περίπτωση που αυτό αληθεύει, η πρωτεΐνη RNF11 θα μπορούσε να συνεισφέρει λειτουργικά, μαζί με τις HRS και STAM2, στην αρχική σύλληψη του ουβικιτινωμένου φορτίου. Ωστόσο, το γεγονός ότι η RNF11-GFP Δ59-95, δε συμμετέχει στην αποικοδόμηση του EGFR, μάλλον καθιστά απίθανη αυτήν την εκδοχή. Από την άλλη, η RING δομική περιοχή της πρωτεΐνης RNF11 φαίνεται να παίζει ενεργό ρόλο στην αποικοδόμηση του EGFR υποδοχέα, οπότε οι παραπάνω εναλλακτικές υποθέσεις είναι πιο πιθανές.

Η αποσιώπηση του *zFYVE9* (SARA) γονιδίου, όμως, δεν προκαλεί αύξηση της ανακύκλωσης του Rh-EGF, κάτι που σημαίνει πως ο μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης SARA διαφέρει από εκείνον των πρωτεϊνών HRS και TSG101. Το συνδιασμό μειωμένης αποικοδόμησης χωρίς αύξηση της ανακύκλωσης προκαλεί και η εξάλειψη των Vps22/EAP30 και Vps24/CHMP3, συστατικών των ESCRT-II και ESCRT-III, αντίστοιχα¹⁸³¹³³. Στην περίπτωση των Vps22 και Vps24, το φορτίο φαίνεται να αιχμαλωτίζεται μη-αναστρέψιμα σε κάποιο σημείο του αποικοδομητικού μονοπατιού, οπότε αποφεύγεται η ανακύκλωσή του προς την κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο η αποικοδόμησή του φορτίου είναι μειωμένη, διότι παρεμποδίζεται η διέλευση του 'φορτίου' στα μεταγενέστερα στάδια του αποικοδομητικού μονοπατιού. Όμως, η εξάλειψη των Vps22/EAP30 και Vps24/CHMP3 δεν επιφέρει καμία αλλαγή στη μεταγωγή του σήματος (φωσφορυλίωση των ERK1/2) από το σύμπλεγμα EGF/EGFR¹⁸³¹³³. Σε αντίθεση, η εξάλειψη της πρωτεΐνης SARA προκαλεί παρατεταμένη EGF-επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2. Φαίνεται

λοιπόν πως η λειτουργία της πρωτεΐνης SARA στην αποικοδόμηση του EGFR είναι αρκετά πολύπλοκη. Επειδή η εξάλειψη της HRS (ESCRT-0) και της TSG101 (ESCRT-I) αυξάνει την ενεργοποίηση των ERK1/2^{182 133 191}, ενώ η εξάλειψη της Vps22/EAP30 (ESCRT-II) και της Vps24/CHMP3 (ESCRT-III) δεν επιφέρει αλλαγές σε αυτές, φαίνεται ότι η λήξη της μεταγωγής σήματος από τον EGF συμβαίνει λίγο πριν τη προσέλκυση του συμπλέγματος ESCRT-II. Ενδεχομένως, η εξάλειψη της πρωτεΐνης SARA παγιδεύει τον υποδοχέα σε κάποιο σημείο λίγο μετά το στάδιο προσέλκυσης του ESCRT-I, σημείο που δεν αφήνει τον υποδοχέα να ανακυκλωθεί αλλά επιτρέπει τη μεταγωγή του σήματος. Ακολουθώντας τον Rh-EGF, αμέσως μετά την ενδοκυττάρωσή του, παρατηρήσαμε πως ο συνεντοπισμός του με την EEA1 είναι αυξημένος. Είναι εμφανές ότι η μειωμένη αποικοδόμηση σε συνδυασμό με την αυξημένη παραμονή του EGF στο πρώιμο ενδόσωμα, ευθύνονται για την αύξηση της ενεργοποίησης των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, ERK1/2.

Σίγουρα, όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις χρειάζονται περαιτέρω μελέτη. Η αλήθεια είναι πως ο διαδοχικός τρόπος δράσης των ESCRT συμπλεγμάτων δεν είναι απόλυτα τεκμηριωμένος και η κατάσταση περιπλέκεται ακόμη περισσότερο, εάν σκεφτούμε πως οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολλούς εναλλακτικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς για τις διάφορες βιολογικές τους διαδικασίες. Η διαλεύκανση των μηχανισμών λειτουργίας των ESCRT συμπλεγμάτων αποτελεί μια πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα. Η παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζει βιοχημικά και λειτουργικά δεδομένα που i) αποκαλύπτουν για πρώτη φορά την ενεργή συμμετοχή των RNF11/SARA στη λειτουργία του συμπλέγματος ESCRT-0 στο αποικοδομητικό μονοπάτι και ii) στηρίζουν πειστικά την δυνατότητα η φέρουσα FYVE περιοχή πρωτεΐνη SARA, με την συμμετοχή της πρωτεΐνης RNF11, να συναρμολογεί ένα εναλλακτικό ως προς το κλασικό ESCRT-0 σύμπλεγμα, που βασίζεται στην επίσης φέρουσα FYVE περιοχή πρωτεΐνη HRS (Εικ.4.1).



