

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ  
ΚΛΩΝΟΥΣ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ  
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ  
ΣΕΙΡΑ Caki-2.**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΚΥΠΡΙΑΔΗ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. ΣΤΟΥΡΝΑΡΑΣ**

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2002**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Χρήστο Στουρνάρα για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, καθώς και τις Δρ. Άννα Τσαπάρα και Λίτσα Παπακωνσταντή για την επιστημονική καθοδήγηση, τη συνεργασία και την ουσιαστική βοήθειά τους από το ξεκίνημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών έως τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες, Λίνα Βαρδούλη και Γαλάτεια Καλλέργη για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που επικρατούσε στον εργαστηριακό χώρο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
1.1 Η ακτίνη ως δομική μονάδα.....	7
1.1.1 Δομή της μονομερούς ακτίνης (G-ακτίνη).....	7
1.1.2 Δομή της πολυμερούς ακτίνης (F-ακτίνη).....	7
1.2 Η ακτίνη στα κύτταρα: Οργάνωση του κυτταροσκελετού.....	8
1.3 Τροποποιήσεις της ακτίνης στην καρβόξυ-τελική ουρά και συγκεκριμένα στην Cys374.....	9
1.4 Ο λειτουργικός ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης-πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την ακτίνη.....	10
1.5 Η οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνύματος.....	11
1.6 Οι Ιντεγκρίνες.....	12
1.7 Τα φωσφοϊνοσιτίδια.....	12
1.7.1 Ρόλος του PI(4,5) στον πολυμερισμό και την ενδοκύττωση.....	13
1.8 Οι p21 <sup>Rac/Cdc 42</sup> - ενεργοποιημένες κινάσες (PAKs).....	13
1.9 Οι συνδεδεμένες με τις εστίες πρόσφυσης κινάσες, στα καρκινικά κύτταρα.....	14
1.9.1 Η οικογένεια των Src.....	14
1.9.2 Η κινάση των εστιών πρόσφυσης, Fak.....	15
1.9.3 Η κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3, PI3-K.....	16
1.9.3.1 Ενεργοποίηση της PI3-κινάσης και επιβίωση.....	17
1.9.3.2 PI3 και νεοπλασία.....	17
1.10 Δομή και ρύθμιση του PKB/Akt.....	19
1.11 PIP3 Φωσφατάσες.....	20
1.11.1 Ο ρόλος του PTEN στις διαδικασίες της απόπτωσης.....	20
1.11.2 Ο ρόλος του PTEN στην προσκόλληση, μετανάστευση και μετάσταση.....	21
1.12 Επίδραση εξωγενών παραγόντων στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.....	22
1.13 Τα οπιοειδή.....	22
1.13.1 Οι καζομορφίνες.....	22
1.13.2 Οι υποδοχείς των οπιοειδών.....	22
1.13.3 Ταυτοποίηση μιας νέας καζομορφίνης ( $\alpha_{S1}$ - και το αμίδιο της).....	23
1.13.4 Δέσμευση στους υποδοχείς.....	23
1.14 Επίδραση των οπιοειδών στον κυτταροσκελετό.....	24
1.15 Ερευνητικό ερώτημα.....	25
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	26
2.1 Βιολογικό υλικό.....	26
2.2 Μέθοδοι.....	26
2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	26
2.2.2 Άμεσος ανοσοφθορισμός.....	29
2.2.3 Western Blot ανάλυση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.....	30
Α) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS αποδιάταξης (SDS-PAGE).....	31
Β) Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.....	33
Γ) Υβριδοποίηση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης και ανίχνευσή τους με το σύστημα χημειοφωταύγειας.....	34

2.2.4 Ανάλυση των πρωτεϊνών στα διαλυτά και αδιάλυτα στο Triton X-100 κυτταρικά κλάσματα, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης.....	35
A) Προετοιμασία των κυτταρικών κλασμάτων.....	35
B) Ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών.....	36
Γ) Western Blot ανάλυση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.....	36
2.2.5 Κλασματοποίηση του κυτταροσκελετού σε διαλυτό και σε αδιάλυτο στο Triton X-100.....	37
2.2.6 Ανάλυση των ενεργών πρωτεϊνών Rac και Cdc42 στα κυτταρικά κλάσματα, με τη μέθοδο της κατακρήμνισης με δυνάμεις συγγένειας (Affinity precipitation).....	39
2.2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών μετά από λύση των κυττάρων παρουσία απορρυπαντικού.....	40
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>41</b>
3.1 Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία εστιών πρόσφυσης και των μικρών GTPασών, στους μεταλλαγμένους κλώνους της ακτίνης.....	41
3.2 Φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών.....	42
3.3. Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στη δυναμική ισορροπία μεταξύ μονομερούς (G) προς πολυμερή ακτίνη (F), με τη μέθοδο του κλασματικού διαχωρισμού στο Triton X-100 και Western ανάλυση.....	43
3.3.1 Επίδραση των οπιοειδών (EKC και a <sub>s1</sub> -cas) και του παράγοντα TNF-α στο κλάσμα μονομερούς/ολική ακτίνη στους μεταλλαγμένους κλώνους και στα φυσιολογικά OK.....	43
3.3.2 Επίδραση των οπιοειδών (EKC και a <sub>s1</sub> -cas) στο κλάσμα μονομερούς/ολική ακτίνη στα καρκινικά κύτταρα Caki-2.....	44
3.4 Η φωσφορυλίωση σε τυροσίνη είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης του οπιοειδούς EKC στα καρκινικά κύτταρα Caki-2.....	46
3.5 Αλληλεπίδραση των υπομονάδων της PI-3 κινάσης παρουσία οπιοειδών με τις υπομονάδες Gβγ στα καρκινικά κύτταρα Caki-2. ....	49
3.6 Τα οπιοειδή δεν ενεργοποιούν τις μικρές GTPασες, Rac1 και Cdc 42.....	50
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....</b>	<b>51</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>54</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όπως είναι γνωστό τα οπιοειδή προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των νεοπλασματικών κυττάρων του μαστού και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε φυσιολογικά νεφροσωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (OK). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι πιθανές αντινεοπλασματικές δράσεις των οπιοειδών αγωνιστών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο κλώνους που εκφράζουν διαφορετικές μεταλλάξεις της ακτίνης, στην Cys<sup>374</sup>, των κυττάρων OK και νεοπλασματικά επιθηλιακά νεφροσωληναριακά κύτταρα ανθρώπου Caki-2.

Πειράματα western blot ανάλυσης σε TritonX-100 διαλυτά και αδιάλυτα κυτταρικά κλάσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση του λόγου μονομερούς/ολική ακτίνη (G/Total) στους μεταλλαγμένους κλώνους των OK, με επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών αιθυλκετοκυκλαζοσίνη και  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνη και του παράγοντα TNF- $\alpha$  για 30 λεπτά. Επίδραση του οπιοειδούς  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνη στα καρκινικά κύτταρα οδήγησε σε παροδική αύξηση του λόγου μονομερούς/πολυμερή (G/F) ακτίνη, στα 30 λεπτά, ενώ επίδραση της αιθυλκετοκυκλαζοσίνης στα κύτταρα αυτά οδήγησε σταδιακά σε μείωση του λόγου G/F στο χρονικό διάστημα των δύο ωρών.

Ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση των μοριακών μηχανισμών δράσης των οπιοειδών στον κυτταροσκελετό των Caki-2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με το μονοκλωνικό αντίσωμα της φωσφοτυροσίνης στα νεοπλασματικά κύτταρα έδειξαν ισχυρή φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Fak και παξιλλίνης, παρουσία του οπιοειδούς αιθυλκετοκυκλαζοσίνη. Η πιθανή συμμετοχή της PI-3 κινάσης στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Fak και παξιλλίνης, με επίδραση αιθυλκετοκυκλαζοσίνης, διερευνήθηκε με χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα της PI-3 κινάσης (βορτμανίνη), που όπως έδειξε η ενεργοποίηση της κινάσης αυτής είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αυτών.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι δύο διαφορετικοί οπιοειδείς αγωνιστές έχουν αντίθετα αποτελέσματα στη δυναμική πολυμερισμού της ακτίνης στα καρκινικά κύτταρα Caki-2 και ότι η φωσφορυλίωση σε τυροσίνη των πρωτεϊνών Fak και Παξιλλίνης, από την επίδραση της αιθυλκετοκυκλαζοσίνης, εξαρτάται από την ενεργοποίηση της PI-3 Κινάσης στα κύτταρα αυτά. Επομένως η παρούσα διατριβή δίνει νέα στοιχεία όσον αφορά την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα του νεφρώνα, με ελπιδοφόρα μηνύματα χρησιμοποίησής τους ως δυναμικό στόχο-φάρμακο για τη θεραπεία του καρκίνου.

## ABSTRACT

Opioids are known for their antiproliferative properties against cancer cells. Also, it has been shown that actin filaments are preferentially depolymerized in cancer cells as compared to higher levels of actin polymerization in their normal counterparts, suggesting that the dynamic state of actin correlates with the expression of the malignant phenotype. The aim of our study was to investigate whether opioids might have other antineoplastic properties that are related to the modulation of actin polymerization and stabilization. We used as model for opioid action on actin organization the Cys<sup>374</sup> mutated human  $\beta$ -actin in the opossum kidney cells and the kidney cancer cell line Caki-2.

Triton fractionation and immunoblot analysis showed that exposure of the mutated OK cells to the opioids  $\alpha_{s1}$ -casomorphin and ethylketocyclazocine and TNF- $\alpha$  for 30 min, resulted in a rapid and substantial actin microfilament reorganisation, as it was documented by a significant increase of the G/Total actin ratio. Exposure of Caki-2 cells to the opioid  $\alpha_{s1}$ -casomorphin resulted in a transient increase of the G/F actin ratio, after 15 min, with return to the normal levels after further incubation, whereas the opioid ethylketocyclazocine constantly decreased the G/F actin ratio of Caki-2 cells, for at least 2h.

In order to explore the signal transduction pathway of opioid action in Caki-2 cells, we first investigated whether opioids induce tyrosine phosphorylation of specific actin relating proteins. Immunoprecipitation and immunoblot analysis with monoclonal phosphotyrosine antibody showed that the opioid agonist ethylketocyclazocine strongly affects only the phosphorylation of two proteins, the Focal Adhesion Kinase (FAK) and Paxillin in Caki-2 cells. Interestingly, in Caki-2 cells these proteins were not phosphorylated significantly after exposure to the opioid  $\alpha_{s1}$ -casomorphin. We further examined a possible relationship between PI-3 kinase activation and Fak and Paxillin phosphorylation. For this we performed the above mentioned experiment in the presence of Wortmannin, a specific PI-3 kinase inhibitor. Our experiment demonstrated that Wortmannin affected tyrosine phosphorylation of both focal adhesion proteins, suggesting that FAK and Paxillin phosphorylation pathway is dependent on PI-3 kinase activation.

Our findings demonstrate that two different opioids induce opposite modifications in the dynamics of actin polymerization in malignant Caki-2 cells and tyrosine phosphorylation of FAK and paxillin, after exposure to ethylketocyclazocine is dependent on the activation of PI3-Kinase. These results may be important for understanding the mechanism of opioids and their role as potential agent against the cancer cells.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Η ακτίνη ως δομική μονάδα.

Η ακτίνη απομονώθηκε αρχικά από μυϊκό ιστό όπου μαζί με τη μυοσίνη αποτελούν τις δύο κυριότερες πρωτεΐνες των μυών. Σύντομα έγινε αντιληπτό ότι δεν εντοπίζεται αποκλειστικά στους μύες, αλλά ότι υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά, όχι όμως στα προκαρυωτικά κύτταρα σε υψηλό ποσοστό (15-20%) της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης και αποτελεί δομικό συστατικό του κυτταροσκελετού τους και συγκεκριμένα των μικροϊνιδίων.

#### 1.1.1 Δομή της μονομερούς ακτίνης (G-ακτίνη).

Όσον αφορά τη δομή της μονομερούς ακτίνης, στα θηλαστικά υπάρχουν τουλάχιστον έξι διαφορετικές ισομορφές ακτίνης (Vendekerchove and Weber 1978), οι οποίες αποτελούν προϊόντα έξι διαφορετικών γονιδίων (Ponte et al., 1983) και εκφράζονται με πολύπλοκο αναπτυξιακό και ιστοειδικό τρόπο. Με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο διακρίνονται σε τρεις μορφές: α-, β- και γ- ακτίνη και σύμφωνα με την ιστοειδικότητά τους κατατάσσονται σε μυϊκές και κυτταροπλασματικές. Οι κυτταροπλασματικές περιλαμβάνουν δύο ισομορφές, β- και γ- κυτταροπλασματική και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα σε διαφορετικά επίπεδα, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου.

Όλες οι ισομορφές αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 375 αμινοξέων και μοριακού βάρους περίπου 42 kDa. Κάθε μόριο ακτίνης έχει τουλάχιστον έξι με δέκα θέσεις πρόσδεσης για κατιόντα, από τις οποίες μία είναι υψηλής συγγένειας για  $Mg^{2+}$  ή  $Ca^{2+}$  (Pollard 1990). Επίσης κάθε μόριο ακτίνης συνδέει με μεγάλη συγγένεια ένα μόριο νουκλεοτιδίου (ATP ή ADP), το οποίο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι ATP. Οι δύο αυτοί συμπαράγοντες είναι απαραίτητοι για τη σταθερότητα του μορίου καθώς η *in vitro* απομάκρυνσή τους οδηγεί σε πλήρη μετουσίωση της ακτίνης (Korn 1982).

Σύμφωνα με τα δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας για τον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής της ακτίνης, το μόριό της έχει δισκοειδές σχήμα και αποτελείται από δύο περιοχές (domains). Οι δύο περιοχές βρίσκονται ο ένας κοντά στον άλλο σχηματίζοντας μεταξύ τους μια βαθιά σχισμή όπου βρίσκονται οι θέσεις σύνδεσης για το νουκλεοτίδιο και για το δισθενές ιόν. Με τον τρόπο αυτό, συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δεσμών τόσο με το δισθενές ιόν, όσο και με τις φωσφορικές ομάδες του νουκλεοτιδίου εξηγώντας το φαινόμενο της σταθεροποίησης της ακτίνης από τους συμπαράγοντές της.

#### 1.1.2 Δομή της πολυμερούς ακτίνης (F-ακτίνη).

Η θεμελιώδης ιδιότητα της μονομερούς ακτίνης, είναι η ικανότητά της να πολυμερίζεται σε ινίδια. *In vitro* και κάτω από συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος η ακτίνη υπάρχει ως διάλυμα μονομερών (G-ακτίνη), αύξηση όμως της ιονικής ισχύος έχει ως αποτέλεσμα τον πολυμερισμό της, μέσω μη-ομοιοπολικών δεσμών σε συνθετικά ινίδια διαμέτρου 5-7 nm και μήκους αρκετών μm (F-ακτίνη). Στα κύτταρα η ακτίνη απαντάται σε μονομερή και πολυμερή μορφή σε δυναμική ισορροπία.

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο πολυμερισμού της ακτίνης, είναι απαραίτητη η δημιουργία τριμερών, τα οποία σχηματίζουν έναν αρχικό πυρήνα και δημιουργούνται με αλλαγή της διαμόρφωσης των μονομερών της ακτίνης μετά από σύνδεσή τους με ιόντα  $Mg^{2+}$  (Zimmerle and Friend). Η αύξησή τους συνεχίζεται με

προσθήκη ATP-ακτίνης που μετά την ενσωμάτωσή της μετατρέπεται σε ADP-Pi-ακτίνη και τελικά σε ADP-ακτίνη, (Korn et al., 1987). Αξίζει να αναλυθεί ο όρος: κρίσιμη συγκέντρωση (Cc: Critical concentration), όσον αφορά το μηχανισμό πολυμερισμού της ακτίνης, που θεωρείται η συγκέντρωση της μονομερούς ακτίνης στην οποία ο ρυθμός απομάκρυνσης (dissociation) υπομονάδων από τα άκρα του ινιδίου είναι ίσος με το ρυθμό προσθήκης (association) μονομερών και η οποία αντιπροσωπεύει επίσης την ελάχιστη συγκέντρωση μονομερούς ακτίνης που απαιτείται για την εκκίνηση του πολυμερισμού.

Τα ινίδια της ακτίνης παρουσιάζουν μία πολωμένη κατεύθυνση η οποία σχετίζεται με την κινητική πολυμερισμού/αποπολυμερισμού σε κάθε άκρο τους. Το "ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο" (barbed end) του ινιδίου παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για την ATP-ακτίνη από το "βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο" (pointed end) και στην κατάσταση εκείνη όπου το μήκος του ινιδίου παραμένει σταθερό (treadmill) για κάθε μόριο της ακτίνης που προστίθεται στο "ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο", ένα μόριο ακτίνης απομακρύνεται από το βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο" (Bonder et al., 1983).

## 1.2 Η ακτίνη στα κύτταρα: Οργάνωση του κυτταροσκελετού.

Η ακτίνη στα μη μυϊκά κύτταρα υπάρχει τόσο στην πολυμερή όσο και στη μονομερή (μη πολυμερισμένη) μορφή της. Η ισορροπία μεταξύ του μονομερούς κλάσματος, που αποτελεί το 30-50% της ολικής ακτίνης και του κλάσματος της ινδιακής ακτίνης επιτυγχάνεται επειδή η συγκέντρωση της διαθέσιμης για πολυμερισμό μονομερούς ακτίνης είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωση της ολικής μονομερούς ακτίνης, αφού τα περισσότερα μόρια της μη-πολυμερισμένης ακτίνης δεν υφίστανται ως ελεύθερα μονομερή, αλλά σχηματίζουν σύμπλοκα με τις συνδεδεμένες με τη μονομερή ακτίνη πρωτεΐνες (monomer actin-binding proteins).

Το κλάσμα της πολυμερούς ακτίνης αποτελείται από ινίδια που οργανώνονται σε χαρακτηριστικές δομές στις διάφορες κυτταροπλασματικές περιοχές (Stossel 1984, Small et al., 1998). Στην περιφέρεια του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα στη λάμελλα (lamella), την περιοχή του κυτταροπλάσματος κάτω από την πλασματική μεμβράνη, υπάρχει ένα αναστομωμένο πλέγμα ινιδίων (cortical actin). Τα μικροϊνίδια συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη με το "ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο" τους, ενώ το "βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο" κατευθύνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου (Begg et al., 1978). Το πλέγμα των μικροϊνιδίων αποτελεί τον κυτταρικό φλοιό ο οποίος προσδίδει μηχανική αντοχή στην κυτταρική μεμβράνη, διευκολύνει την αλλαγή του σχήματος των κυττάρων και συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.

Η αρχιτεκτονική των περιφερειακών ινιδίων (*cortical actin filaments*) ποικίλει όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων, αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου κυττάρου. Αξίζει να αναφερθούν οι χαρακτηριστικές δομές των λαμελλιποδίων (*lamellipodia*), που μοιάζουν με λεπτά πέπλα και περιέχουν ένα πυκνό πλέγμα ινιδίων το οποίο και τους προσδίδει το χαρακτηριστικό τους σχήμα. Επιπλέον συχνά τα λαμελλιπόδια ανασηκώνονται από το υπόστρωμα (substrate) και διπλώνουν προς τα πίσω και πάνω από το το σώμα του κυττάρου (dorsally), δημιουργώντας τις μεμβρανικές αναδιπλώσεις (*membrane ruffles*). Τα φιλοπόδια (*filopodia*) αποτελούν την πιο εκτεταμένη μορφή αυτών των δομών και εμφανίζονται σαν επιφανειακές μεμβρανικές προεξοχές αρκετά μεγάλου μήκους και κυλινδρικού σχήματος. Περιέχουν μια σφιχτή δέσμη παράλληλων ινιδίων με μήκος ίσο τουλάχιστον με το μήκος του φιλοποδίου. Αντιθέτως στα λιγότερο κινούμενα άκρα η έκταση της λάμελλας είναι πολύ μικρότερη και συχνά περιγράφεται από περιφερειακές δέσμες ινιδίων (*peripheral bundles*) με κοίλο σχήμα και με σύσταση παρόμοια με αυτή των ινιδίων του στρες.



Το σώμα του κυττάρου, τόσο την κάτω πλευρά (ventral) που εφάπτεται στο υπόστρωμα, όσο και την πάνω πλευρά (dorsal), διατρέχουν παράλληλες δέσμες ινιδίων, τα *ινίδια του στρες (stress fibers)*. Οι δέσμες αυτές αποτελούνται από ινίδια διαφορετικού μήκους και όχι ενιαίου προσανατολισμού και το συνολικό μήκος της δέσμης ποικίλει

(Sanger et al 1983). Συνήθως εκτείνονται από την περιφέρεια έως την περιπυρηνική περιοχή του κυττάρου, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις που εκτείνονται και πάνω ή κάτω από τον πυρήνα. Τα άκρα των δεσμών για τα ινίδια του στρες που διατρέχουν την κάτω επιφάνεια του κυττάρου "αγκυροβολούν" στις *εστίες πρόσφυσης (focal adhesions)*, τις περιοχές επαφής της μεμβράνης με την εξωκυττάρια ουσία (extra cellular matrix) και στο σημείο αυτό όλα τα ινίδια έχουν ομοίμορφο προσανατολισμό, με το "αμβλύ" τους άκρο να καταλήγει στη μεμβράνη (Sanger and Sanger 1980).

### **1.3 Τροποποιήσεις της ακτίνης στην καρβοξυτελική ουρά και συγκεκριμένα στην Cys 374.**

Το καρβοξυτελικό άκρο της ακτίνης και πιο συγκεκριμένα τα τρία τελευταία αμινοξέα (Lys373 Cys374 Phe375), εντοπίζεται στο κάτω μέρος του μονομερούς, ενώ όσον αφορά στο ινίδιο, στο μεν "αμβλύ" άκρο εμφανίζεται εκτεθειμένο, στις δε υπόλοιπες υπομονάδες εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαδοχικών υπομονάδων της ίδιας έλικας (Kabsch et al., 1990). Επιπλέον αποτελεί περιοχή πρόσδεσης ποικίλων πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη είτε με τη μονομερή είτε με την πολυμερή της μορφή (Vandekerckhove 1990, Rozycki et al., 1994). Το πρωτελευταίο αμινοξύ της ακτίνης η κυστεΐνη 374 (Cys 374), αποτελεί δημοφιλή στόχο σήμανσης καθώς είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια του μορίου και συνεπώς προσπελάσιμη για την τροποποίησή της. Η γλουταθειόνυλο-ακτίνη αποτελεί παράγωγο της ακτίνης που προκύπτει από την προσθήκη στην Cys374, μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού, ενός τριπεπτιδίου γλουταθειόνης (Stournaras et al., 1990). Παρ' όλο που η τροποποιημένη ακτίνη διατηρεί την ικανότητα του πολυμερισμού, τα μικροϊνίδια που σχηματίζει εμφανίζουν μειωμένη μηχανική αντοχή και σταθερότητα (Stournaras et al., 1990, Drewes and Faulstich 1990, 1993).

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του περιβάλλοντος της Cys374 στη δομική οργάνωση και λειτουργικότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα κύτταρα, δημιουργήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις της β-ακτίνης, με παροδική και μόνιμη έκφραση της μεταλλαγμένης ακτίνης σε κυτταρικές σειρές από θηλαστικά (Tsapara et al., 1999). Επιλέχθηκε η υποκατάσταση της Cys είτε με αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ (Asp ή Glu), με στόχο την αλλαγή του περιβάλλοντος στο καρβοξυτελικό άκρο κατά τρόπο που να μιμείται τη μεταβολή που επιφέρει η εισαγωγή της γλουταθειόνης, στην περίπτωση της γλουταθειονυλο-ακτίνης, είτε με ουδέτερο αμινοξύ (Ala), ώστε να διαπιστωθεί εάν καθεαυτή η απομάκρυνση της σουλφιδρυλομάδας της κυστεΐνης ευθύνεται για τις προσδοκώμενες μεταβολές. Και τα τρία μεταλλάγματα έφεραν στο αμινοτελικό τους άκρο έναν επίτοπο flag, για να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους από την ενδογενή ακτίνη των κυττάρων και για το λόγο αυτό ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η μη μεταλλαγμένη ακτίνη (αγρίου τύπου : wt), η οποία κατά ταυτόσημο τρόπο φέρει τον ίδιο επίτοπο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων: τα Ishikawa, κύτταρα από καλά διαφοροποιημένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου και τα OK (Opposum kidney cells), κύτταρα από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο του νεφρού του αμερικανού ασβού, οι οποίες παρουσιάζουν καλά οργανωμένο πλέγμα

μικροϊνιδίων και ο κυτταροσκελετός τους αποκρίνεται χαρακτηριστικά σε διάφορα εξωκυττάρια ερεθίσματα (Koukouritaki et al., 1996, 1999a, Papakonstanti et al., 1996, 1998, 2000).

Η μετάλλαξη της Cys374 της ακτίνης σε αρνητικό αμινοξύ οδήγησε στην απουσία του καλά διαμορφωμένου πλέγματος ινιδίων και στον εντοπισμό της εξωγενούς ακτίνης κυρίως στην περιφέρεια του κυττάρου. Αντιθέτως στην περίπτωση της μετάλλαξης σε ουδέτερο αμινοξύ ήταν εμφανής η ύπαρξη εκτεταμένου δικτύου μικροϊνιδίων και ο εντοπισμός της εξωγενούς ακτίνης κατά κύριο λόγο στα ινίδια του στρες, υποδηλώνοντας ότι η φύση του αμινοξέος στη θέση 374 του μορίου της ακτίνης επηρέαζε σημαντικά την ικανότητά της να οργανώνεται σε μικροϊνιδιακές δομές *ex vivo*. Η αρχιτεκτονική του ενδογενούς κυτταροσκελετού ήταν ταυτόσημη με την οργάνωση της εξωγενούς ακτίνης υποδηλώνοντας ότι η αποδιοργάνωση των μικροϊνιδιακών μορφών των αρνητικά φορτισμένων μεταλλάξεων, δεν οφείλεται σε αδυναμία ενσωμάτωσης της εξωγενούς ακτίνης στη δυναμική του ενδογενούς συστήματος, αλλά μάλλον σε ενεργό συμμετοχή και μετατόπιση της ισορροπίας προς τον αποπολυμερισμό (Tsapara et al., 1999). Όσον αφορά τη σταθερή έκφραση των μεταλλάξεων, αυτή οδήγησε σε παρόμοια οργάνωση της εξωγενούς ακτίνης με αυτή την περίπτωση της παροδικής τους έκφρασης.

Η παραπάνω συμπεριφορά φανερώνει ότι κυτταρικοί κλώνοι που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη ακτίνη μπορούν ενδεχομένως να αποτελέσουν εργαλείο για τη διερεύνηση του ρόλου της δυναμικής ισορροπίας του πολυμερισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη μεταγωγή κυτταρικών μηνυμάτων.

#### **1.4 Ο λειτουργικός ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης-πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την ακτίνη.**

Οι *in vitro* αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη (actin binding proteins), με τη μονομερή ή /και την πολυμερή μορφή της και τα αποτελέσματα της δράσης τους στον πολυμερισμό είναι καλά καθορισμένα (Pollard 1986). Η συνεισφορά όμως αυτών των δράσεων *in vivo* στη μεταβολή του επιπέδου πολυμερισμού της ακτίνης και κατά συνέπεια της οργάνωσης του κυτταροσκελετού στα κύτταρα δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένη (Ayscough 1998). Με βάση λοιπόν το λειτουργικό τους ρόλο οι συνδεδεμένες με την ακτίνη πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (α) πρωτεΐνες που μεταβάλλουν τις κινητικές παραμέτρους και/ ή τη σταθερή κατάσταση του *in vitro* πολυμερισμού και συνεπώς επιτρέπουν στα κύτταρα την ταχεία αναδιοργάνωση τους και (β) πρωτεΐνες που οργανώνουν τα ινίδια σε δομές υψηλότερου επιπέδου. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες με ενεργότητες δέσμευσης μονομερών (sequestration), σχηματισμού πυρήνων (nucleation), ανακύκλωσης μονομερών (treadmilling), κάλυψης των άκρων (capping) και κατάτμησης ινιδίων (severing). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συνδέονται με μικροϊνίδια με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση (stabilization) ή τη διασύνδεση (crosslinking) και δεσματοποίηση (bundling) ή τη σύνδεση με μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τη μονομερή ακτίνη σχηματίζουν σύμπλοκο το οποίο δεν είναι δυνατόν να πολυμερισθεί και επομένως συμβάλλουν στη μετατόπιση της ισορροπίας προς τη μη πολυμερισμένη μορφή της ακτίνης αναστέλλοντας τον πολυμερισμό της. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι προφιλίνες, η DNάση I και η συνδεδεμένη με τη βιταμίνη D πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται στο ένα από τα δύο άκρα των ινιδίων της ακτίνης, οι περισσότερες στο ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο εμποδίζουν την περαιτέρω προσθήκη μονομερών ακτίνης. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής που συνδέονται πλευρικά στα

ινίδια έχουν την ικανότητα να εισχωρούν ανάμεσα σε δύο γειτονικά μόρια ακτίνης διασπώντας έτσι τη συνέχεια των ινιδίων και ονομάζονται πρωτεΐνες κατάτμησης της ακτίνης (actin severing proteins). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η φραγκμίνη, η σεβερίνη, η γελσολίνη και η βιλλίνη. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες που συνδέονται πλευρικά στα ινίδια της ακτίνης, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση ή τη διασύνδεσή τους σε δέσμες ινιδίων, με κύριους εκπροσώπους τη βιλλίνη, η οποία όπως αναφέρθηκε δρα και ως πρωτεΐνη κατάτμησης της ακτίνης, τη φιμπρίνη και τη ζώνη 4.9. Τέλος στις πρωτεΐνες που μεσολαβούν στη σύνδεση των ινιδίων της ακτίνης στην κυτταρική μεμβράνη ανήκουν, η βινκουλίνη, η α-ακτινίνη, η οποία συνδέεται με την ακτίνη μέσω της βινκουλίνης ( Wachstock et al., 1987), η ταλίνη, η οποία συνδέεται με τη βινκουλίνη (Burrige and Mangeat 1984), αλλά και άμεσα με την ακτίνη (Pavalco et al., 1991), η σπεκτρίνη, η ζώνη 4.1 και μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 110 kDa. Οι πρωτεΐνες που συνδέουν τα ινίδια της ακτίνης με μεμβρανικές πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των εστιών πρόσφυσης καθώς και στη σύνδεση του περιφερειακού πλέγματος με τη μεμβράνη. Στις εστίες πρόσφυσης η α-ακτινίνη και η ταλίνη συνδέουν τα μικροϊνίδια με το κυτταροπλασματικό τμήμα των ιντεγκρινών (integrins), των υποδοχέων για τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (Luna and Hitt 1992, Burrige and Chrzanowska-Wodnicka 1996). Στη δεύτερη περίπτωση η σύνδεση με τα μικροϊνίδια επιτυγχάνεται είτε με την απευθείας σύνδεση της ταλίνης στο πλάι του ινιδίου είτε με την αλληλεπίδρασή της με τη βινκουλίνη, η οποία επίσης προσδένεται στο πλάι των ινιδίων. Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με πλήθος άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις εστίες πρόσφυσης, όπως είναι η παξιλλίνη, η ζυξίνη και η VASP, και επιπλέον οι ταλίνη και η βινκουλίνη αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης της FAK (Focal Adhesion Kinase). Η ενεργότητα επίσης της βινκουλίνης ρυθμίζεται από τα φωσφοϊννοσιτίδια. Η πρόσδεσή τους στη βινκουλίνη οδηγεί στην ενδομοριακή αλληλεπίδραση των δύο μισών της και συνεπώς επάγει της αλλαγή της διαμόρφωσής της και την αποκάλυψη των θέσεων πρόσδεσης για την ακτίνη και την ταλίνη.

### **1.5 Η οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνύματος.**

Πρόσφατες εργασίες δείχνουν ότι τα διάφορα μόρια, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, λιπάσες, κινάσες λιπιδίων, ιόντα ασβεστίου και G-πρωτεΐνες, τα οποία εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνυμάτων, συμμετέχουν με ρυθμιστικό τρόπο στις μεταβολές της δυναμικής ισορροπίας πολυμερισμού της ακτίνης. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη διατύπωση της υπόθεσης ότι ο κυτταροσκελετός της ακτίνης αποτελεί έναν κεντρικό κρίκο στην αλληλουχία ανίχνευσης και μετάδοσης κυτταρικών μηνυμάτων (Hall 1994, Tapon and Hall 1997, Moustakas and Stournaras 1999, Koukouritaki et al., 1999). Τα στάδια που μεσολαβούν από τη λήψη ενός εξωκυττάριας μηνύματος έως τη μεταβολή του κυτταροσκελετού, συχνά ποικίλουν.

Μια οδός συμμετοχής του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνυμάτων είναι μέσω της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών της υπεροικογένειας ras (Maschesky and Hall 1996, 1997, Moustakas and Stournaras 1999). Οι τρεις GTP-συνδεδεμένες πρωτεΐνες της οικογένειας ras: Rho, Rac και Cdc42 ελέγχουν τη συγκρότηση των ινιδίων της ακτίνης σε απόκριση εξωκυττάριας ερεθισμάτων (Hall 1998). Οι μικρές αυτές GTPάσες έχουν γνωστή επίδραση στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η Rho ελέγχει τη σύνδεση των ινιδίων του στρες και των εστιών πρόσφυσης (focal adhesions), ενώ οι Rac και Cdc42 ελέγχουν το σχηματισμό λαμελλιποδίων και φιλοποδίων αντίστοιχα (Hall 1998). Η ικανότητα αυτή καθιστά τις μικρές αυτές GTPάσες ενεργές στη μετάδοση του μηνύματος, μέσω των

ιντεγκρινών κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης και της μετακίνησης των κυττάρων. Οι Rho GTPάσες ενεργοποιούν την κινάση των κυτταρικών εστιών προσκόλλησης (focal adhesions kinase), η οποία εντοπίζεται στο σύμπλεγμα ακτίνης-εστία προσκόλλησης και είναι υπεύθυνη για την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης αυτής της μεμβρανικής περιοχής (Yamada and Geiger 1997). Επίσης, οι Rho σε συνδυασμό με τις Rac πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη σύνθεση της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI(4,5)P<sub>2</sub>) μέσω ενεργοποίησης της κινάσης-3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI-3) (Tolias et al., 1995, Bokoch et al., 1996, Taron and Hall 1997), ενεργότητες που εξηγούν τη δράση των εν λόγω πρωτεϊνών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

### 1.6 Οι Ιντεγκρίνες

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων καθώς και με τις εξωκυττάρια ουσίες κατά την ανάπτυξη είναι απαραίτητα γεγονότα για τη ρύθμιση της μορφολογίας και της φυσιολογίας των ιστών. Οικογένειες υποδοχέων (οι καδερίνες, σελεκτίνες και CAMs) συμπεριλαμβάνονται στις επαφές των κυττάρων, ενώ οι ιντεγκρίνες και οι πρωτεογλυκάνες είναι οι κύριοι υποδοχείς για τις αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια ουσία.