Εικόνα 4.1 Υποθετικό μοντέλο συμμετοχής των RNF11 και SARA στο σύμπλεγμα ESCRT-0. Το ESCRT-0, το οποίο αποτελείται από τις HRS, STAM2 και Eps15b φαίνεται να περιέχει και την πρωτεΐνη RNF11 (α). Ωστόσο, οι πρωτεΐνες RNF11 και SARA φαίνεται να σχηματίζουν ένα εναλλακτικό σύμπλεγμα με τις STAM2 και Eps15b στο οποίο δεν περιλαμβάνεται η πρωτεΐνη HRS (β).

Η μειωμένη αποικοδόμηση υποδοχών αυξητικών παραγόντων όπως ο EGFR, είναι συχνό φαινόμενο σε περιπτώσεις καρκίνων³. Η πρωτεΐνη RNF11 υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις καρκίνων (καρκίνος του μαστού)¹⁶⁵ και όπως αποδείξαμε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 μειώνει την αποικοδόμηση του EGFR. Το γεγονός αυτό μπορεί να παρατείνει τη μετάδοση σημάτων που προωθούν την καρκινογένεση και τη μετάσταση των όγκων από μη-μεταλλαγμένους EGFR υποδοχείς ή να επιτείνει την δραστικότητα των μεταλλαγμένων. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RNF11 προκαλεί αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA, γεγονός που μπορεί να επιτείνει την ελαττωματική αποικοδόμηση των

EGFR υποδοχέων μέσω αναστολής του εναλλακτικού ESCRT-0 συμπλέγματος. Επιπλέον, η μείωση των επιπέδων της SARA καταστέλλει την αντιμιτωτική δράση του TGFβ, η οποία είναι σημαντική στα αρχικά στάδια της επαγωγής της καρκινογένεσης. Σε πολλούς καρκίνους η καταστολή αυτή επιτυγχάνεται με μεταλλάξεις των SMAD πρωτεϊνών¹⁹². Είναι πιθανό η υπερέκφραση του RNF11, μέσω της αποικοδόμησης της SARA, να έχει το ίδιο αποτέλεσμα αναφορικά με την δραστικότητα του TGFβ. Ο ρόλος των RNF11 και SARA πρωτεϊνών στην καρκινογένεση χρήζει παραπέρα μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών έχει επικεντρωθεί στη διαλεύκανση των μηχανισμών μετάδοσης μηνυμάτων από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και στη σχέση τους με την ενδοκυττάρωση και την κυστιδιακή μεταφορά. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς (φορτίο) εισέρχονται στο κύτταρο με διάφορους τρόπους, με πιο γνωστή την κλαθρινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση (CDE). Το φορτίο, μετά την είσοδό του μέσα στο κύτταρο φτάνει στο πρώιμο ενδόσωμα και από εκεί, είτε επιστρέφει στη μεμβράνη, μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης, είτε αποικοδομείται μέσω των πολυκυστιδιακών σωματιδίων (MVB) και των λυσοσωμάτων. Στην τελευταία διαδικασία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο πρωτεϊνικά συμπλέγματα, γνωστά ως ESCRT (Endosomal sorting required for transport). Το πρώτο από αυτά, το ESCRT-0, αποτελείται από τις HRS, STAM2 και την επικουρική Eps15b και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των ουβικιτινωμένων υποδοχέων και τη μετέπειτα παράδοση τους στα ESCRT-I, -II και -III. Στη συνέχεια οι υποδοχείς ενσωματώνονται στη μεμβράνη ενδοαυλικών κυστιδίων (ILV) των MVB και τελικά παραδίδονται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση.

Η SARA είναι μια πρωτεΐνη με FYVE περιοχή, που εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα και φαίνεται να συμμετέχει τόσο στη κυστιδιακή διακίνηση, όσο και στη μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της οικογένειας του TGFβ. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου στο οποίο εκπονήθηκε η διατριβή, ανίχνευσαν την πρωτεΐνη RNF11 να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SARA. Η πρωτεΐνη RNF11 είναι μια RING-H2 λιγάση, η οποία διαθέτει ένα PY μοτίβο και μια RING δομική περιοχή και έχει αναφερθεί να συμμετέχει σε διαδικασίες πρωτεϊνικής ουβικιτίνωσης και μεταγωγής σήματος.

Στην παρούσα μελέτη αποδείξαμε με βιοχημικές μεθόδους πως οι πρωτεΐνες RNF11 και SARA αλληλεπιδρούν. Μελέτες που αφορούν την κυτταρική διαμερισματοποίηση της πρωτεΐνης RNF11, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη RNF11 εντοπίζεται στο πρώιμο, στο όψιμο και στο γρήγορης ανακύκλωσης ενδόσωμα. Οι πρωτεΐνες RNF11 και SARA συνεντοπίζονται στο πρώιμο ενδόσωμα, ωστόσο η SARA δεν ευθύνεται για την ενδοσωματική στόχευση της RNF11. Για την διαμερισματοποίηση της πρωτεΐνης RNF11 στο πρώιμο ενδόσωμα

είναι σημαντικές τροποποιήσεις ακυλιώσεων στο αμινοτελικό της άκρο και η γρήγορη ενδοκυττάρωσή της από την κυτταρική μεμβράνη.

Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, έδειξε ότι είναι απαραίτητα, τόσο τα αα από το 59-95, όσο και η RING δομική περιοχή της πρωτεΐνης RNF11. Από λειτουργική σκοπιά, η πρωτεΐνη RNF11 προκαλεί τη λυσοσωματική και όχι την πρωτεασωματική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SARA.

Επιπρόσθετα οι πρωτεΐνες RNF11 και SARA βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος. Πράγματι, η RNF11 αλληλεπιδρά με τις HRS, STAM και Eps15b, παρατήρηση που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η πρωτεΐνη RNF11 είναι ένα ακόμη μέλος του ESCRT-0. Επιπρόσθετα, η RNF11 συν-κατακρημνίζει ταυτόχρονα τις STAM2, SARA και Eps15b. Η παραπάνω παρατήρηση σε συνδυασμό το ότι η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την STAM2 αλλά όχι με την HRS, μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως, ενδεχομένως, σχηματίζεται ένα εναλλακτικό ESCRT-0 σύμπλεγμα ανάμεσα στις SARA/RNF11/STAM2/Eps15b, στο οποίο δεν εμπεριέχεται η HRS. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι η SARA βρέθηκε να αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη κλαθρίνη.

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας EGFR αποτελεί ένα τυπικό ουβικιτινωμένο φορτίο που αναγνωρίζεται από το ESCRT σύμπλεγμα και υφίσταται λυσοσωματική αποικοδόμηση. Σε συμφωνία με την υπερέκφραση ή την εξάλειψη των επιπέδων των πρωτεϊνών HRS και Eps15b, η απορύθμιση των επιπέδων των πρωτεϊνών RNF11 και SARA έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη αποικοδόμηση του υποδοχέα EGFR. Στην περίπτωση της εξάλειψης της πρωτεΐνης RNF11 παρατηρείται και αυξημένη ανακύκλωση του EGF προς την μεμβράνη, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στην περίπτωση της εξάλειψης της πρωτεΐνης SARA. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει πως οι πρωτεΐνες RNF11 και SARA αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με τα μέλη του ESCRT-0 συμπλέγματος και συμμετέχουν, ενεργά, στη διαδικασία διαλογής του υποδοχέα EGFR για αποικοδόμηση.

SUMMARY

Enormous progress has been made in our understanding on how different families of growth factors (GFs) transduce signals from their receptors in plasma membrane to the nucleus. The accumulated knowledge suggested that spatio-temporal regulation of signaling components plays an important role in the signaling outcome. Indeed, every signaling receptor undergoes internalization by one of at least five different entry routes of endocytosis, clathrin-mediated endocytosis being the most known. Cargo, entering via these alternative routes, is transported to a series of intracellular compartments from where it is either recycled to the cell surface via recycling endosomes or directed to degradative compartments (late endosomes and lysosomes). Selective trafficking of membrane proteins to lysosomes requires the ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) machinery. The first component of this machinery, ESCRT-0, consists of Hrs, STAM and Eps15b, three proteins with ubiquitin-binding domains that recognize ubiquitinated cargos destined for lysosomal degradation thereby preventing their recycling and retrograde trafficking.

SARA is a FYVE domain-containing protein that resides mainly on early endosomes and appears to regulate directly both signaling and trafficking in the endocytic compartment. Previous studies of our laboratory have identified SARA-interacting proteins. Among them, we found RNF11, a modular 154aa-containing Ring-H2 E3 ligase, harboring a PY motif and a RING-H2 domain. RNF11 interacts with ubiquitin E3 ligases and numerous other proteins exerting functions in signal transduction and protein ubiquitination.

In the present study, we have biochemically validated the interaction between RNF11 and SARA. In support, we found that RNF11 exhibited considerable colocalization with SARA on early endosomes, residing on the membranes of the endocytic compartment, mostly in early and late endosomes, but also in the fast recycling compartment. The association of RNF11 with SARA was not responsible for the endocytic localization of RNF11. However, N-myristoylation and rapid endocytosis contribute to the accumulation of RNF11 in early endosomes.

SUMMARY

Mapping of the interaction domains revealed that the aa from 59-95 and the RING-H2 domain, are important for the RNF11 interaction with SARA. In functional terms, the RNF11 decreased SARA protein levels, predominantly by lysosomal and not proteosomal degradation.

Moreover, the SARA/RNF11 complex is associated with the ESCRT-0 core proteins, participating in sorting of EGFR for degradation. Indeed, RNF11 interacted with HRS, STAM2 and Eps15b, strongly indicating that the well-characterized ESCRT-0 complex, comprising Hrs and STAM2, might include also RNF11. However, we were not able to detect any co-immunoprecipitation of SARA with Hrs, a result suggesting that the two FYVE domain proteins, Hrs and SARA, do not exist in the same complex. The fact that, SARA co-immunoprecipitated with STAM2 and over-expressed SARA, STAM2 and Eps15b were all co-immunoprecipitated by RNF11 from the same cell lysate suggested that an alternative assembly could exist, consisting of SARA, STAM2, Eps15b and RNF11. The last scenario is further supported by the observation that clathrin and SARA interact with pull down assay.