Οι ιντεγκρίνες ανήκουν στην τάξη των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών που δομικά συνδέουν τον κυτταροσκελετό με το περιβάλλον εξωτερικά του κυττάρου. Στην κυτταροπλασματική πλευρά πολλές ιντεγκρίνες συνδέονται με τις δέσμες των ινιδίων της ακτίνης μέσω πρωτεϊνών που λειτουργούν ως γέφυρες, όπως τη βινκουλίνη, την ταλίνη, την α-ακτινίνη, την τενσίνη και την παξιλλίνη, με εξαίρεση τη β4 ιντεγκρίνη, που συνδέεται στα ενδιάμεσα ινίδια. Η αλληλεπίδραση με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση των ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κυττάρων και τη δημιουργία κλειστών δομών, γνωστές ως εστίες πρόσφυσης, όπου τα άκρα των ινιδίων της ακτίνης φθάνουν στην πλασματική μεμβράνη, όπου εντοπίζονται οι παξιλλίνη, βινκουλίνη, α-ακτινίνη και ταλίνη. Με το πλησίασμα στην πλασματική μεμβράνη ο κυτταροσκελετός επικοινωνεί με το εξωκυττάριο περιβάλλον και ελέγχει τις απαραίτητες δυνάμεις για την κίνηση των κυττάρων, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και την οργάνωση τους σε ιστούς.

Η συμμετοχή των ιντεγκρινών στο σηματοδοτικό μονοπάτι περιλαμβάνει τη διαδικασία του μεταβολισμού των φωσφορικών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, την ενεργοποίηση των RAS και MAPK, των πρωτεϊνικών κινάσων C, των κινάσων τυροσίνης και τη ρύθμιση της οικογένειας Rho των μονομερών GTPασών. Οι β1 και β3 ιντεγκρίνες έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τις GTPάσες της οικογένειας Rho, την πρωτεϊνική κινάση C και τις κινάσες τυροσίνης p125Fak και Src με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, γεγονότα που θα αναλυθούν παρακάτω.

### 1.7 Τα φωσφοϊνσιτίδια

Τα φωσφοϊνσιτίδια είναι ένας τύπος φωσφολιπιδίων που απαντάται σε αφθονία στα ευκαρυωτικά κύτταρα, σε επτά διαφορετικά μόρια που προκύπτουν από τη φωσφορυλίωση σε διαφορετικές θέσεις της κεφαλής της ινσιτόλης της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (Tataomi et al., 2001). Ένα από τα κύρια φωσφοϊνσιτίδια το PI(4,5)P<sub>2</sub> σχετίζεται με την παραγωγή δευτέρων αγγελιαφόρων, όπως του 1,4,5 τριφωσφορικού (IP<sub>3</sub>) και της διακυλογλυκερόλης (DG), σε απόκριση εξωτερικών ερεθισμάτων.

Το  $IP_3$  απελευθερώνει ιόντα  $Ca^{+2}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ η διακυλογλυκερόλη ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες C, με αποτέλεσμα μια πληθώρα κυτταρικών αποκρίσεων. Επίσης το  $(PI(3,4,5)P_3)$  και τα άλλα προϊόντα των PI3 κινασών επηρεάζουν άλλους στόχους, όπως τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης Akt/PKB και PDK1 και την πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης BTK.

Τα φωσφοϊνοσιτιδία έχουν σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στην παραγωγή δεύτερων αγγελιαφόρων, όπως του 1,4,5 τριφωσφορικού και της διακυλογλυκερόλης, αλλά ρυθμίζοντας μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου την οργάνωση του κυτταροσκελετού και τη μεμβρανική κυκλοφορία.

### 1.7.1 Ρόλος του $PI(4,5)P_2$ στον πολυμερισμό και την ενδοκύττωση.

Πολλές κινάσες λιπιδίων ινοσιτόλης και φωσφατάσες ρυθμίζουν τη συγκέντρωση των φωσφατιδυλοϊνοσιτιδίων σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως αλλαγές στη 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτιδία ( $PI(4,5)P_2$ ) σε απόκριση εξωκυττάρων ερεθισμάτων αλλάζει την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και το σχήμα του κυττάρου.

Το  $PI(4,5)P_2$  ξεσκεπάζει το ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο της ακτίνης οδηγώντας προς τον πολυμερισμό. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες κυκλοφορίας διαμέσου των μεμβρανών. Στην ενδοκύττωση το  $PI(4,5)P_2$  κατευθύνει τις σχετιζόμενες με την κλαθρίνη πρωτεΐνες στη δημιουργία κυστιδίων, ώστε να σχηματιστεί το καλυπτόμενο από την κλαθρίνη σώμα, ενώ το  $PI(4,5)P_2$  θα πρέπει να αποφωσφορυλιωθεί όταν πρέπει να ακολουθήσει η διάχυση στα ενδοσώματα.

### 1.8 Οι $p21^{Rac/Cdc42}$ - ενεργοποιημένες κινάσες (PAKs).

Η οικογένεια των  $p21$  κινασών (PAKs) περιλαμβάνει τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης Rac/Cdc42 των θηλαστικών. Η οικογένεια περιλαμβάνει τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές, που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο σε ιστούς θηλαστικών. Οι κινάσες αυτές περιέχουν ένα καλά συντηρημένο τμήμα κινάσης και το αμινο-τελικό του ρυθμιστικό τμήμα. Η καταλυτική τους ικανότητα ελέγχεται από τη σύνδεση των Rac ή Cdc42 σε μια αρκετά συντηρημένη περιοχή στο άμινο-τελικό άκρο, γνωστό ως  $p21$  PBD (P21-binding domain) ή το τμήμα σύνδεσης και αλληλεπίδρασης των Cdc42/Rac, γνωστό ως CRIB : Cdc42/Rac interactive binding domain. Η σύνδεση αυτή φαίνεται να επάγει αλλαγές στη στερεοδιάταξη των PAKs, ώστε να εξαλείφεται το ανασταλτικό αποτέλεσμα στο καταλυτικό καρβόξυ-τελικό άκρο, μετά από φωσφορυλίωση σε αρκετές θέσεις και επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση εξωγενών υποστρωμάτων.

Το καταλυτικό τμήμα εμφανίζεται αρκετά συντηρημένο ανάμεσα στις διάφορες ισομορφές των PAKs. Το άμινο-τελικό ρυθμιστικό τμήμα περιέχει πέρα από το PBD, τέσσερις ή πέντε πλούσιες σε κατάλοιπα προλίνης περιοχές, που αποτελούν σημεία σύνδεσης με τα τμήματα SH3. Το καρβόξυ-τελικό τμήμα περιέχει, όπως έχει αποδειχτεί από μελέτες στο *Saccharomyces cerevisiae*, μία περιοχή υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των PAKs του yeast και των υπομονάδων  $\beta\gamma$  των ετεροτριμερών των G -πρωτεϊνών. Αν και αυτή η αλληλεπίδραση δεν έχει παρατηρηθεί στα κύτταρα των θηλαστικών έχει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον, αφού οι υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με τις G πρωτεΐνες προσδίδουν ενεργότητα στην PAK (14). Επίσης η πολυσύνθετη τους δομή κάνει τις PAKs κατάλληλες για την αλληλεπίδραση με άλλα στοιχεία του μονοπατιού, πέρα από τις Rac και Cdc42 (Daniels et al., 1999).

## 1.9 Οι συνδεδεμένες με τις εστίες πρόσφυσης κινάσες, στα καρκινικά κύτταρα.

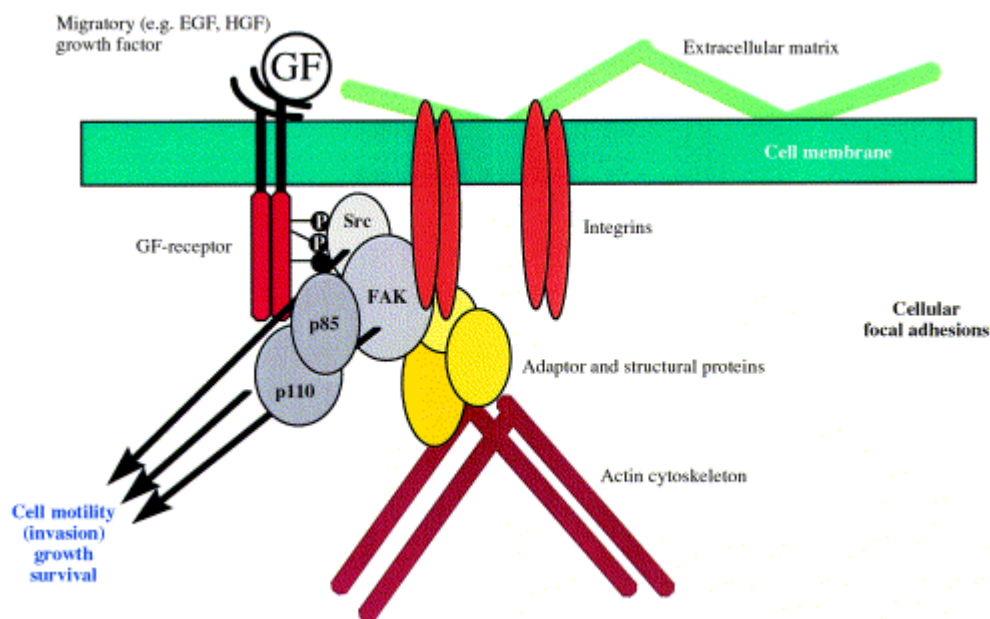
Στην προσπάθεια μελέτης του σύνθετου μονοπατιού στη μετάδοση του μηνύματος στα καρκινικά κύτταρα αξίζει να δοθεί έμφαση στη μεσολάβηση των κινασών Src, των εστιών πρόσφυσης (Focal Adhesion Kinases: FAK) και της κινάσης 3 της Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI-3).

### 1.9.1 Η οικογένεια των Src.

Η οικογένεια Src κινασών της τυροσίνης εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως τη μετάσταση του καρκίνου, καθιστώντας την ένα δυναμικό στόχο για παραπέρα μελέτη. Η οικογένεια αυτή των πρωτεϊνών εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα στις περιοχές των ιντεγκρινών του κυττάρου και στις περιοχές πρόσφυσης -μέσω των καδερινών-στα επιθηλιακά κύτταρα. Στην ανενεργή μορφή η Src εντοπίζεται στην περιπυρηνική περιοχή του κυττάρου, πιθανώς συνδεδεμένη με τις μεμβράνες των ενδοσωμάτων. Η ενεργοποίηση και η μετατόπιση της Src από το κυτταρόπλασμα στην περιφέρεια του κυττάρου απαιτεί την ελεγχόμενη οργάνωση του κυτταροσκελετού από την οικογένεια Rho των μικρών G πρωτεϊνών.

Ανάμεσα στα υποστρώματα είναι το ίδιο το Src (αυτοφωσφορυλιώνεται στην τυροσίνη 416), η p85 ρυθμιστική υπομονάδα της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 (PI3-Κινάση) και η κινάση των εστιών πρόσφυσης FAK. Τα υποστρώματα αυτά

### Σχήμα 1. Η μετάδοση σήματος μέσω των ιντεγκρινών σε ένα καρκινικό κύτταρο.



συνδέονται με το Src μέσω των ομόλογων με το Src τμημάτων, SH3 και SH2, που αλληλεπιδρούν με περιοχές πλούσιες σε αλληλουχίες προλίνης και φωσφοτυροσίνης αντίστοιχα στις πρωτεΐνες αυτές. Το καρβόξυ τελικό κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr527), είναι κρίσιμης σημασίας στη ρύθμιση της ενεργότητας της Src. Όταν το κατάλοιπο αυτό είναι φωσφορυλιωμένο η Src αλλάζει διαμόρφωση, ώστε το κατάλοιπο τυροσίνης 527 να αλληλεπιδρά με το τμήμα SH2 και η πρωτεΐνη Src να είναι ανενεργή.

Αντίθετα η Src ενεργοποιείται με σύνδεση στους υποδοχείς κινασών τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases: RTKs) και λαμβάνει μέρος στη μετάδοση του μηνύματος (σχήμα 1). Η οικογένεια των Src μπορεί να ενεργοποιηθεί επίσης με επαφή με την εξωκυττάρια ουσία (ExtraCellular Matrix : ECM), από τους υποδοχείς των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες σχηματίζουν υποομάδες από εστίες πρόσφυσης και είναι υπεύθυνες για την πρόσέγγιση της ουσίας στα κύτταρα. Αν και η οικογένεια των Src πρωτεϊνών δεν θεωρείται απαραίτητη για τη μετάδοση του εξωτερικού, μέσω των ιντεγκρινών σήματος, σύμφωνα με τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία, η Src είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία των εστιών πρόσφυσης που απαιτούνται για τη μετακίνηση των κυττάρων σε συνδυασμό με τη FAK. Ο ρόλος αυτός της Src στη διαδικασία της μετακίνησης των κυττάρων είναι μια οδός με την οποία επηρεάζει τη μετάσταση του καρκίνου. Στα επιθηλιακά κύτταρα η οικογένεια των κινασών Src εντοπίζεται με τις E-καδερίνες στις προσφύσεις των κυττάρων και επομένως αναστολείς της καταλυτικής ενεργότητας της Src μειώνει την απελευθέρωση των E-καδερινών από τα καρκινικά κύτταρα του κολοναίου από το επιθήλιο και την εξαρτώμενη από το ECM μετάσταση του καρκίνου *in vitro* (Jones et al., 2000).

Τα γεγονότα κατά τη μετάδοση του μηνύματος, μετά την ενεργοποίηση των Src έχουν σημαντικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη κακοηθιών, συμπεριλαμβανομένου την αύξησης του μεγέθους των κυττάρων, της επιβίωσής τους και της μετάστασης. Παίζουν ένα ρόλο στη μεταγωγή σήματος που οδηγεί στην επιβίωση των κυττάρων, πιθανώς ελεγχόμενες από το μονοπάτι της PI3-κινάσης/Akt. Συγκεκριμένα ίσως οι Src να συνδυάζουν την ενεργοποίηση των υποδοχέων των λυμφοκινών με την αναστολή της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης της Akt/ PKB (Protein Kinase B), υποδηλώνοντας έναν άλλο τρόπο με το οποίο μπορεί η Src να επηρεάσει την αγγειογένεση και κατ' επέκταση την ανάπτυξη όγκων.

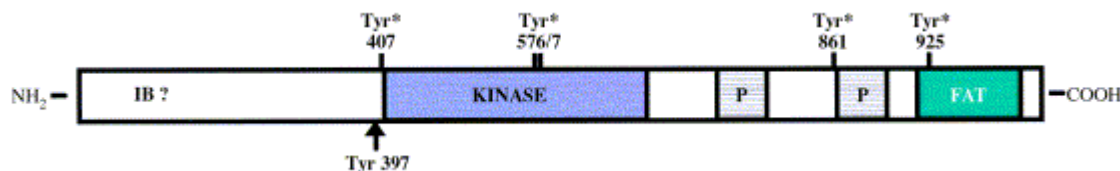
### 1.9.2 Η κινάση των εστιών πρόσφυσης, FAK.

Η Fak ανακαλύφθηκε στην αρχή της δεκαετίας του 1990, ως μια φωσφορυλιωμένη σε τυροσίνη πρωτεΐνη σε μετασχηματισμένα κύτταρα. Επίσης έχει εντοπιστεί στην πλευρά των κυτταρικών προσφύσεων, όπου σχηματίζουν κλειστές δομές οι ιντεγκρίνες. Η δομή της διαφέρει από τις άλλες κινάσες τυροσίνης στο γεγονός ότι δεν περιέχει SH τμήματα στις μη καταλυτικές της περιοχές (σχήμα 2). Η FAK περιέχει ένα κεντρικό καταλυτικό τμήμα με μία μεγάλη αμινο-τελική περιοχή που περιέχει την β1 θέση σύνδεσης με τις ιντεγκρίνες και μία καρβόξυ-τελική περιοχή που περιέχει αρκετά σημεία αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου δύο τμημάτων με κατάλοιπα προλίνης που μπορούν να συνδεθούν με την p130<sup>CAS</sup> ή την ενεργοποιημένη από Rho-GTPase πρωτεΐνη Graf. Επίσης το καρβόξυ-τελικό τμήμα της FAK περιέχει αλληλουχίες υπεύθυνες για το στόχο της, τι εστίες πρόσφυσης, (τμήμα FAT: Focal Adhesion Targetting ), ενώ αυτές αλληλεπικαλύπτονται με αλληλουχίες που συνδέονται με την παξιλλίνη (Jeffrey et al., 1999). Η σύνδεση της παξιλλίνης με την FAK φέρει το μέγιστο ποσοστό φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα στην προσκόλληση των κυττάρων καθώς και η FAK μπορεί να κατευθύνει τη φωσφορυλίωση της παξιλλίνης στη διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων από το Src ογκογονίδιο.

Η ενεργοποιημένη FAK με φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr-397), έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητα κινάσης μετά από δέσμευση των ιντεγκρινών. Ένα μοντέλο έχει προταθεί, μέσω του οποίου η επαγόμενη από τις ιντεγκρίνες φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο τυροσίνης προξενεί μεγάλη συγγένεια για την οικογένεια Src των κινασών, μέσω των τμημάτων SH2 και τη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3 κινάσης. Επίσης ρυθμίζει την απαιτούμενη μεσολάβηση των

ιντεγκρινών για την ενεργοποίηση του αυξητικού παράγοντα των MAP κινασών (Jones et. al., 2000).

**Σχήμα 2. Δομή της FAK.**



Το γεγονός ότι η FAK συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια σχετιζόμενα με την προσκόλληση των κυττάρων και την ογκογένεση, υποδηλώνει ότι μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη όγκων. Αυτό επιβεβαιώνουν σύγχρονες μελέτες για τη συμπεριφορά του κυττάρου και τις κυτταρικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένων της δυναμικής ρύθμισης των εστιών πρόσφυσης από τις ιντεγκρίνες, την κινητικότητα και την επιβίωση των κυττάρων.

Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η FAK μέσω των ιντεγκρινών ρυθμίζει το μονοπάτι της επιβίωσης. Η έκφραση της ενεργοποιημένης FAK εμποδίζει τα MDCK κύτταρα από τη διαδικασία της απόπτωσης, μετά την αποκόλληση από την εξωκυττάρια ουσία (anoikis). Επίσης μειωμένη έκφραση της FAK, με τη χρήση antisense ολιγονουκλεοτιδίων, σε κύτταρα όγκων ή έκφραση της dominant negative της FAK πρωτεΐνης, καταλήγει σε αποκόλληση των κυττάρων και απόπτωση. Κατά την επαγόμενη από διάφορα ερεθίσματα απόπτωση έχει παρατηρηθεί επίσης αποκλεισμός της FAK από τις πρωτεάσες των κασπασών σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Όλα αυτά υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο της FAK στις αποφάσεις των κυττάρων για θάνατο ή επιβίωση, ανάλογα με τα ερεθίσματα κάθε φορά.

Το γεγονός ότι η FAK εμφανίζεται σε καρκινικές σειρές από ανθρώπινο μελάνωμα, πρωτοταγές ανθρώπινο σάρκωμα, προστάτη, μαστό, όγκους του κολοναίου, του προστάτη και των μαστών και καρκινώματα μήτρας υποδηλώνει το ρόλο της FAK στην μετακίνηση των κυττάρων και τη μετάσταση των όγκων *in vivo*. Αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη θεώρησης της FAK ως αντικαρκινικό στόχο.

### **1.9.3 Η κινάση της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3, PI3 K.**

Η οικογένεια των PI3 Κινασών καταλύει τη μεταφορά της ομάδας ATP στη D3 θέση των φωσφοϊνοσιτιδίων. Ανάλογα με συγκεκριμένο υπόστρωμα οι PI3 κινάσες χωρίζονται σε τρεις τάξεις και επειδή η πρώτη σχετίζεται με την ογκογένεση αυτή μόνο θα αναλυθεί περισσότερο. Για λόγους απλότητας θα χρησιμοποιείται ο όρος PI3, που θα αναφέρεται στην τάξη I των PI 3 κινασών.

Η PI-3 κινάση φωσφορυλιώνει τα λιπίδια ινοσιτόλης στην 3' θέση του δακτυλίου της ινοσιτόλης παράγοντας το PI 3 φωσφορικό (PI(3)P), PI 3,4-διφωσφορικό (PI (3,4) P<sub>2</sub>) και το PI 3,4,5-τριφωσφορικό (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) φωσφοϊνοσιτιδίο. Αυτά τα προϊόντα λιπιδίων περιλαμβάνονται σε μια πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών, όπως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επιβίωση, την επανοργάνωση του κυτταροσκελετού και την κυκλοφορία διαμέσου των μεμβρανών.

Η PI-3 κινάση είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από τη ρυθμιστική υπομονάδα p85 και την καταλυτική p110. Η ρυθμιστική υπομονάδα περιέχει δύο τμήματα SH2 και ένα SH3, που κατευθύνουν τη σύνδεση πρωτεϊνών που μεταφέρουν μηνύματα, συμπεριλαμβανομένου των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και των



ογκογονιδίων, όπως οι Src και Abl, μετά από ενεργοποίηση με σύνδεση των υποδοχέων είτε μετά από ενεργοποίηση των μεταλλάξεων στις πρωτεΐνες όπως τη Src. Για το λόγο αυτό αξίζει να διερευνηθεί περισσότερο ο ρόλος της PI3 στο μετασχηματισμό των κυττάρων και την ανάπτυξη των όγκων.

Με μελέτης δέσμευσης της ρυθμιστικής υπομονάδας P85 με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, έχει βρεθεί ότι η PI3 είναι μια κινάση των εστιών πρόσφυσης. Πρόσφατες πληροφορίες επίσης δείχνουν ότι είναι ρυθμιστής του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα θηλαστικών, με πρωταρχικούς ρυθμιστές την οικογένεια Rho των μικρών GTPασών, που περιλαμβάνει τις Rho, Rac και Cdc42. Σε μετασχηματισμένα από το ογκογονίδιο Ras κύτταρα ινοβλαστών, η PI3 κινάση είναι απαραίτητη για την επαγόμενη λόγω Ras επαναδιευθέτηση του κυτταροσκελετού, ενώ στα επιθηλιακά κύτταρα οι Cdc42 και Rac επάγουν την -εξαρτώμενη μέσω ιντεγκρινών- PI3 ρυθμιζόμενη κινητικότητα και μεταστατικότητα (Jones et. al., 2000).

### 1.9.3.1 Ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης και επιβίωση.

Η ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης είναι το αποτέλεσμα της σύνδεσης με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς κινασών τυροσίνης, των συζευγμένων με τις G πρωτεΐνες υποδοχέων ή των ιντεγκρινών. Επίσης είναι δυνατόν να συμβεί και η ανεξάρτητη από τη μεσολάβηση υποδοχέων, όπως σε κύτταρα που εκφράζουν τις Ras πρωτεΐνες και αφού οι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων συνήθως υπερεκφράζονται ή ενεργοποιούνται σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων, η επίδραση κάποιου ερεθίσματος έχει ως συνέπεια την αφετηρία ενός σηματοδοτικού μονοπατιού. Ένα από τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα είναι η κινάση τυροσίνης erbB2 που υπερεκφράζεται σε πολλά είδη καρκίνου και σε μερικά συσχετίζεται με την erbB3. Επειδή η erbB3 έχει επτά φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης που δρουν στις πλευρές σύνδεσης SH2 της ρυθμιστικής υπομονάδας p85 της PI3 κινάσης, τα διμερή erbB2-erbB3 ενεργοποιούν ισχυρά το μονοπάτι των PI3K-PKB/Akt. Με αφορμή αυτό μελετάται το μονοπάτι της PKB/Akt στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση σε κύτταρα που υπερεκφράζουν το erbB2.

Σε μετασχηματισμένα κύτταρα από ογκογονίδια, όπως τα Ras και Src τα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να αναπύσσονται και να επιβιώνουν. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στους όγκους, στην πραγματικότητα η ικανότητα των κυττάρων να υπόκεινται σε μετάσταση εξαρτάται σε μεγάλο ποσοστό από την ικανότητα επιβίωσης. Η ενεργότητα της PI3 κινάσης απαιτείται για την εξαρτώμενη μέσω των αυξητικών παραγόντων επιβίωση και οι ενεργοποιημένες μορφές της PI3 μπορούν να προστατεύσουν τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο μετά από αποκόλληση από την ECM (Jones et. al 2000). Τα αποτελέσματα αυτά της PI3 κινάσης ρυθμίζονται διαμέσου του μορίου Akt, επίσης γνωστό ως πρωτεϊνική κινάση B (Nicholson et. al., 2002).

### 1.9.3.2 PI3 και νεοπλασία

Κατά την τελευταία δεκαετία σχετικά με την έρευνα που έχει γίνει γύρω από τον καρκίνο κεντρική σημασία κατέχει το ογκογονίδιο Ras, το πρώτο ταυτοποιημένο ογκογονίδιο στη νεοπλασία. Στην προσπάθεια αντιμετώπισης της νεοπλασίας μέσω του μονοπατιού των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης (RTKs), συμπεριλαμβάνεται η κινάση της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης-3, η PI3 κινάση, που έχει έρθει στο προσκήνιο ως πρώτος ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα θηλαστικά.

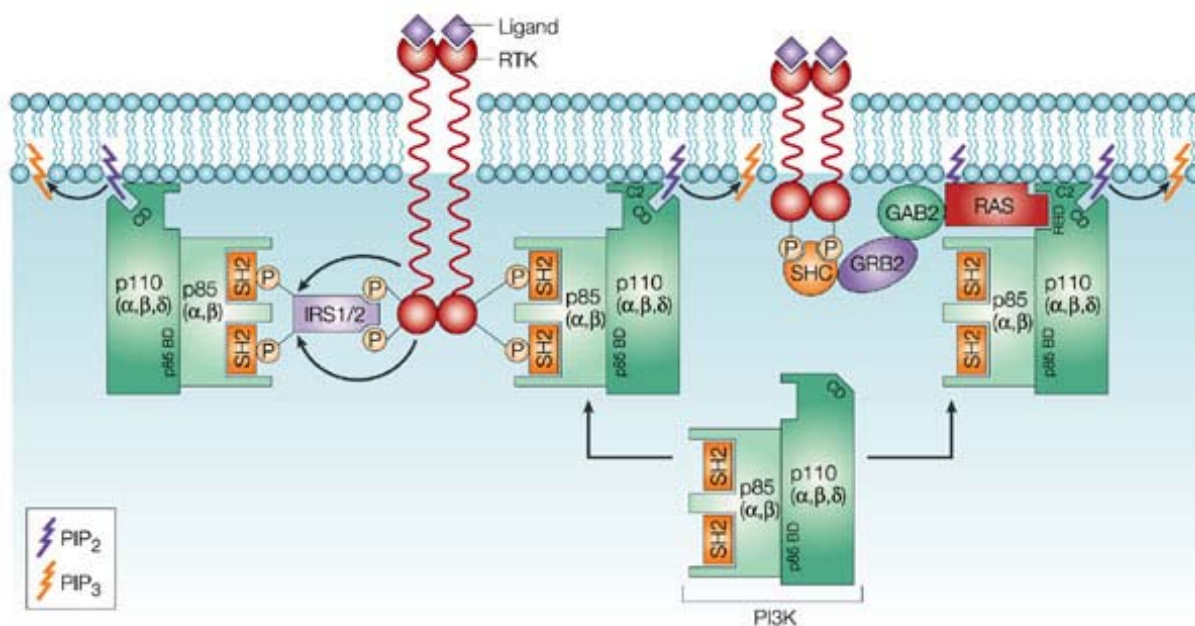
Από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 έγινε φανερό ότι η ενεργότητα της PI3 ήταν λειτουργικά συνδυασμένη με την ικανότητα των ικών ογκογονιδίων να μετασχηματίζουν τα κύτταρα. Από τις μοριακές μελέτες έχει γίνει γνωστό ότι οι PI3

κινάσες είναι ετεροδιμερή, όπου η ρυθμιστική τους υπομονάδα p85 αποτελεί το υπόστρωμα για πολλές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και κινάσες υποδοχέων τυροσίνης, μέσω του τμήματος SH2 με αλληλεπίδραση με τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης της κινάσης. Σε άλλες περιπτώσεις η αλληλεπίδραση p85-RTK είναι έμμεση και συμβαίνει μέσω φωσφοπρωτεϊνών, όπως του υποδοχέα ινσουλίνης.

Η οικογένεια των PI3 κινασών περιλαμβάνει τρεις τάξεις μορίων, και επειδή, όπως προαναφέρθηκε, η πρώτη σχετίζεται με την ογκογένεση αυτή μόνο θα αναλυθεί περισσότερο. Η τάξη I της PI3, καταλύει τη φωσφορυλίωση των λιπιδίων ινσιτιόλης γνωστών ως φωσφατιδυλοϊνσιτιόλες (PtdIns) στη θέση 3-OH, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Η τάξη I χωρίζεται σε δύο υποομάδες τις IA και IB οι οποίες μεταφέρουν μηνύματα από τις κινάσες τυροσίνης και τις συνδεδεμένες πρωτεΐνες με τους υποδοχείς των G πρωτεϊνών, αντίστοιχα.

Η καταλυτική υπομονάδα p110 περιέχει τα τμήματα αλληλεπίδρασης της p85 με το RAS και είναι στενά συνδεδεμένη με διάφορους μηχανισμούς. Η επικρατούσα άποψη λέει ότι το προσχηματισμένο ανενεργο σύμπλοκο p85-p110 κείται στο κυτταρόπλασμα και όταν έρθει το ερέθισμα, όπως στην περίπτωση των RTKs, την ενεργοποίηση των κινασών και τη φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής ουράς των RTKs, ακολουθεί η επαναδιευθέτηση του συμπλόκου στον υποδοχέα με αλληλεπίδραση του τμήματος SH2 της p85 με τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης του RTK, ή τα ενδιάμεσα IRS1/IRS2 σε μερικές περιπτώσεις (Vivanco et.al., 2002). Επομένως η PI3 ενεργοποιείται για δύο λόγους: α) η καταλυτική υπομονάδα έρχεται πλησιέστερα στο λιπιδικό της υπόστρωμα στην μεμβράνη του κυττάρου και β) η αλληλεπίδραση RTK-p85 απελευθερώνει το ανασταλτικό αποτέλεσμα της p85 στην ενεργότητα κινάσης της p110, ίσως με τις αλλαγές στη διαμόρφωση του συμπλόκου p85-p110 και η οποία είναι ελεύθερη να μετατρέψει τα PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) σε PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>). Εναλλακτικά η σύνδεση της PI-3K με το ενεργοποιημένο RAS, μπορούν να τη σταθεροποιήσουν στη μεμβράνη και να ενεργοποιήσουν την καταλυτική περιοχή της PI3, την p110, (σχήμα 3).

Σχήμα 3. Μοντέλο ενεργοποίησης της PI3 κινάσης.

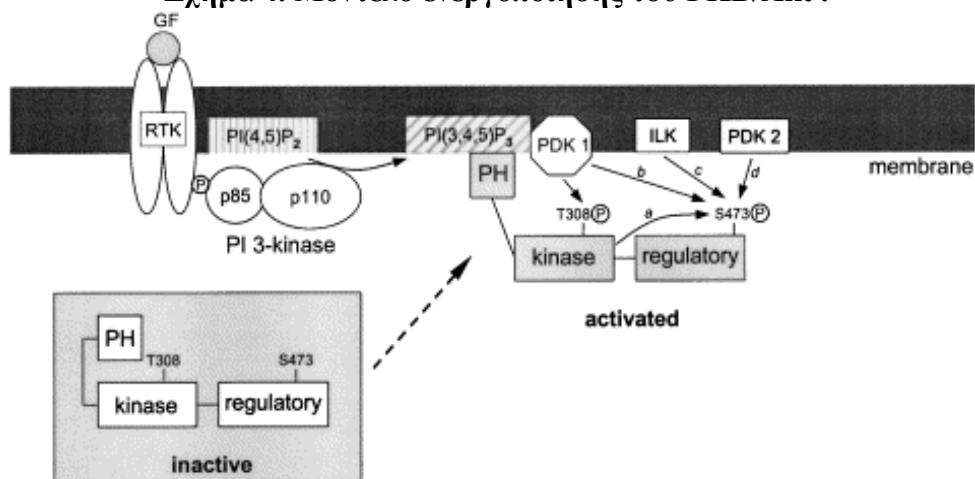


φωσφατασών, όπως της PTEN που αφαιρεί τη φωσφορική ομάδα από τη θέση 3-OH και της SHIP που αποφωσφορυλιώνει αντίστοιχα την 5-OH θέση.

Η PIP3 δεν ενεργοποιεί άμεσα το PKB/Akt, αλλά το μετατοπίζει προς την πλασματική μεμβράνη και του αλλάζει τη διαμόρφωση, ώστε να επιτρέψει τη φωσφορυλίωση του από την PDK-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1), στο περιβάλλον των λιπιδίων. Η ενεργοποίηση του PKB/Akt συμβαίνει διαμέσου της σύνδεσης του PI(3,4)P<sub>2</sub> ή του PI(3,4,5)P<sub>3</sub> στην περιοχή PH (pleckstrin homology), που έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του Akt προς την πλασματική μεμβράνη, ώστε το δεύτερο μόριο πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης, το (PDK)1, που περιέχει επίσης ένα τμήμα PH σύνδεσης με τα φωσφοινοσιτίδια να φωσφορυλιώνει το PKB/Akt στο κατάλοιπο τυροσίνης T308, (σχήμα 4). Η φωσφορυλίωση του Akt από το PDK1 στην πλασματική μεμβράνη είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του Akt, αν και για την πλήρη ενεργοποίηση απαιτείται η φωσφορυλίωση σε ένα δεύτερο καταλοίπο του Akt, το S473, στην ουρά της ρυθμιστικής του υπομονάδα από μία κινάση, όπου ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται είναι ακόμα αδιευκρίνιστος.