Overexpression and depletion of either SARA or RNF11 delayed degradation of EGF-activated EGFR, exhibiting a bell-shaped behavior characteristic for the known ESCRT-0 components, Hrs and Eps15b. Moreover depletion of RNF11 enhanced EGF recycling, whereas depletion of SARA did not. Both of them however, increased the duration of the EGF-mediated phosphorylation of ERK.

To summarize, SARA and RNF11 interact with each other and with the ESCRT-0 core proteins participating in lysosomal trafficking and degradation of cargos such as the EGFR. These results define a novel and unexpected function for SARA and RNF11 in MVE function.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A

AMSH: Associated molecule with the SH3 domain of STAM

AP2: Adaptor protein-2

APP: Amyloid precursor protein

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

B

BAR domain: Bin, amphiphysin, Rvs domain

BHK: Baby hamster kidney

BSA: Bovine serum albumin

C

Cbl: Casitas B-lineage lymphoma

CB: Clathrin-binding motif

CCP: Clathrin-coated pit

CCV: Clathrin-coated vesicle

CIN85: Cbl-interacting protein of 85 kDa

CDE: Clathrin-dependent endocytosis

CIE: Clathrin-independent endocytosis

CLIC: Clathrin and Dynamin Independent carriers

Cpm: Counts per minute

CUE: Cuel-homologous

D

Dab2: Disabled homolog 2

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

Dpp: Decapentaplegic

DUB: De-ubiquitinating enzymes

E

ECGS: Endothelial cell growth supplement

EEA1: Early endosome antigen-1

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

EHD: Eps15 homology domain

ENDOFIN: Endosome-associated FYVE-domain protein

ENTH domain: Epsin-N-terminal-homology domain

Eps15: EGFR-pathway substrate 15

ERC: Endocytic recycling compartment

ESCRT: Endosomal sorting required for transport

F

FCS: Fetal calf serum

FYVE: Fab1, YOTB, Vac1, EEA1

G

GAP: GTPase-activating proteins

GEF: Guanine nucleotide exchange factors

GEEC: Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal

Compartments

GGA: Golgi-associated γ -ear-containing ARF binding protein

GLUE: GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45

GPCR: G protein-coupled receptors

GPI: Glycosyl phosphatidylinositol

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GST: Glutathione S-transferase

H

HA: Human influenza hemagglutinin

HEK: Human embryonic kidney

HRS: Hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine kinase substrate

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells

I

IB: Immunoblot

ILV: Intraluminal vesicles

IP: Immunoprecipitation

J

K**L**

Lamp: Lysosomal associated membrane protein

LBPA: Lisobiphosphatidic acid

LDL: Low density lipoprotein

LDLR: Low density lipoprotein receptor

M

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

M6PR: Mannose 6-phosphate receptor

Mdm: Murine double minute

MVB: Multivesicular body

MVE: Multivesicular endosome

N

NGF: Nerve growth factor

O

OS: outer segment

P

PBS: Phosphate buffer saline

PBS: Predicted biological score

PH domain: Pleckstrin-homology domain

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PP1BM: Protein phosphatase binding motif

PTB: Phosphotyrosine-binding domains

PX domain: Phox-homology domain

Q

qRT-PCR: quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction,

R

Rab: Ras-associated binding

RNF11: Ring finger protein 11

RING: Really interesting new gene

rpm: rotation per minute

RTK: Receptor tyrosine kinase

S

SARA: SMAD anchor for receptor activation

SH2: Src homology 2

SBD: SMAD binding domain

SNAREs: Soluble N-ethylmaleide-sensitive factor attachment protein receptors

SNX: Sorting nexin

STAM: Signal transduction adapter molecule

SV40: Simian virus 40

T

TGF β : Transforming growth factor β

TGN: trans-Golgi network

Tkv: Thickvein

TNF: Tumor necrosis factor

TSG101: Tumour-susceptibility gene-101

U

UBA: Ubiquitin associated

UEV: Ubiquitin E2 variant

UIM: Ubiquitin interacting motif

V

VHS: Vps27, HRS and STAM

Vps: Vacuolar protein sorting

w

X

Y

Z

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal*. Dec 2006;18(12):2089-2097.
2. Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. Jan 17 2006;366(1):2-16.
3. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jul 2006;7(7):505-516.
4. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. Feb 24 2006;124(4):729-740.
5. Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res*. Mar;20(3):256-275.
6. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Aug 2007;8(8):603-612.
7. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. Mar 6 2003;422(6927):37-44.
8. Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol*. Aug 2005;17(4):423-434.
9. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857-902.
10. Miaczynska M, Zerial M. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res*. Jan 1 2002;272(1):8-14.
11. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. Mar 26 2009;458(7237):445-452.
12. Williams RL, Urbe S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. May 2007;8(5):355-368.
13. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Feb 2004;5(2):121-132.
14. Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*. Aug 2001;13(4):485-492.
15. Sasaki T, Sasaki J, Sakai T, Takasuga S, Suzuki A. The physiology of phosphoinositides. *Biol Pharm Bull*. Sep 2007;30(9):1599-1604.
16. Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Feb 2005;6(2):112-126.
17. Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol*. Dec 17-31 1998;8(25):1399-1402.
18. Zwang Y, Yarden Y. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*. Apr 2009;10(4):349-363.
19. Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, et al. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J*. Sep 1 2000;19(17):4577-4588.
20. Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, et al. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol*. Jan 14 1999;9(1):55-58.