### 1.10 Δομή και ρύθμιση του PKB/Akt.

Σχήμα 4. Μοντέλο ενεργοποίησης του PKB/Akt .



Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του PKB/Akt απαιτεί τη φωσφορυλίωση δύο ακόμα καταλοίπων τυροσίνης, Y315 και Y326, ενώ υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι αυτές οι τροποποιήσεις εξαρτώνται από την οικογένεια των Src κινάσων τυροσίνης. Αν επιβεβαιωθεί ότι τα ευρήματα αυτά προσθέτουν νέα στοιχεία στην πολυπλοκότητα της ρύθμισης του PKB/Akt, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στα καρκινικά κύτταρα, όπου η οικογένεια των Src υπερεκφράζεται (Nicholson et al., 2002).

Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι στόχοι του Akt, ως συστατικά της "αντι-αποπτωτικής μηχανής", όπως το μέλος BAD της οικογένειας Bcl-2 και το ένζυμο του κυτταρικού θανάτου, η κασπάση 9 (Dattab et al). Η Akt προάγει την επιβίωση με απευθείας σύνδεση με τους κύριους ρυθμιστές της απόπτωσης. Το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα είναι αυτό της BAD, που προάγει την απόπτωση μετά από σύνδεση και ανταγωνισμό με τα μέλη της οικογένειας που προάγουν την επιβίωση, τα Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub>. Η PKB/Akt φωσφορυλιώνει τη BAD στο κατάλοιπο S136, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τις Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub> στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι ο αλληλοεξαρτώμενος αυτός τρόπος

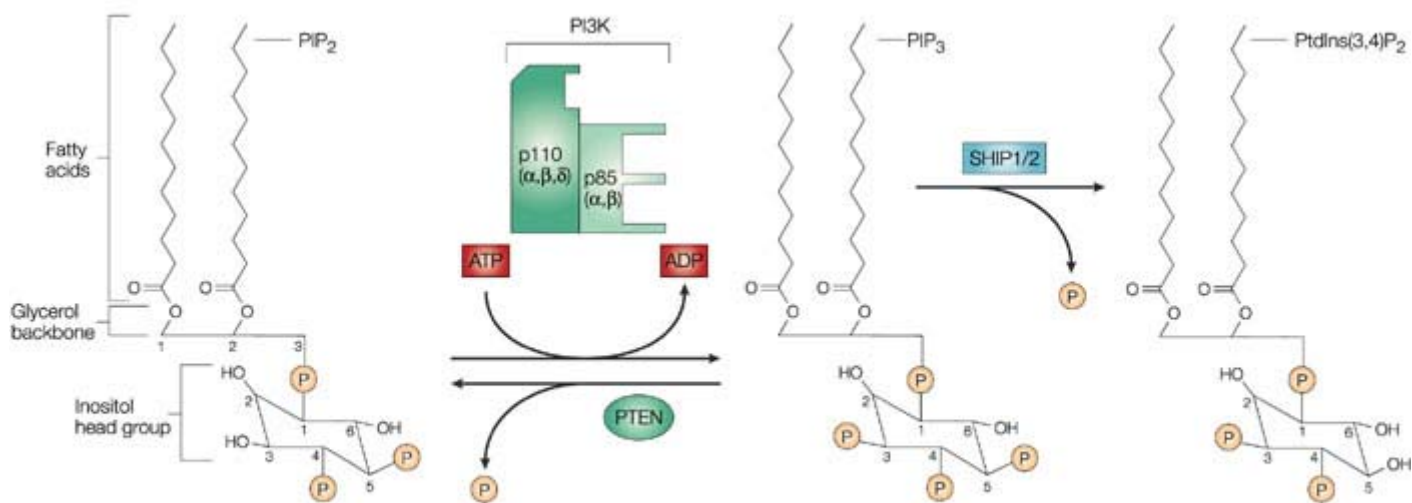
δράσης των BAD- Bcl-2 Bcl- X<sub>L</sub> δεν απαντάται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Επίσης η δράση του Akt εντοπίζεται και μετά την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, κατά την πορεία των κασπασών, που χαρακτηρίζει της τελευταία φάση της αποπτωτικής διαδικασίας και σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες το PKB/Akt αναστέλει την ενεργοποίηση των κασπασών με τροποποίηση ενός ακόμα άγνωστου κυτταροπλασματικού παράγοντα (Nicholson et. 2002).

### 1.11 PIP<sub>3</sub> Φωσφατάσες.

Ο παράγοντας PTEN (γνωστός και ως MMAC1 ή TEP1) είναι μια πρωτεϊνική και λιπιδική φωσφατάση που αρχικά ταυτοποιήθηκε ως ογκοκατασταλτικό ογκογονίδιο, ενώ συχνά μεταλλάσσεται κατά τα πρώιμα στάδια καρκίνου του ανθρώπου, κυρίως σε γλιοβλαστώματα, καρκίνο του ενδομητρίου και του προστάτη καθώς και στο σύνδρομο της ασθένειας του Cowden. Τα ευρήματα από διάφορες μελέτες δείχνουν ότι ο PTEN δρα ως καταστολέας των όγκων, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των κυττάρων και καθοδηγώντας προς την απόπτωση και τη διαδικασία απόπτωσης των κυττάρων μετά από την απώλεια της επαφής με την εξωκυττάρια ουσία (anoikis). Το κύριο φυσιολογικό του λιπιδικό υπόστρωμά είναι το PIP<sub>3</sub>, το προϊόν της PI3 κινάσης. Ο PTEN αφαιρεί τη φωσφορική ομάδα από τη θέση 3-OH και επομένως δρα αρνητικά στο μονοπάτι της PI3 κινάσης.

Ένα άλλο μοριο που καταστέλλει τη δράση της PIP<sub>3</sub> είναι η SHIP με το χαρακτηριστικό τμήμα SH2 των φωσφατασών των ινσοτολών που αποφωσφορυλιώνει την 5' θέση, με παρατηρούμενη σε πολλές περιπτώσεις απενεργοποίηση του PKB/Akt. Αν και δεν έχει αναφερθεί απώλεια των φωσφατασών SHIP ή SHIP2 σε ανθρώπινους όγκους, οι μελέτες υποδηλώνουν ότι θα είχαν σημαντικές συνέπειες οι τροποποιήσεις των φωσφατασών αυτών στο μονοπάτι PKB/Akt και για το λόγο αυτό θα πρέπει να διερευνηθούν (Nicholson et. al., 2002).

Σχήμα 5. Ρόλος των PI3K, PTEN και SHIP1/2.



#### 1.11.1 Ο ρόλος του PTEN στις διαδικασίες της απόπτωσης.

Η απουσία του PTEN σχετίζεται με την ισχυρή ενεργοποίηση του PKB/Akt σε καρκινικές σειρές όγκων, ενώ επανέκφραση του παράγοντα PTEN, μειώνει τα επίπεδα

φωσφορυλίωσης του PKB/Akt και των κυτταρικών του υποστρωμάτων, όπως της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAD. Αν και δεν έχει διευκρινιστεί ακριβώς το μονοπάτι από τα PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, και το Akt, ένα ενδιάμεσο φαίνεται να είναι οι συνδεδεμένες με τις ιντεγκρίνες κινάσες (ILK), που ενεργοποιούν την PDK-2 (Persad et al., 2000).

Επίσης ο PTEN παρουσιάζει μια ασθενή ενεργότητα φωσφατάσης της τυροσίνης, καταστέλλοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την κινάση των εστιών πρόσφυσης FAK ή τη Shc. Η μεταγωγή σήματος μέσω της FAK ενεργοποιείται από τις ιντεγκρίνες και άλλους υποδοχείς και συνδέεται με την μετανάστευση των κυττάρων και άλλες κυτταρικές λειτουργίες, ενώ το μονοπάτι των Sch ενεργοποιείται από υποδοχείς που περιέχουν υποδοχείς κινασών τυροσίνης και ιντεγκρινών, με τελικό στόχο την ενεργοποίηση των ERK MAP κινασών. Αν και ο κύριος στόχος του PTEN είναι τα 3,4,5 τριφωσφορικά φωσφοϊνοσιτίδια, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> και όχι η FAK, παροδικές αλλαγές στα επίπεδα του PTEN έχουν επίδραση στην ενεργότητα των FAK/Sch.

Μελέτες που στόχο έχουν τον έλεγχο των γονιδίων δείχνουν ότι τα επίπεδα PTEN που παρουσιάζονται σε έμβρυα και ενήλικες είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ομαλή τους ανάπτυξη. Ο PTEN εμπλέκεται σε μια πληθώρα κυτταρικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως την ανάπτυξη, την προσκόλληση, τη μετανάστευση, τη μετάσταση και την απόπτωση. Ο ρόλος του PTEN στην απόπτωση είναι αρκετά ξεκάθαρος, αφού επανέκφραση του σε μερικές κυτταρικές σειρές επάγει άμεσα την απόπτωση, μετά από την επίδραση του αντίστοιχου ερεθίσματος. Επίσης ιδιαίτερο ρόλο παίζει στη διαδικασία της ανοικίς (την απόπτωση των κυττάρων μετά από την απώλεια της επαφής με την εξωκυττάρια ουσία) και της μετανάστευσης των κυττάρων. Η διαδικασία αυτή είναι συνδεδεμένη με τη FAK. Τα επίπεδα της FAK παρουσιάζονται αυξημένα σε κύτταρα όγκων, ενώ αυτό βοηθάει τα κύτταρα αυτά να αποφύγουν τη διαδικασία απόπτωσης γνωστή ως (ανοικίς) (Yamada et al.).

Ο ρόλος της FAK στην ανοικίς θα πρέπει να περιλαμβάνει την ικανότητά της να αυξάνει τα επίπεδα των PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, ενδυναμώνοντας την ενεργότητα της PI-3 κινάσης (Tamura et al., 1999a). Αποφωσφορυλίωση της FAK (του καταλοίπου Tyr397) από τον PTEN ενδυναμώνει τα αποτελέσματα του PTEN στα PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> αφού φωσφορυλίωση της FAK επάγει την ενεργότητα της PI-3 κινάσης.

Συνοψίζοντας θα πρέπει να τονιστεί ότι η μειωμένη έκφραση της PI3 κινάσης σε συνδυασμό με τη μείωση των επιπέδων PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> από τον PTEN, εμποδίζει την ενεργοποίηση του Akt και επάγει την απόπτωση.

### **1.11.2 Ο ρόλος του PTEN στην προσκόλληση, μετανάστευση και μετάσταση.**

Η υπερέκφραση του PTEN σχετίζεται με αναστολή της μετανάστευσης των κυττάρων και καταστέλλει τη μετάσταση των όγκων. Ο μηχανισμός που ελέγχει τις επαφές πρόσφυσης που ρυθμίζονται από τον PTEN, έχει επίδραση στο μονοπάτι των FAK-p130<sup>CAS</sup> και επιλεκτικές συνέπειες στις εστίες πρόσφυσης που προξενούνται από τα επίπεδα των PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Ο PTEN καταστέλλει τη μετανάστευση των κυττάρων σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (Tamura et al., 1998), με μηχανισμούς που μέσω των PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> επηρεάζουν το μονοπάτι των GTPασών Rac και Cdc42. Η παρουσία παραγόντων που επάγουν την απόπτωση, όπως παράγοντα DCVC (Dichlorovinylcysteine) σε επιθηλιακά, νεφρικά κύτταρα, είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της επαφής του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία, που προκλήθηκε μετά από από τον αποχωρισμό της από τις εστίες πρόσφυσης και την αποφωσφορυλίωση της FAK. Επίσης και από την παξιλλίνη αποχώρησε η φωσφορική ομάδα από το κατάλοιπο τυροσίνης (Water et al., 1999). Η επίδραση του DCVC ενεργοποίησε την

κασπάση 3, παράλληλα με τον αποκλεισμό της FAK, αφού πρώτα τα κύτταρα είχαν χάσει τις εστίες πρόσφυσης. Βέβαια η αποφωσφορλίωση των FAK και παξιλλίνης, καθώς και η απώλεια των εστιών πρόσφυσης δεν ήταν το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κασπασών, αλλά ήταν απαραίτητες για την πρωτεόλυση της FAK και την αποκόλληση των κυττάρων.

### **1.12 Επίδραση εξωγενών παραγόντων στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.**

Από τα παραπάνω λοιπόν γίνεται φανερό ότι η δημιουργία των μικροϊνιδίων της ακτίνης δεν είναι μια απλή ισορροπία μονομερών/πολυμερών, αλλά αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαδικασία που επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες, καθώς και από ενδοκυττάρια αλλαγές. Η δυναμική αυτή ισορροπία είναι δυνατόν να μετατοπισθεί προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση μετά από επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως οπιοειδή, στεροειδείς ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες.

### **1.13 Τα οπιοειδή.**

Στις αρχές της δεκαετίας του '70, βιοχημικά δεδομένα έδειξαν ότι η δράση των αλκαλοειδών του οπίου (π.χ) μορφίνη επιτελείται μετά από πρόσδεση τους σε ειδικές θέσεις, τους οπιοειδείς υποδοχείς. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση ενδογενών ουσιών που θα δρούσαν μετά από τη σύνδεση σε αυτούς τους υποδοχείς. Έτσι άρχισαν οι έρευνες και απομονώθηκαν δύο πενταπεπτίδια μεθειονίνη-εγκεφαλίνη και η λευκίνη-εγκεφαλίνη και αργότερα ένας σημαντικός αριθμός ενδογενών πεπτιδίων, όπως οι ενδορφίνες, οι δυνορφίνες και οι νεο-ενδορφίνες. Εκτός από τα ενδογενή οπιοειδή υπάρχουν και οπιοειδή πεπτίδια που είναι συνθετικά (τα εξωγενή οπιοειδή πεπτίδια) καθώς και τα πεπτίδια με οπιοειδή δράση που προέρχονται από τη διάσπαση της  $\alpha$  και  $\beta$  καζεΐνης (καζομορφίνες) Η βιολογική δράση των οπιοειδών πεπτιδίων επιτελείται μετά από δέσμευσή τους σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς (Kampa et al., 1996).

#### **1.13.1 Οι καζομορφίνες**

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος και άλλες ζωικές αλλά και φυτικές πρωτεΐνες (αιμοσφαιρίνη, καζεΐνες, γλουτένη) αποτελούν πηγή αμινοξέων αλλά και επιπλέον βιολογικά ενεργών πεπτιδίων. Τα πεπτίδια αυτά αποτελούν προϊόντα της μερικής πέψης των παραπάνω πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν κύρια πηγή βιολογικά ενεργών πεπτιδίων όπως οι εξορφίνες (καζομορφίνες) φωσφοπεπτίδια και ανοσοπεπτίδια. Μεγάλο ποσοστό του γάλακτος (80% του γάλακτος των μηρυκαστικών και 40% του ανθρώπινου) καταλαμβάνουν οι καζεΐνες. Οι καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος διακρίνονται σε τέσσερα είδη την  $\alpha_{s1}$  καζεΐνη, τη  $\beta$  καζεΐνη, την  $\alpha_{s2}$  καζεΐνη και την  $\kappa$ -καζεΐνη, με τη σειρά που εντοπίζονται και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν. Τα πεπτίδια που προέρχονται από την  $\alpha$  ή  $\beta$  καζεΐνη έχει βρεθεί ότι συνδέονται με τους οπιοειδείς υποδοχείς στην καρκινική σειρά του μαστού και αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hatzoglou et al., 1996a).

#### **1.13.2 Οι υποδοχείς των οπιοειδών**

Πειράματα απομόνωσης και χαρακτηρισμού των οπιοειδών υποδοχέων αλλά και η κλωνοποίηση τους οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για διαμεμβρανικές υδρόφοβες πρωτεΐνες, με τρεις εξωκυττάρια και τρεις ενδοκυττάρια αγκύλες (loops), οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συζεύγνται με G πρωτεΐνες ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτου (Chen et. al., 1993). Από τα τρία είδη

υποδοχέων, μι, δέλτα και κάππα (μ, δ, κ), οι κάππα συνδέονται με μεγάλη συγγένεια με την αιθυλκετοκυκλαζοσίνη, από όπου πήραν και το όνομά τους, ενώ έχουν χαρακτηριστεί τρεις τύποι κάππα υποδοχέων στο ΚΝΣ και στο περιφερικό σύστημα.