21. Gillooly DJ, Simonsen A, Stenmark H. Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J.* Apr 15 2001;355(Pt 2):249-258.
22. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb 2001;2(2):107-117.
23. Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 8 2006;103(32):11821-11827.
24. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Aug 2009;10(8):513-525.
25. Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell.* Jul 27 1990;62(2):317-329.
26. Rubino M, Miaczynska M, Lippe R, Zerial M. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem.* Feb 11 2000;275(6):3745-3748.
27. Vanlandingham PA, Ceresa BP. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem.* May 1 2009;284(18):12110-12124.
28. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci.* Nov 15 2007;120(Pt 22):3905-3910.
29. Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol.* May 15 2000;149(4):901-914.
30. Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res.* Oct 15 2008;314(17):3093-3106.
31. Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, Gill GN, Sorkin A. Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *Embo J.* May 4 1999;18(9):2489-2499.
32. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol.* Sep 1 2003;162(5):909-918.
33. Huang F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem.* Apr 16 2004;279(16):16657-16661.
34. Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell.* Mar 2003;14(3):858-870.
35. Marmor MD, Yarden Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene.* Mar 15 2004;23(11):2057-2070.
36. Madhus IH, Stang E. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci.* Oct 1 2009;122(Pt 19):3433-3439.
37. Sorkin A, Carpenter G. Dimerization of internalized epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem.* Dec 5 1991;266(34):23453-23460.
38. Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* Aug 6 1999;274(32):22151-22154.

39. de Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H, Borst J. c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci.* Jun 2001;114(Pt 11):2167-2178.
40. Huang F, Goh LK, Sorkin A. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 23 2007;104(43):16904-16909.
41. Stang E, Blystad FD, Kazazic M, et al. Cbl-dependent ubiquitination is required for progression of EGF receptors into clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell.* Aug 2004;15(8):3591-3604.
42. Thien CB, Walker F, Langdon WY. RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell.* Feb 2001;7(2):355-365.
43. van Bergen En Henegouwen PM. Eps15: a multifunctional adaptor protein regulating intracellular trafficking. *Cell Commun Signal.* 2009;7:24.
44. Ford MG, Mills IG, Peter BJ, et al. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* Sep 26 2002;419(6905):361-366.
45. Pandey KN. Small peptide recognition sequence for intracellular sorting. *Curr Opin Biotechnol.* Oct;21(5):611-620.
46. Davis CG, Lehrman MA, Russell DW, Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell.* Apr 11 1986;45(1):15-24.
47. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:395-447.
48. Pandey KN. Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Front Biosci.* 2009;14:5339-5360.
49. Hofmann MW, Honing S, Rodionov D, Dobberstein B, von Figura K, Bakke O. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem.* Dec 17 1999;274(51):36153-36158.
50. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J.* Oct 5 2005;24(19):3353-3359.
51. Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar 2001;2(3):195-201.
52. Di Fiore PP, Polo S, Hofmann K. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jun 2003;4(6):491-497.
53. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* Jan 12 2007;315(5809):201-205.
54. Acconcia F, Sigismund S, Polo S. Ubiquitin in trafficking: The network at work. *Exp Cell Res.* Oct 28 2008.
55. Hurley JH, Lee S, Prag G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J.* Nov 1 2006;399(3):361-372.
56. Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol.* Apr 1989;108(4):1301-1316.
57. Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oct 2001;2(10):721-730.

58. Falguieres T, Luyet PP, Gruenberg J. Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp Cell Res.* May 15 2009;315(9):1567-1573.
59. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:575-625.
60. Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol.* Mar 1996;132(6):1011-1023.
61. Sadowski L, Pilecka I, Miaczynska M. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp Cell Res.* May 15 2009;315(9):1601-1609.
62. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* Jan 2010;25(1):99-112.
63. Bucci C, Parton RG, Mather IH, et al. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell.* Sep 4 1992;70(5):715-728.
64. Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol.* Aug 1999;1(4):249-252.
65. Gorvel JP, Chavier P, Zerial M, Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* Mar 8 1991;64(5):915-925.
66. Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol.* Oct 1999;1(6):376-382.
67. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, et al. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell.* Feb 6 2004;116(3):445-456.
68. Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, et al. The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell.* May 2 2008;133(3):486-497.
69. Benmerah A. Endocytosis: signaling from endocytic membranes to the nucleus. *Curr Biol.* Apr 20 2004;14(8):R314-316.
70. Stenmark H, Vitale G, Ullrich O, Zerial M. Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell.* Nov 3 1995;83(3):423-432.
71. Christoforidis S, Zerial M. Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods.* Apr 2000;20(4):403-410.
72. Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem.* Sep 27 1996;271(39):24048-24054.
73. Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, et al. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol.* Oct 30 2000;151(3):601-612.
74. Cozier GE, Carlton J, McGregor AH, et al. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem.* Dec 13 2002;277(50):48730-48736.
75. Panopoulou E, Gillooly DJ, Wrana JL, et al. Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* May 17 2002;277(20):18046-18052.

76. Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, et al. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci.* Jun 2001;114(Pt 12):2255-2263.
77. Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature.* Jul 30 1998;394(6692):494-498.
78. Bennett MK. SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr Opin Cell Biol.* Aug 1995;7(4):581-586.
79. Simonsen A, Gaullier JM, D'Arrigo A, Stenmark H. The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem.* Oct 8 1999;274(41):28857-28860.
80. McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell.* Aug 6 1999;98(3):377-386.
81. de Renzis S, Sonnichsen B, Zerial M. Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat Cell Biol.* Feb 2002;4(2):124-133.
82. Naslavsky N, Boehm M, Backlund PS, Jr., Caplan S. Rabenosyn-5 and EHD1 interact and sequentially regulate protein recycling to the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* May 2004;15(5):2410-2422.
83. van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell.* Sep 4 1992;70(5):729-740.
84. Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol.* Apr 5 1999;145(1):123-139.
85. Vollenweider P, Martin SS, Haruta T, et al. The small guanosine triphosphate-binding protein Rab4 is involved in insulin-induced GLUT4 translocation and actin filament rearrangement in 3T3-L1 cells. *Endocrinology.* Nov 1997;138(11):4941-4949.
86. Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* Aug 2004;16(4):400-406.
87. Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Aug 2002;3(8):600-614.
88. Gonzalez-Gaitan M. Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar 2003;4(3):213-224.
89. von Zastrow M, Sorkin A. Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol.* Aug 2007;19(4):436-445.
90. Hoeller D, Volarevic S, Dikic I. Compartmentalization of growth factor receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol.* Apr 2005;17(2):107-111.
91. Di Fiore PP, De Camilli P. Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell.* Jul 13 2001;106(1):1-4.
92. Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *Embo J.* Sep 15 1994;13(18):4269-4277.
93. Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science.* Dec 20 1996;274(5295):2086-2089.

94. Ceresa BP, Kao AW, Santeler SR, Pessin JE. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol.* Jul 1998;18(7):3862-3870.
95. Ibanez CF. Message in a bottle: long-range retrograde signaling in the nervous system. *Trends Cell Biol.* Nov 2007;17(11):519-528.
96. Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell.* Aug 2008;15(2):209-219.
97. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* May 2003;5(5):410-421.
98. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep 2009;10(9):597-608.
99. Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol.* Jan 1983;96(1):1-27.
100. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dec 2002;3(12):893-905.
101. Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell.* Feb 12 1988;52(3):329-341.
102. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci.* May 2000;113 (Pt 9):1515-1524.
103. Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell.* Dec 1992;3(12):1389-1402.
104. Doyotte A, Russell MR, Hopkins CR, Woodman PG. Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci.* Jul 15 2005;118(Pt 14):3003-3017.
105. Slagsvold T, Pattni K, Malerod L, Stenmark H. Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* Jun 2006;16(6):317-326.
106. Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol.* Aug 4 2003;162(3):435-442.
107. Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C, Cohen SN. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 24 2003;100(13):7626-7631.
108. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol.* May 2002;4(5):394-398.
109. Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo J.* Sep 3 2001;20(17):5008-5021.
110. Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell.* Apr 2002;13(4):1313-1328.

111. McCullough J, Row PE, Lorenzo O, et al. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol*. Jan 24 2006;16(2):160-165.
112. Raiborg C, Wesche J, Malerod L, Stenmark H. Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J Cell Sci*. Jun 15 2006;119(Pt 12):2414-2424.
113. Misra S, Hurley JH. Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*. May 28 1999;97(5):657-666.
114. Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*. Apr 4 2003;278(14):12513-12521.
115. Razi M, Futter CE. Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell*. Aug 2006;17(8):3469-3483.
116. Roxrud I, Raiborg C, Pedersen NM, Stang E, Stenmark H. An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*. Mar 24 2008;180(6):1205-1218.
117. Mizuno E, Kobayashi K, Yamamoto A, Kitamura N, Komada M. A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. *Traffic*. Aug 2006;7(8):1017-1031.
118. Puertollano R, Bonifacino JS. Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol*. Mar 2004;6(3):244-251.
119. Pelham HR. Membrane traffic: GGAs sort ubiquitin. *Curr Biol*. May 4 2004;14(9):R357-359.
120. Piper RC, Luzio JP. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol*. Aug 2007;19(4):459-465.
121. Gill DJ, Teo H, Sun J, et al. Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *Embo J*. Jan 24 2007;26(2):600-612.
122. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. Jul 27 2001;106(2):145-155.
123. Chu T, Sun J, Saksena S, Emr SD. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol*. Dec 4 2006;175(5):815-823.
124. Bishop N, Woodman P. TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem*. Apr 13 2001;276(15):11735-11742.
125. Sundquist WI, Schubert HL, Kelly BN, Hill GC, Holton JM, Hill CP. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol Cell*. Mar 26 2004;13(6):783-789.
126. Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*. Aug 2002;3(2):283-289.
127. Hierro A, Sun J, Rusnak AS, et al. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature*. Sep 9 2004;431(7005):221-225.
128. Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, et al. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem*. May 20 2005;280(20):19600-19606.

129. Teo H, Gill DJ, Sun J, et al. ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell*. Apr 7 2006;125(1):99-111.
130. Bowers K, Piper SC, Edeling MA, et al. Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. *J Biol Chem*. Feb 24 2006;281(8):5094-5105.
131. Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*. Aug 2002;3(2):271-282.
132. Teis D, Saksena S, Emr SD. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell*. Oct 2008;15(4):578-589.
133. Bache KG, Stuffers S, Malerod L, et al. The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor. *Mol Biol Cell*. Jun 2006;17(6):2513-2523.
134. Teo H, Perisic O, Gonzalez B, Williams RL. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell*. Oct 2004;7(4):559-569.
135. Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*. Jan 9 2009;136(1):97-109.
136. Nickerson DP, West M, Odorizzi G. Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J Cell Biol*. Dec 4 2006;175(5):715-720.
137. Sachse M, Strous GJ, Klumperman J. ATPase-deficient hVPS4 impairs formation of internal endosomal vesicles and stabilizes bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles. *J Cell Sci*. Apr 1 2004;117(Pt 9):1699-1708.
138. Azmi I, Davies B, Dimaano C, et al. Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J Cell Biol*. Feb 27 2006;172(5):705-717.
139. Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J*. Jun 1 1998;17(11):2982-2993.
140. Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol*. Jan 28 2008;180(2):389-402.
141. Hurley JH, Emr SD. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2006;35:277-298.
142. Nickerson DP, Russell MR, Odorizzi G. A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep*. Jul 2007;8(7):644-650.
143. Russell MR, Nickerson DP, Odorizzi G. Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. *Curr Opin Cell Biol*. Aug 2006;18(4):422-428.
144. Hirano S, Kawasaki M, Ura H, et al. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat Struct Mol Biol*. Mar 2006;13(3):272-277.
145. Komada M, Kitamura N. Growth factor-induced tyrosine phosphorylation of Hrs, a novel 115-kilodalton protein with a structurally conserved putative zinc finger domain. *Mol Cell Biol*. Nov 1995;15(11):6213-6221.
146. Hoeller D, Crosetto N, Blagoev B, et al. Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol*. Feb 2006;8(2):163-169.

147. Itoh F, Divecha N, Brocks L, et al. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling. *Genes Cells*. Mar 2002;7(3):321-331.
148. Hu Y, Chuang JZ, Xu K, McGraw TG, Sung CH. SARA, a FYVE domain protein, affects Rab5-mediated endocytosis. *J Cell Sci*. Dec 15 2002;115(Pt 24):4755-4763.
149. Chuang JZ, Zhao Y, Sung CH. SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods. *Cell*. Aug 10 2007;130(3):535-547.
150. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. Dec 11 1998;95(6):779-791.
151. Wu G, Chen YG, Ozdamar B, et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*. Jan 7 2000;287(5450):92-97.
152. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-791.
153. Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature*. Sep 9 2004;431(7005):205-211.
154. Miura S, Takeshita T, Asao H, et al. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol*. Dec 2000;20(24):9346-9355.
155. Bennett D, Alpey L. PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*. Aug 2002;31(4):419-423.
156. Shi W, Sun C, He B, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol*. Jan 19 2004;164(2):291-300.
157. Goto D, Nakajima H, Mori Y, Kurasawa K, Kitamura N, Iwamoto I. Interaction between Smad anchor for receptor activation and Smad3 is not essential for TGF-beta/Smad3-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 2001;281(5):1100-1105.
158. Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. The role of internalization in transforming growth factor beta1-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells. *J Biol Chem*. Mar 4 2005;280(9):8300-8308.
159. Lu Z, Murray JT, Luo W, et al. Transforming growth factor beta activates Smad2 in the absence of receptor endocytosis. *J Biol Chem*. Aug 16 2002;277(33):29363-29368.
160. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. Dec 1 2005;19(23):2783-2810.
161. Bokel C, Schwabedissen A, Entchev E, Renaud O, Gonzalez-Gaitan M. Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis. *Science*. Nov 17 2006;314(5802):1135-1139.
162. Knoblich JA. Cell biology. Sara splits the signal. *Science*. Nov 17 2006;314(5802):1094-1096.
163. Kitching R, Wong MJ, Koehler D, et al. The RING-H2 protein RNF11 is differentially expressed in breast tumours and interacts with HECT-type E3 ligases. *Biochim Biophys Acta*. Oct 15 2003;1639(2):104-112.