Οι οπιοειδείς υποδοχείς, όπως αναφέρθηκε συζεύγνται με τις G πρωτεΐνες και η δράση τους εξαρτάται από τη δράση των πρωτεϊνών αυτών. Οι G πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις υπομονάδες τις α, β και γ. Ανεξάρτητα ποιες τρεις υπομονάδες συμμετέχουν στη δημιουργία της G πρωτεΐνης, η σύνδεση ενός αγωνιστή σε οπιοειδή υποδοχέα προκαλεί την αποδέσμευση GDP από την α υπομονάδα και ακολουθεί η δέσμευση ενός GTP (Hamm 1998). Η δέσμευση αυτή προκαλεί το διαχωρισμό των τριών υπομονάδων σε α-GTP και β-γ. Τόσο η α-GTP όσο και οι β-γ υπομονάδες ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μηνύματα. Η δράση των G πρωτεϊνών σταματά όταν με την ενδογενή GTP-άση δραστηριότητα της α υπομονάδας γίνει υδρόλυση του δεσμευμένου GTP σε GDP και ανόργανο φώσφορο και η α-GDP πλέον επανασυνδεθεί με τις β-γ υπομονάδες.

Ως σύστημα δεύτερου αγγελιαφόρου σημαντικό ρόλο παίζουν οι αδενυλικές κυκλάσες, μια οικογένεια ενζύμων που μετατρέπουν το ATP σε cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί μια σειρά από πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες ελέγχουν πολλές διαφορετικές διεργασίες από το μεταβολισμό έως τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της φωσφορυλίωσης (Tang and Gilman 1992). Μέσω των υποδοχέων (μ, κ, δ) προκαλείται αναστολή της συγκέντρωσης του cAMP (Law et al., 1983). Οι τρεις αυτοί υποδοχείς συνδέονται με διαύλους  $Ca^{2+}$  και  $K^+$  (North 1993). Επίσης η αλληλεπίδραση τους με τις φωσφολιπάσες C οι οποίες συμμετέχουν στην ανακύκλωση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης καθώς και η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση ίσως εμπλέκονται ως δεύτεροι αγγελιαφόροι στη λειτουργία του οπιοειδούς υποδοχέα (Childers 1991).

### 1.13.3 Ταυτοποίηση μιας νέας καζομορφίνης ( $\alpha_{S1}$ και το αμίδιό της)

Πέρα από τις καζεΐνες α, β, του γάλακτος των βοοειδών, μεγάλο μέρος αποτελούν και οι  $\alpha_S$  του γάλακτος. Το ανθρώπινο γάλα από τις  $\alpha_S$  καζεΐνες, περιέχει μόνο την  $\alpha_{S1}$  καζεΐνη, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή ύπαρξη πεπτιδίων με οπιοειδή δράση, προερχόμενα από την  $\alpha_{S1}$  καζεΐνη του ανθρώπινου γάλακτος. Πράγματι, από την πρωτοταγή δομή της  $\alpha_{S1}$  καζεΐνης ανιχνεύθηκε ένα πενταπεπτίδιο, η  $\alpha_{S1}$  καζομορφίνη με αλληλουχία Tyr-Val-Pro-Phe-Pro, που βρίσκεται στο καρβόξυλικό τμήμα της (156-162). Η αλληλουχία της  $\alpha_{S1}$  καζομορφίνης εμφανίζει ομοιότητες με ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια και με καζομορφίνες και έτσι μελετήθηκε η πιθανότητα τόσο η  $\alpha_{S1}$  καζομορφίνη όσο και το αμίδιό της να εμφανίζουν οπιοειδή δράση (Kampa et. al., 1996).

### 1.13.4 Δέσμευση στους υποδοχείς

Μελέτες δέσμευσης της  $\alpha_{S1}$  καζομορφίνης σε ειδικές θέσεις (υποδοχείς) των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα μαστού T47D, που φέρουν τους οπιοειδείς υποδοχείς ( $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$  και  $\delta$ ), και όπου τα οπιοειδή παρουσιάζουν κατασταλτική δράση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, έδειξαν ότι η  $\alpha_{S1}$  καζομορφίνη αναστέλλει τη δέσμευση διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών, ανάμεσα στους οποίους η τριτωμένη αιθυλκετοκυκλαζοσίνη ( $[^3H]$  EKC), αλληλεπιδρώντας με υψηλή συγγένεια και με τους τρεις υπότυπους των κάππα οπιοειδών υποδοχέων. Αντίστοιχη μελέτη σε μεμβρανικά παρασκευάσματα εγκεφάλου επιμύος έδειξε σημαντική, αλλά με χαμηλότερη συγγένεια δέσμευσης στους δέλτα και μι υποδοχείς (Kampa et. al., 1996).

Επίσης η επίδραση του αγωνιστή των οπιοειδών EKC, που δρα μέσω των  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ , υποδοχέων, ήταν η μεγαλύτερη ανάμεσα σε άλλους στην καταστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού σε τρεις καρκινικές σειρές του προστάτου, τις DU-145, DC3 και LNCaP (Kampa et. al., 1996). Επίσης παρατηρήθηκε αναστολή του εκκρινόμενου PSA, του ειδικού προστατευτικού αντιγονικού γονιδίου, ενώ η ανασταλτική αυτή δράση της EKC στην έκκριση του PSA έδειξε να οφείλεται στη δράση της στον κυτταροσκελετό. Ο λόγος μονομερούς προς πολυμερή ακτίνη (G/F) μειωνόταν υπό την επίδραση του EKC, ενώ επανερχόταν στα επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων με επώαση με DHT παρουσία EKC (Kampa et. al., 1996).

#### **1.14 Επίδραση των οπιοειδών στον κυτταροσκελετό.**

Τα οπιοειδή όπως είναι γνωστό αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων νεοπλασματικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων του μαστού (Kampa et. al., 1996). Οδηγούν επίσης σε παροδική αποδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης στα φυσιολογικά εγγύς νεφροσωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (OK: Opossum Kidney cells), (Papakonstanti et. al., 1998).

Επειδή στις αλλαγές του κυτταροσκελετού σημαντικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ακτίνη, αυτό έχει ως συνέπεια η αλλαγή στη δραστηριότητά τους να συνοδεύεται από μεταβολή των κυτταροσκελετικών δομών, με αποτέλεσμα τον πολυμερισμό ή αποπολυμερισμό των μικροϊνιδίων της ακτίνης (Koukouritaki et al., 1999a, Koukouritaki et al., 1999b, Papakonstanti et al., 2000). Η ενεργοποίησή τους μπορεί να σχετίζεται με φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωσή τους ή δέσμευση GTP στην περίπτωση των μικρών GTPασών της οικογένειας ras (Machesky L, Hall A, 1998).

Πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι τα επιθηλιακά κύτταρα από εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (OK cells opossum kidney cells), έχουν θέσεις δέσμευσης των  $\kappa_1$  υποδοχέων των οπιοειδών και της σωματοστατίνης και ότι τα οπιοειδή προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών (Hatzoglou et al., 1996c). Επίσης τα κύτταρα αυτά κατέχουν έναν καλά αναπτυγμένο κυτταροσκελετό και για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση των νευροπεπτιδίων στη δυναμική του κυτταροσκελετού των επιθηλιακών αυτών κυττάρων των νεφρών. Η έκθεση των κυττάρων στα οπιοειδή  $\alpha_{SI}$  καζομορφίνη και αιθυλκετοκυκλαζοσίνη είχε ως αποτέλεσμα τη γρήγορη αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η οποία παρατηρήθηκε από τη δόσοεξαρτώμενη μείωση του λόγου μονομερούς/ολική ακτίνη (G/Total), στο χρονικό διάστημα 15 λεπτά έως 2 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά ανατράπηκαν παρουσία του ανταγωνιστή των οπιοειδών διπρενορφίνη. Επίσης η επίδραση φαλασιδίνης, η οποία σταθεροποιεί τα ινίδια ακτίνης εμπόδιζε μερικώς την επαγώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη δράση των οπιοειδών.

Τα παραπάνω έκαναν φανερό το γεγονός ότι τα οπιοειδή δρουν μέσω των  $\kappa_1$  θέσεων σύνδεσης και προκαλούν αλλαγές στη δυναμική του πολυμερισμού της ακτίνης και την οργάνωση των μικροϊνιδίων στα κύτταρα OK, γεγονός που σχετίζεται με την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Papakonstanti et. al., 1998).

Μία ακόμα πιο πρόσφατη εργασία, στο εργαστήριο όπου εκπονήθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, στα κύτταρα OK, έδειξε ότι η επίδραση των οπιοειδών στις παραπάνω συνθήκες, επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης της PAK1, μέσω σύνδεσης του άμινο-τελικού ρυθμιστικού τμήματος της PAK1 (αα 67-150) με την ενεργοποιημένη PI-3. Αντίθετα δεν περιλαμβάνεται η ενεργοποίηση των ενδιάμεσων, Cdc42/Rac ή Akt, στην ενεργοποίηση της PAK1, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μικρές GTPάσες δεν περιλαμβάνονται στην αλληλεπίδραση PI-3-PAK1. Επίσης η αλληλεπίδραση αυτή ήταν υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της



ακτίνης και την ανακατανομή των μικροϊνιδίων της ακτίνης (Papakonstanti et al., 2002).

### 1.15 Ερευνητικό ερώτημα.

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν γίνεται φανερό ότι έχει μελετηθεί καλά το μονοπάτι μεταφοράς σήματος στα επιθηλιακά κύτταρα από εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (OK cells: opossum kidney cells), υπό την επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών  $\alpha_{SI}$  καζομορφίνη και αιθυλκετοκυκλαζοσίνη. Με αφορμή το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο εργαστήριο είχαν παρασκευαστεί σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι των μεταλλαγμένων OK και ότι αλλαγές στη δυναμική πολυμερισμού των μικροϊνιδίων της ακτίνης εμφανίζονται και σε νεοπλασματικά κύτταρα (Stourmaras et al., 1996), με παρατηρούμενη ανασταλτική επίδραση των οπιοειδών στον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων κυττάρων (Kampa et al., 1996), δημιουργήθηκε το έναυσμα για τη μελέτη της δράσης τους σε δύο ακόμα συστήματα:

1. Στους κυτταρικούς κλώνους των OK, που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη ακτίνη και θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποτελέσουν εργαλείο για τη διερεύνηση του ρόλου της δυναμικής ισορροπίας του πολυμερισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη μεταγωγή κυτταρικών μηνυμάτων και
2. Στα καρκινικά, μη μεταστατικά κύτταρα από εγγύς νεφροσωληναριακό ανθρώπινο επιθήλιο, Caki-2.

Με αφορμή τους παραπάνω διαθέσιμους μόνιμους κυτταρικούς κλώνους, έγινε η διερεύνηση της συμμετοχής του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους μεταλλαγμένους σταθερούς κυτταρικούς κλώνους των OK καθώς και των συνδεδεμένων με αυτήν πρωτεϊνών. Αρχικά θελήσαμε να ερευνήσουμε την πιθανή συμμετοχή των actin-binding πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών των focal adhesions, αλλά και των μικρών GTPασών, πριν επιχειρήσουμε την επίδραση των οπιοειδών στο σύστημα αυτό. Οι προσεγγίσεις ήταν οι εξής:

- Μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών,
- Μελέτη των μεταβολών στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (FAK, PI3 kinase, talin, vinculin και paxillin).

Στη συνέχεια η μη προϋπάρχουσα γνώση για τη δυναμική του πολυμερισμού της ακτίνης στα Caki-2, σε συνδυασμό με την εξάπλωση του καρκίνου μας έδωσε το έναυσμα για τη μελέτη του συστήματος των καρκινικών κυττάρων με στόχο:

- Την ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειας της καθιερωμένης σειράς ανθρώπινων καρκινικών εγγύς νεφροσωληναριακών κυττάρων (Caki-2)
- Τη μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στη δυναμική πολυμερισμού της ακτίνης.
- Τη διερεύνηση της κατάστασης φωσφορυλίωσης της κινάσης των εστιών πρόσφυσης FAK (Focal Adhesion Kinase) και της ενδεχόμενης αλληλεπίδρασής της με την κινάση-3 των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI-3 κινάση).

- Τη μελέτη της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των οπιοειδών στα εν λόγω καρκινικά κύτταρα, υπόθεση που πηγάζει από τα ευρήματα του μηχανισμού δράσης τους στα φυσιολογικά νεφροσωληναριακά κύτταρα.

Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ικανότητα των κυτταρικών κλώνων και των καρκινικών κυττάρων να αποκρίνονται σε ερεθίσματα που είναι γνωστά ότι μεταβάλλουν τον κυτταροσκελετό της μητρικής σειράς OK (Papakonstanti et.al 1996, 1999). Έτσι έγινε:

- επώαση των κυτταρικών κλώνων με τους οπιοειδείς αγωνιστές  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνη( $\alpha_{s1}$ -casomorphin) και αιθυλκετοκυκλοαζοσίνη (EKC:ethylketocyclazocine) στο μέγιστο δράσης τους 30 λεπτά, καθώς και του TNF- $\alpha$  για 15 λεπτά, σύμφωνα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στα φυσιολογικά κύτταρα OK, (Papakonstanti et. al., 1998) και
- επώαση των καρκινικών κυττάρων με τους παραπάνω οπιοειδείς αγωνιστές στα χρονικά διαστήματα των 15, 30, 60 και 120 λεπτών.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα μάρτυρες, η κυτταρική σειρά OK (Oppossum Kidney), η καρκινική Caki-2 και οι μόνιμα μεταλλαγμένοι στην Cys 374 κλώνοι των OK (wt, Ala, Asp και Glu).

Η κυτταρική σειρά OK (Oppossum Kidney), προέρχεται από νεφρικό ιστό και ειδικότερα από το νεφροσωληναριακό επιθήλιο αμερικάνικου ασβού, *Didelphys virginiana*. Τα κύτταρα αυτά καθιερώθηκαν ως μόνιμη κυτταρική σειρά από το 1978 από τους Koyama et. al. Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν από την 43<sup>η</sup> έως την 48<sup>η</sup> γενεά προέρχονταν από την ATCC (American Type Culture Collection). Τα κύτταρα OK διαθέτουν μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τα οποία προσομοιάζουν με αυτά των φυσιολογικών κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και επιτελούν κατεξοχήν εγγύς σωληναριακή λειτουργία της επαναρρόφησης ιόντων Pi, μέσω των συμμεταφορέων Na<sup>+</sup>/Pi οι οποίοι εντοπίζονται στην περιαυλική τους μεμβράνη (Murer and Bider 1992). Επίσης διαθέτουν υποδοχείς ινσουλίνης και παραθυροειδούς ορμόνης (Caverzasio et al. 1986, Abraham et al. 1990), καθώς επίσης και θέσεις σύνδεσης κ οπιοειδών και σωματοστατίνης (Hatzoglou et al. 1996).

Η καρκινική Caki-2 προέρχεται από νεφρικό ιστό και ειδικότερα από εγγύς νεφροσωληναριακό ανθρώπινο επιθήλιο (Avishar et al., 1994). Τα κύτταρα αυτά καθιερώθηκαν ως μόνιμη κυτταρική σειρά το 1978 από τον Fogh και αγοράστηκαν από την ATCC (American Type Culture Collection). Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν τη δυνατότητα δημιουργίας όγκων όταν ενεθούν σε άλλους ιστούς, χωρίς όμως να είναι μεταστατικά (Jenq et al., 1996). Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν από την 22<sup>η</sup> έως την 34<sup>η</sup> γενεά

Οι μόνιμα μεταλλαγμένοι στην Cys 374 κλώνοι των OK (wt, Ala, Asp και Glu) προέρχονταν από την Δρ. Α.Ν.Τσαπάρα, η οποία τους κατασκεύασε και παρατήρησε τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της διδακτορικής της διατριβής (Tsapara et al. 1999). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι :

- ένας για τη φυσιολογική ακτίνη που φέρει τον επίτοπο flag (wt),
- τρεις για τη μετάλλαξη Ala374 (Ala1, Ala5 και Ala6),
- δύο για τη μετάλλαξη Asp374 (Asp3 και Asp5) και
- τρεις για τη μετάλλαξη Glu374 (Glu3, Glu6 και Glu9).

### 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.2.1. Καλλιέργεια κυττάρων

##### Υλικά

DMEM/Ham's F12: Dulbeccos Modified Eagle Medium/ Ham's F12 (Biochrom KG, Berlin, Germany)

Ορός εμβρύου βοός : FBS (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Πενικιλίνη/Στρεπτομικίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO- BRL Co, MD, USA)

L-γλουταμίνη: L-glutamine (GIBCO- BRL Co, MD, USA)

Hepes: N-2-υδρόξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Όξινο ανθρακικό νάτριο: NaHCO<sub>3</sub> (GIBCO- BRL Co, MD, USA)

Τρυψίνη : Trypsin (Biochrom KG, Berlin, Germany)

EDTA (Biochrom KG, Berlin, Germany)

Κολλαγόνο τύπου IV: Collagen type IV (GIBCO- BRL Co, MD, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός : BSA (Sigma, USA)

DMSO (Sigma USA)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Τα πολυκλωνικά αντισώματα για τα PAK1 (rabbit), Rac1 (rabbit) και για τα μονοκλωνικά (mouse) RhoA και p110β και τη συνδεδεμένη με αραρόζη G πρωτεΐνη ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology Inc.

Τα πολυκλωνικά αντισώματα κατά της P13 κινάσης, (p85), (rabbit) και το κιτ των ενεργού τμήματος PBD Rac και Cdc42, ήταν από την Upstate Biotechnology Inc.