164. Seki N, Hattori A, Hayashi A, et al. Cloning and expression profile of mouse and human genes, Rnf11/RNF11, encoding a novel RING-H2 finger protein. *Biochim Biophys Acta*. Dec 23 1999;1489(2-3):421-427.
165. Subramaniam V, Li H, Wong M, et al. The RING-H2 protein RNF11 is overexpressed in breast cancer and is a target of Smurf2 E3 ligase. *Br J Cancer*. Oct 20 2003;89(8):1538-1544.
166. Chen C, Zhou Z, Liu R, Li Y, Azmi PB, Seth AK. The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 upregulates ErbB2 and EGFR through RING finger protein 11. *Oncogene*. Nov 20 2008;27(54):6845-6855.
167. Santonico E, Belleudi F, Panni S, Torrisi MR, Cesareni G, Castagnoli L. Multiple modification and protein interaction signals drive the Ring finger protein 11 (RNF11) E3 ligase to the endosomal compartment. *Oncogene*. Oct 14;29(41):5604-5618.
168. Li H, Seth A. An RNF11: Smurf2 complex mediates ubiquitination of the AMSH protein. *Oncogene*. Mar 11 2004;23(10):1801-1808.
169. Scheper J, Oliva B, Villa-Freixa J, Thomson TM. Analysis of electrostatic contributions to the selectivity of interactions between RING-finger domains and ubiquitin-conjugating enzymes. *Proteins*. Jan 2009;74(1):92-103.
170. Connor MK, Azmi PB, Subramaniam V, Li H, Seth A. Molecular characterization of ring finger protein 11. *Mol Cancer Res*. Aug 2005;3(8):453-461.
171. Azmi P, Seth A. RNF11 is a multifunctional modulator of growth factor receptor signalling and transcriptional regulation. *Eur J Cancer*. Nov 2005;41(16):2549-2560.
172. Anderson LR, Betarbet R, Gearing M, et al. PARK10 candidate RNF11 is expressed by vulnerable neurons and localizes to Lewy bodies in Parkinson disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. Oct 2007;66(10):955-964.
173. Colland F, Jacq X, Trouplin V, et al. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res*. Jul 2004;14(7):1324-1332.
174. Shembade N, Parvatiyar K, Harhaj NS, Harhaj EW. The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF-kappaB signalling. *Embo J*. Mar 4 2009;28(5):513-522.
175. Jacque E, Ley SC. RNF11, a new piece in the A20 puzzle. *Embo J*. Mar 4 2009;28(5):455-456.
176. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. Nov 1973;52(11):2745-2756.
177. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 3 1998;95(5):2509-2514.
178. Johannessen LE, Pedersen NM, Pedersen KW, Madshus IH, Stang E. Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits. *Mol Cell Biol*. Jan 2006;26(2):389-401.
179. Sorkin AD, Teslenko LV, Nikolsky NN. The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complex dissociation. *Exp Cell Res*. Mar 1988;175(1):192-205.
180. Skarpen E, Johannessen LE, Bjerk K, et al. Endocytosed epidermal growth factor (EGF) receptors contribute to the EGF-mediated growth arrest in A431 cells by

- inducing a sustained increase in p21/CIP1. *Exp Cell Res.* Aug 25 1998;243(1):161-172.
181. Seet LF, Hong W. Endofin, an endosomal FYVE domain protein. *J Biol Chem.* Nov 9 2001;276(45):42445-42454.
182. Malerod L, Stuffers S, Brech A, Stenmark H. Vps22/EAP30 in ESCRT-II mediates endosomal sorting of growth factor and chemokine receptors destined for lysosomal degradation. *Traffic.* Nov 2007;8(11):1617-1629.
183. Raiborg C, Malerod L, Pedersen NM, Stenmark H. Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking. *Exp Cell Res.* Feb 15 2008;314(4):801-813.
184. Gullapalli A, Wolfe BL, Griffin CT, Magnuson T, Trejo J. An essential role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-, Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins. *Mol Biol Cell.* Mar 2006;17(3):1228-1238.
185. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic.* Jul 2009;10(7):925-937.
186. Theos AC, Truschel ST, Tenza D, et al. A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell.* Mar 2006;10(3):343-354.
187. Hirst J, Lindsay MR, Robinson MS. GGAs: roles of the different domains and comparison with AP-1 and clathrin. *Mol Biol Cell.* Nov 2001;12(11):3573-3588.
188. Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol.* Jul 2002;4(7):534-539.
189. Burack WR, Shaw AS. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol.* Apr 2000;12(2):211-216.
190. Locasale JW, Shaw AS, Chakraborty AK. Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 14 2007;104(33):13307-13312.
191. Babst M, Odorizzi G, Estepa EJ, Emr SD. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic.* Mar 2000;1(3):248-258.
192. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* Nov 2003;3(11):807-821.
193. Sflomos G, Kostaras E, Panopoulou E, Pappas N, et al. ERBIN is a Novel SARA-interacting Protein: Competition between SARA and Smad2/3 for binding to ERBIN. *J Cell Sci.* May 2011; (in press)