Τα αντισώματα κατά του φωσφορυλιωμένου Akt (Thr<sup>308</sup>) και του Akt ήταν από τη New England Biolabs και το anti-Gβγ από τη Calbiochem.

Το κιτ ECL για την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης και το μονοκλωνικό αντίσωμα ήταν από την Amersham Corp.

Οι οπιοειδείς αγωνιστές EKC και α<sub>s1</sub>-καζομορφίνης ήταν ευγενική προσφορά από το εργαστήριο της Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιατρικής Κρήτης.

Τα αντισώματα για τη μελέτη του μηχανισμού της απόπτωσης ήταν προφορά από το εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιατρικής Κρήτης.

### Μέθοδος

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές των κυττάρων ΟΚκαλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup> C και υγρή ατμόσφαιρα 95% αέρος και 5% CO<sub>2</sub>. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας περιείχε 1:1 (v/v) DMEM/Ham's F12, 10 % v/v αδρανολοποιημένο ορό εμβρύου βοός (FBS), 2mM L-γλουταμίνη, 20mM NaHCO<sub>3</sub>, 22 mM Hepes, 50 IU/ml πενικιλίνη και 50 mg/ml στρεπτομυκίνη, ενώ το θρεπτικό μέσο των μεταλλαγμένων κλώνων περιείχε επιπρόσθετα το αντιβιοτικό επιλογής Θεϊκή Γενετισίνη (Geneticin Sulphate : G418 400μg/ml). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν με το γνωστό τρόπο (Papakonstanti et al 1996, Tsapara et al. 1999), και τα πειράματα διεξήχθησαν, ενώ τα κύτταρα βρίσκονταν ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Για τα πειράματα του ανοσοφθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης (Western Analysis), τα κύτταρα τοποθετούνταν σε τρυβλία διαμέτρου 35mm και σε μεγαλύτερα διαμέτρου 60mm αντίστοιχα. Συγκεκριμένα όταν επρόκειτο να γίνουν μορφολογικές παρατηρήσεις τα κύτταρα καλλιεργούνταν πάνω σε καλυπτρίδες διαστάσεων 22 x 22 mm.

Αντίστοιχα τα κύτταρα Caki-2 καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup> C και υγρή ατμόσφαιρα 95% αέρος και 5% CO<sub>2</sub>. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας περιείχε 1:1 (v/v) MCCOY'S 5A MEDIUM, 10 % v/v αδρανολοποιημένο ορό εμβρύου βοός (FBS) και 25 mM Hepes.

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν, ενώ τα κύτταρα βρίσκονταν ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους.

Οι συνθήκες παγώματος ήταν οι εξής:

- Τα OK μετά από αποκόλληση με τρυψίνη, φυλάσσονταν στους -80<sup>0</sup> C, με αραιώση σε θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα 20% FBS και 10 % DMSO
- Τα Caki-2 μετά από αποκόλληση με τρυψίνη με 0.38g EDTA, φυλάσσονταν στους -80<sup>0</sup> C, σε υλικό με 95% θρεπτικό μέσο με (10% FBS) και 5 % DMSO.

## 2.2.2 Άμεσος Ανοσοφθορισμός

### Υλικά

Τρυβλία καλλιέργειας 6 οπών (Costar Europe LTD, The Netherlands)

Καλυπτρίδες 22x22 mm

Ροδαμίνη φαλλοϊδίνη : Rhodamine-phalloidin (Molecular Probes Inc., USA)

Φορμαλδεϋδη 37% (Merk, Germany)

PBS: Διάλυμα φωσφορικών-φυσιολογικού ορού

Ορός εμβρύου βοός : FBS (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Ακετόνη (Riedel de Haen, Germany)

Γλυκερόλη (Merk, Germany)

### Διάλυμα φωσφορικών-φυσιολογικού ορού (PBS)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM

NaCl 100mM

Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Διάλυμα ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης

Η ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη διαλύεται αρχικά σε μεθανόλη, ώστε να προκύψει ένα συγκεντρωμένο διάλυμα να αντιστοιχεί σε συγκεντρωμένο διάλυμα το οποίο φυλάσσεται στους -20 °C.

### Μέθοδος

Για τις μορφολογικές παρατηρήσεις με μικροσκοπία φθορισμού οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν για τουλάχιστον 24 ώρες πάνω σε καλυπτρίδες, ενώ τα κύτταρα βρίσκονταν ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης και για 15-20 ώρες πριν τη διεξαγωγή του πειράματος σε θρεπτικό χωρίς ορό. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιούνταν κάθε φορά τα φυσιολογικά OK σε όμοιες συνθήκες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη διαλύματος φορμαλδεϋδης 3.7% v/v σε διάλυμα φωσφορικών-φυσιολογικού ορού (PBS: Phosphate Buffer Saline) και μετά από τις εκπλύσεις τα κύτταρα επώαστηκαν σε παγωμένη ακετόνη, ώστε οι μεμβράνες τους να γίνουν διαπερατές. Έπειτα τα δείγματα επώαστηκαν με 160ng/50μl ανά καλυπτρίδα, από το μονοκλωνικό αντισώμα anti-flag M2 (με αραίωση 1:100 σε διάλυμα PBS που περιείχε 1.5% ορό FBS), ή με αντίσωμα κατά της παξιλλίνης, βινκουλίνης ή ταλίνης (σε αραίωση 1:50), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 1 ώρα (έμμεσος ανοσοφθορισμός) και ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα IgG κατά αντιορού επίμυος σημασμένο με φλουορεσκίνη σε αραίωση 1:50 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 1 ώρα στο σκοτάδι. Τελικά οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες εφοδιασμένες με slow fade antifade reagent, για να αποφθευχθεί η ταχεία απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο.

Για τη διπλή χρώση των κυττάρων, την παραπάνω διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού ακολούθησε άμεση χρώση της πολυμερούς ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη. Συγκεκριμένα τα κύτταρα επώαστηκαν με 0.6 units ή 0.25 μM ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης ανά καλυπτρίδα, σε θερμό, υγρό και σκοτεινό περιβάλλον για 40 λεπτά

(άμεσος ανοσοφθορισμός), εκπλύθηκαν και τοποθετήθηκαν στις αντικειμενοφόρους πλάκες, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### **Παρατήρηση παρασκευασμάτων**

Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Olympus BH-2 εφοδιασμένο με συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας του κατάλληλου μήκους κύματος και φωτογραφήθηκαν με ελαιοκαταδυτικό φακό 40 και 100 και φωτογραφική μηχανή 35 mm Olympus (C-35AD-4) σε ασπρόμαυρο φιλμ Kodak 3200. Εναλλακτικά, τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss IM35 (Zeiss, Oberkochen, Germany), εφοδιασμένο με confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany). Για την απόκτηση των εικόνων συνεστίασης χρησιμοποιήθηκε ελαιοκαταδυτικός φακός 63/1.25 και το λογισμικό CLSM (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany).

### **2.2.3 Western Blot των ανάλυση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.**

#### **A) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS αποδιάταξης (SDS-PAGE)**

##### **Υλικά και συσκευές**

Ακρυλαμίδιο (GIBCO- BRL Co, MD, USA)

N-N'-μέθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο : Bis-Ακρυλαμίδιο (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

SDS (Bio-Rad Labs., USA)

Tris-HCl (Bio-Rad Labs., USA)

Υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium Per Sulfate):  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  GIBCO-BRL Co, MD, USA)

TEMED (Sigma. USA)

B-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma USA)

DTT (Sigma. USA)

Γλυκερόλη (Merk, Germany)

Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Sigma USA)

Γλυκίνη (Bio-Rad Labs., USA)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (LKB, Bromma, Sweden)

##### **Διαλύματα**

#### **Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδιου 35 %**

Ακρυλαμίδιο 29.2 % (w/v)

Bis - Ακρυλαμίδιο 0,8 % (w/v)

Το διάλυμα φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0. 45 ή 0. 20  $\mu\text{m}$  και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος στους 4<sup>0</sup>C.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Seperating Gel Buffer)**

Tris-HCl 1.5 M

SDS 0.4% (w/v)

Το pH ρυθμίζεται σε 8.8 και το διάλυμα αφήνεται να ναδευτεί για 1 ώρα επιπλέον.

Επαναλαμβάνεται η μέτρηση του pH και αν είναι διαφορετική διορθώνεται με HCl (ποτέ με NaOH). Το διάλυμα στη συνέχεια φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 ή 0.20 μm και φυλάσσεται στους 4°C.

**Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (Stacking Gel Buffer)**

Tris-HCl 0,5 M  
SDS 0.4% (w/v)

Το pH ρυθμίζεται σε 6.8 και το διάλυμα αφήνεται να ναυαυτεί για 1 ώρα επιπλέον.

Επαναλαμβάνεται η μέτρηση του pH και αν είναι διαφορετική διορθώνεται με HCl (ποτέ με NaOH). Το διάλυμα στη συνέχεια φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 ή 0.20 μm και φυλάσσεται στους 4°C.

**Συγκεντρωμένο διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου 10% (APS)**

APS : (NH<sub>4</sub>)S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10 %

Παρασκευάζονται 10 ml διαλύματος APS και το παρασκεύασμα διατηρείται για μία εβδομάδα στους 4°C.

**Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x (Sample buffer 2x)**

Tris- HCl 0.125 M  
B- μερκαπτοαιθανόλη 4 %  
Γλυκερόλη 10%  
SDS 4%  
Κυανούν της βρωμοφαινόλης 0.02%

Εναλλακτικά μπορεί να αντικατασταθεί η β-μερκαπτοαιθανόλη από DTT τελικής

συγκέντρωσης 100mM, το οποίο προστίθεται λίγο μετά πριν τη χρήση του διαλύματος. Ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάζονται διαλύματα 1x, 2x, ή 4x. Το pH ρυθμίζεται σε 6.8 πριν από την προσθήκη του κυανού της βρωμοφαινόλης και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10 x (Reservoir Buffer), 1lt.**

Tris -HCl 30.3 gr  
Γλυκίνη 144.2 gr  
SDS 10 gr

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι χωρίς διόρθωση περίπου 8.3. Φυλάσσεται

Σε θερμοκρασία δωματίου.

Η σύσταση των διαλυμάτων για το πήκτωμα διαχωρισμού και επιστοίβαξης αναφέρεται παρακάτω :

**Διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού (30 ml)**

Υλικά	Ποσότητες για 10 %	Ποσότητες για 12.5%
Sep. Buffer	7.5 ml	7,5 ml
H <sub>2</sub> O	12ml	9.5 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	10 ml	12.5ml

<b>APS</b>	300μl	300μl
<b>TEMED</b>	10μl	10μl

#### Παρατηρήσεις:

- \*Το διάλυμα με τα παραπάνω αντιδραστήρια πρέπει να ανακινείται πριν την προσθήκη του απορρυπαντικού SDS, ώστε να μη δημιουργείται αφρός. Τα APS και TEMED προστίθενται μετά την τοποθέτηση των παραπάνω διαλυμάτων στη συσκευή gradient.

#### Διάλυμα για το πήκτωμα επιστοίβαξης (10 ml)

Υλικά	10ml
<b>Stack. Buffer</b>	<b>2,5ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>6ml</b>
<b>Ακρυλαμίδιο 30%</b>	<b>1.5ml</b>
<b>APS</b>	<b>100μl</b>
<b>TEMED</b>	<b>5μl</b>

#### Διάλυμα χρώσης του πηκτώματος (staining solution), 1lt.

Coomassie (Coomassie Blue Brilliant R 250)	2,5 gr
Μεθανόλη	450 ml
Οξικό οξύ	100ml
Απιονισμένο νερό	450 ml

#### Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος (Destaining solution).

Μεθανόλη	40%
Οξικό οξύ	10%
Απιονισμένο νερό	50 %

#### Μέθοδος

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση πλάκας πολυακρυλαμίδιου, όπου ως αποδιατακτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το ανιονικό απορρυπαντικό, το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS: n-Dodecylsulfate sodium salt, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S), το οποίο καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος, με το SDS σε καθορισμένα ποσά κατά βάρος (14g SDS/g) πρωτεΐνης, σχηματίζοντας επιμήκη σύμπλοκα με καθορισμένη δευτεροταγή δομή. Η δέσμευση είναι υδρόφοβη, ανεξάρτητη από την κοινή ιονική ισχύ και προσδίδει στα μόρια αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού μήκους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού τους βάρους.

#### Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη μέθοδο του Laemmli (1970), με διαφορά στη χρήση επίπεδου (16cmx18cmx1.5mm) αντί κυλινδρικού



Πηκτώματος. Μετά τη συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης, προστίθεται πρώτα το διάλυμα διαχωρισμού σε ύψος 11 cm περίπου από τη βάση της συσκευής. Όταν έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, προστίθεται το διάλυμα επιστοίβαξης μέσα στο οποίο τοποθετείται το "κτένι" για το σχηματισμό των θέσεων (πηγάδια) όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα των πρωτεϊνών.

Ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης γίνεται με μηχανισμό ελευθέρων ριζών και σαν καταλύτες χρησιμοποιούνται το  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  για την έναρξη του πολυμερισμού και το TEMED για τη συντήρηση του πολυμερισμού με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου πολυμερούς δικτύου πολυακρυλαμίδης. Το ρόλο του συνδέσμου των αλυσίδων της πολυακρυλαμίδης για τη δημιουργία του δικτύου παίζει το N, N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο.

### **Προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση**

Τα δείγματα τα οποία πρόκειται να τοποθετηθούν στην πηκτή πολυακρυλαμίδης απομονώνονται από τα κύτταρα σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω. Στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά ίσος όγκος διαλύματος μετουσίωσης 2x (ή 1/4 του όγκου από το 4x) και θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Κάτω από τις συνθήκες αυτές οι πρωτεΐνες αυτές αποδιατάσσονται διατηρώντας μόνο την πρωτοταγή τους δομή.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή και του διαλύματος ηλεκτροφόρησης στη συσκευή (περίπου 2.5 λίτρα), εφαρμόζεται σταθερή τάση 150 V έως ότου τα δείγματα να εισχωρίσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, οπότε και εφαρμόζεται τάση 280 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 3 ώρες περίπου.

### **B) Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης**

#### **Υλικά και συσκευές**

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham, USA)

Χαρτί Whatman 3MM (Amersham, USA)

Μεθανόλη

Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, Sweden)

#### **Διαλύματα**

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς των πρωτεϊνών (Transfer Buffer)**

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x 500ml

Μεθανόλη (Riedel de Haen, Germany) 1000 ml

Προστίθεται νερό μέχρι 5 λίτρα.

#### **Μέθοδος**

Η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επιτελείται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και με τη βοήθεια κατασκευής που έχει τη μορφή "σάντουιτς". Συγκεκριμένα πάνω στο σφουγγάρι της συσκευής τοποθετείται το ένα χαρτί Whatman 3MM, επάνω στο οποίο η πηκτή και στη συνέχεια η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (ιδίον διαστάσεων με την πηκτή). Ακολουθεί τοποθέτηση ενός επιπλέον φύλλου Whatman 3MM και του δεύτερου σφουγγαριού. Πριν τη δημιουργία της συσκευής όλα τα υλικά έχουν διαβραχεί με το διάλυμα μεταφοράς των πρωτεϊνών το οποίο είναι τοποθετημένο μέσα στη συσκευή. Το "σάντουιτς" στη συνέχεια τοποθετείται στη

συσκευή με το πήκτωμα προς την κάθοδο και η μεταφορά επιτελείται στους 4<sup>0</sup> C για 1.5 ώρες.

### **Γ) Υβριδοποίηση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης και ανίχνευσή τους με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL**

#### **Υλικά και συσκευές**

Tris-HCl (Bio-Rad Labs., USA)

NaCl (Merk, Germany)

Tween-20 (Merk, Germany)

Ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά

Αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που μελετάται κάθε φορά

Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος ή κουνελιού

(ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα) προσημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (Immunotech, USA)

Φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας ECL (Amersham Corp., USA)

Κασσέτα εμφάνισης φιλμ (Amersham Corp., USA)

Αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL (Amersham Corp., USA)

PC-based Image Analysis (Image Analysis Inc., Canada)

#### **Διαλύματα**

##### **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-φυσιολογικού ορού με Tween-20 (TBS-T)**

Tris-HCl 20mM

NaCl 137mM

Tween-20 0.1 % v/v

Ρυθμίζεται το pH σε 7.6 και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

##### **"Διάλυμα αφαίρεσης" (stripping)**

β-μερκαπτοαιθανόλη 100 mM

Tris-HCl 62.5 mM

SDS 2%

Ρυθμίζεται το pH σε 6.7 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup> C.

#### **Μέθοδος**

Η διαδικασία αποτεκλείται από τα εξής στάδια :

1. Επώαση της μεμβράνης με TBS-T στο οποίο έχει προστεθεί 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Η επώαση διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη τη νύχτα στους 4<sup>0</sup> C, υπό ανάδευση.
2. Έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T, 1 φορά για 15 λεπτά και 2 φορές για 5 λεπτά.
3. Επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης στόχου, το οποίο έχει διαλυθεί σε TBS-T με ή χωρίς 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά. Ο χρόνος επώασης καθορίζεται από την εταιρεία προέλευσής του ή από βιβλιογραφικά δεδομένα ή ακόμα και μετά από δοκιμαστικά πειράματα.
4. Έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T, 1 φορά για 15 λεπτά και 2 φορές για 5 λεπτά.
5. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα (που θα πρέπει να είναι συμβατό με το πρώτο), το οποίο έχει διαλυθεί σε TBS-T με ή χωρίς 5%

ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά. Ο χρόνος επώασης καθορίζεται από την εταιρεία προέλευσής του ή από βιβλιογραφικά δεδομένα ή ακόμα και μετά από δοκιμαστικά πειράματα

6. Έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T, 1 φορά για 15 λεπτά και 4 φορές για 5 λεπτά.
7. Επώαση της μεμβράνης για 1 λεπτό με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL
8. Έκθεση σε φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας ECL για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Στις περιπτώσεις εκείνες που επιβάλλεται η ανίχνευση, στην ίδια νιτροκυτταρίνη, διαφορετικών πρωτεϊνών η απομάκρυνση των αντισωμάτων επιτελείται με επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα "αφαίρεσης" στους 50<sup>0</sup> C για 30λεπτά, υπό ανάδευση. Μετά από έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T (2 φορές για 10 λεπτά) ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

#### **2.2.4 Ανάλυση πρωτεϊνών στα διαλυτά και αδιάλυτα στο TritonX-100 κυτταρικά κλάσματα, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης.**

##### **A) Προετοιμασία των κυτταρικών κλασμάτων.**

###### **Υλικά**

Φιάλες καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup> (Costar Europe LTD, The Netherlands)

Tris- HCl (Bio-Rad Labs, USA)

NaCl (Merk, Germany)

CaCl<sub>2</sub> (Merk, Germany)

MgCl<sub>2</sub> (Merk, Germany)

NP-40

PMSF (SERVA, Germany)

Ορθοβαναδικό νάτριο: Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

###### **Διάλυμα εκχύλισης (Buffer A)**

Tris-HCl 20 mM

NaCl 137 mM

CaCl<sub>2</sub> 1 mM

MgCl<sub>2</sub> 1 mM

NP-40 1 %

PMSF 1 mM

Ορθοβαναδικό 0.1 mM

Ρυθμίζεται το pH σε 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 40 C.

###### **Μέθοδος**

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες επιφάνειας των 75 cm<sup>2</sup> μέχρι τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Έπειτα τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα PBS και οι πρωτεΐνες που παρέμειναν στη φιάλη καλλιέργειας διαλύθηκαν με μηχανική απόξεση μέσα σε 1 ml διαλύματος Buffer A και τυχόν στερεά υπολείματα (πιθανόν πυρηνικά συστατικά) απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση (5 min, 12.000g). Ίση ποσότητα πρωτεΐνης (1000μg) χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για ανοσοκατακρήμνιση, ενώ ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης του κυτταρικού εκχυλίσματος (50μg), χρησιμοποιήθηκε για

ηλεκτροφόρηση, σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης εξαιτίας της παρουσίας SDS (SDS-PAGE) και κατόπιν για ανοσοαποτύπωση (Western Blot).

### **B) Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών.**

#### **Υλικά**

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατα φωσφορυλιωμένων σε τυροσίνη πρωτεϊνών (Sigma, USA).

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της υπομονάδας p110 της PI-3 κινάσης (του οίκου UBI) Αγαρόζη συνδεδεμένη με πρωτεΐνη A (Upstate Biotechnology Inc., USA)

#### **Μέθοδος**

Η μέθοδος διαχωρισμού με ανοσοκατακρήμιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από το κυτταρικό εκχύλισμα βασίζεται στη σύνδεση του αντισώματος στην πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια στη σύνδεση της προσδεδεμένης με αγαρόζη πρωτεΐνης A με το αντίσωμα, η οποία είναι εύκολο να διαχωρισθεί με φυγοκέντρηση λόγω της σημαντικής διαφοράς βάρους της αγαρόζης από τις πρωτεΐνες. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη :

1. Επώαση των παραπάνω κυτταρικών εκχυλισμάτων, ανά 1000μg κυτταρικών πρωτεϊνών με το αντίστοιχο:  
αντίσωμα φωσφοτυροσίνης (5-9μg/ml)  
anti-p110 (2μg/ml)  
όλη τη νύχτα υπό ελαφρά περιστροφή στους 4<sup>0</sup> C.
2. Προσθήκη 70 μl διαλύματος αγαρόζης (50%) συνδεδεμένης με πρωτεΐνη A, επώαση υπό ελαφρά περιστροφή στους 4<sup>0</sup>C, για 2 ώρες.
3. Συλλογή των σφαιριδίων αγαρόζης, με φυγοκέντρηση στις 12000 g για 1 λεπτό και τρεις διαδοχικές μετά από κάθε φυγοκέντρηση, εκπλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα (RIPA).
4. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος μετουσίωσης 2x και θέρμανση στους 95<sup>0</sup>C για 5 λεπτά.
5. Απομάκρυνση των σφαιριδίων αγαρόζης με φυγοκέντρηση σε 12000g για 30 sec και συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση (Western Blot).

### **Γ) Western Blot των ανάλυση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.**

#### **Υλικά**

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κατα της υπομονάδας p85 της PI-3 κινάσης κουνελιού από επίμυ (Upstate Biotechnology Inc., USA)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατα φωσφορυλιωμένων σε τυροσίνη πρωτεϊνών (Sigma, USA).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της υπομονάδας p110 της PI-3 κινάσης (του οίκου UBI).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ακτίνης επίμυος (Amersham, USA)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της FAK (Transduction Labs)
- Αντίσωμα κατά του υποδοχέα των οπιοειδών (KOR), (Transduction Labs).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της βιλλίνης επίμυος (Chemicon, USA)
- Τα πολυκλωνικά αντισώματα για τα PAK1 (rabbit), Rac1 (rabbit) και για τα μονοκλωνικά (mouse) RhoA και p110β και τη συνδεδεμένη με αγαρόζη G πρωτεΐνη ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology Inc.

- Τα πολυκλωνικά αντισώματα κατά της PI3 κινάσης, (p85), κουνελιού, από την Upstate Biotechnology Inc.
- Αντισώματα κατά του φωσφορυλιωμένου Akt (Thr<sup>308</sup>) και του Akt, από τη New England Biolabs και anti-Gβγ από τη Calbiochem.
- Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος προσημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (Amersham, USA)
- Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) κουνελιού προσημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (Immunotech, USA)

### **Μέθοδος**

Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, ακολούθησε η μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιώντας τη συσκευή μεταφοράς (LKB, Bromma, Sweden), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο .

Ακολούθησε επώαση της νιτροκυτταρίνης με το αντίστοιχο αντίσωμα κάθε φορά, υπό ήπια ανάδευση, για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή στους 4<sup>0</sup>C για όλη τη νύχτα. Έπειτα επώαστηκαν με τα κατάλληλα δεύτερα αντισώματα (1:10000 ή 1: 5000 κατά αντιορού επιμυός ή κουνελιού αντίστοιχα), για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ήπια ανάδευση) και η συνδεδεμένη σε αυτό υπεροξειδάση αντέδρασε με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτέθηκε σε φιλμ υψηλής ευαισθησίας ECL και εμφανίστηκε σε διάφορα χρονικά διαστήματα, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης των πρωτεϊνικών κηλίδων έγινε με το Molecular Analyst Software. Η διαδικασία επώασης με τα διαφορετικά αντισώματα έγινε μετά την απομάκρυνση κάθε φορά του προηγούμενου αντισώματος από τη νιτροκυτταρίνη, με το διάλυμα "αφαίρεσης" (stripping buffer).

### **2.2.5 Κλασματοποίηση του κυταροσκελετού σε διαλυτό και αδιάλυτο στο Triton X-100.**

#### **Υλικά και συσκευές**

Τρυβλία καλλιέργειας 6 οπών (Costar Europe LTD, The Netherlands)

Triton X-100 (Sigma, USA)

Tris-HCl (Bio-Rad Labs, USA)

EGTA (Sigma, USA)

Sucrose (GIBCO-BRL, Co, MD, USA)

Phalloidin (Sigma, USA)

Υπερχλωρικό οξύ : PCA : Perchloric acid (Merk, Germany)

NaOH (Merk, Germany)

PMSF (SERVA, Germany)

Leupeptin (Sigma, USA)

Ξέστρο κυττάρων (Costar Europe LTD, The Netherlands)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ακτίνης επίμυος (Chemicon, USA)

Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος προσημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (Amersham, USA)

Φυγόκεντρο

#### **Διάλυμα εκχύλισης με Triton X-100**

Triton X-100 0,3%

Tris-HCl 5mM

EGTA 2mM

Sucrose 300mM

NaF	50mM
Phalloidin	2μM
PMSF	400μM
Leupeptin	10μM

Ρυθμίζεται το pH σε 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4<sup>0</sup> C.

### Μέθοδος

Για τις μετρήσεις των επιπέδων της μονομερούς (Triton soluble) και της πολυμερισμένης (Triton insoluble) ακτίνης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης σε πλάκες των έξι οπών ή σε τρυβλία διαμέτρου 35mm. Σε αυτά που ακολούθησε επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών EKC και  $\alpha_{s1}$ -cas και του παράγοντα TNF- $\alpha$ , έγινε επώαση σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 15-20 ώρες πριν τη διεξαγωγή του πειράματος. Στα συγκεκριμένα πειράματα έγινε επίδραση των οπιοειδών EKC και  $\alpha_{s1}$ -cas, σε συγκέντρωση  $10^{-8}$  M για 30 λεπτά και του TNF- $\alpha$  10ng/ml για 15 λεπτά. Ως κύτταρα-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα φυσιολογικά OK και Caki-2 απουσία οπιοειδών. Μετα την επίδραση με τους παραπάνω παράγοντες συλλέχθηκαν τα διαλυτά και τα αδιάλυτα στο Triton X-100 (Triton Soluble fraction :TS και Triton Insoluble fraction:TI), πρωτεϊνικά κλάσματα, με τη γνωστή μέθοδο (Golenhofen et al. 1995).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό της κυτταρικής ακτίνης και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτή, όπως τη βιλλίνη, σε δύο κλάσματα της μονομερούς και της πολυμερούς ακτίνης (Golenhofen et al. 1995). Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται μέσω του απορρυπαντικού Triton X-100 στο οποίο ο κυτταροσκελετός, όσον αφορά τις πολυμερισμένες του μορφές παραμένει αδιάλυτος.

Συγκεκριμένα μετά από την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με PBS, ακολουθεί εκχύλιση των κυττάρων στον πάγο με 500 μl διαλύματος εκχύλισης, για 5 λεπτά στον πάγο. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος εκχύλισης, οι διαλυτές στο Triton X-100 (TS) πρωτεΐνες, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και η μονομερής ακτίνη, κατακρυμνίζονται με ίσο όγκο διαλύματος PCA 6%. Οι αδιάλυτες στο Triton X-100 (TI), παραμένουν στο τρυβλίο καλλιέργειας, απομακρύνονται με απόξεση και κατακρυμνίζονται με 1ml διαλύματος PCA 3%. Τα δύο κυτταρικά κλάσματα φυγοκεντρούνται, στις 13.000 rpm για 5 λεπτά, και τα ιζήματα, που προκύπτουν επαναδιαλύονται σε 100μl NaOH 0.1 N. Έπειτα λαμβάνονται ίσοι όγκοι από κάθε κυτταρικό κλάσμα και μετά από ανάμιξή τους με ίσο όγκο διαλύματος μετουσίωσης 2x, ακολουθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και της μεταφοράς των πρωτεϊνών, όπως περιγράφηκε παραπάνω, σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια γίνεται ανίχνευση με το μονοκλωνικό αντίσωμα της ακτίνης σε αραιώση 1:1000 και το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-flag M2 σε αραιώση 1:1000 (3,2μg/ml, σε blocking buffer), με δεύτερο αντίσωμα (1:10000 κατά αντιορού επιμύος), και η συνδεδεμένη με αυτό υπεροξειδάση αντιδρά με το σύστημα χημειωταύγειας ECL. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ υψηλής ευαισθησίας ECL και εμφανίζεται σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολουθεί η μέτρηση των πρωτεϊνικών κηλίδων με Αναλυτή Εικόνας (Image Analysis).

### 2.2.6 Ανάλυση των ενεργών πρωτεϊνών Rac και cdc 42 στα κυτταρικά κλάσματα, με τη μέθοδο της κατακρήμνισης μέσω συγγένειας (Affinity precipitation).

#### Υλικά

HEPES	(GIBCO- BRL Co, MD, USA)
NaCl	(Merk, Germany)
NP-40	
Δεοξυχολικό Νάτριο	(Fluka Chemie AG, Switzerland)
Γλυκερόλη	(Merk, Germany)
NaF	(Sigma, USA)
MgCl <sub>2</sub>	(Merk, Germany)
EDTA	(Biochrom KG, Berlin, Germany)
Ορθοβαναδικό Νάτριο	
Leupeptin	(Sigma, USA)
Aprotinin	(Sigma, USA)

Αντιδραστήριο που περιέχει το GST-fusion, PBD (p21-binding domain) της PAK1 (Upstate biotechnology Inc.).

Τα αντισώματα κατά των Rac και Cdc42, ήταν από την Upstate Biotechnology Inc.

#### Διάλυμα λύσης των κυττάρων με ιόντα Mg<sup>2+</sup> (MLB Lysis Buffer)

HEPES	25 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Δεοξυχολικό Νάτριο	0.25 %
Γλυκερόλη	10 %
NaF	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	1mM
Ορθοβαναδικό Νάτριο	1mM
Leupeptin	10μg/ml
Aprotinin	10 μg/ml

#### Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή κατακρήμνισης μέσω συγγένειας, με το συνδεδεμένο GST-PBD, του ανάλογου κιν, βασίζεται στη μέθοδο Bernard et al (1999). Μετά τη λύση των κυττάρων με το παραπάνω διάλυμα MLB (700μl ανά φλάσκα των 75 cm<sup>2</sup>), προστέθηκαν 8 μg από το αντιδραστήριο GST-PBD συνδεδεμένα με γλουταθειόνη-αγαρόζη σε ίσους όγκους κυτταρικών εκχυλισμάτων δειγμάτων και κυττάρων μαρτύρων, ενώ παράλληλα κρατήθηκαν ίσοι όγκοι ολικών πρωτεϊνών για western ανάλυση. Τα δείγματα επώαστηκαν υπό ανάδευση στις 15 rpm, για 1 ώρα στους 4<sup>0</sup> C, και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 5 sec στις 13000rpm. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με 0.5 ml διαλύματος MLB την κάθε φορά και έπειτα στα ιζήματα ακολούθησε η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και western blot ανάλυση με αντισώματα για τις Rac και cdc42 GTPάσες.

### **2.2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών μετά από λύση των κυττάρων παρουσία απορρυπαντικού**

#### **Υλικά και συσκευές**

Bio Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Labs, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός : BSA (Sigma, USA)

Φωτόμετρο

#### **Μέθοδος**

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού με τα αντιδραστήρια Bio-Rad DC βασίζεται στην τεχνική Lowry (Lowry et al. 1951). Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων (εις διπλούν) σε σωληνάρια τύπου Eppendorf και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 200 μl με ενέσιμο νερό. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται αυτό στο οποίο ο όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος έχει αντικατασταθεί με ίσο όγκο διαλύματος λύσης.
2. Προσθήκη 100μl αντιδραστηρίου Bio-Rad A'.
3. Προσθήκη 800μl αντιδραστηρίου Bio-Rad C και επώαση για 15 λεπτά.
4. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 750 nm.

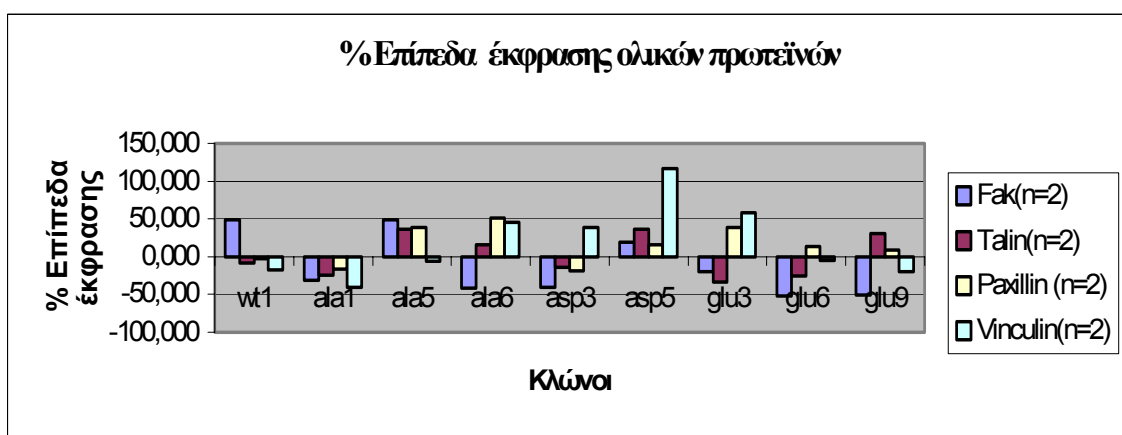
Ο ποσοτικός προσδιορισμός κάθε δείγματος γίνεται με χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία λαμβάνεται από την ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών ποσοτήτων BSA (5,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80μg).



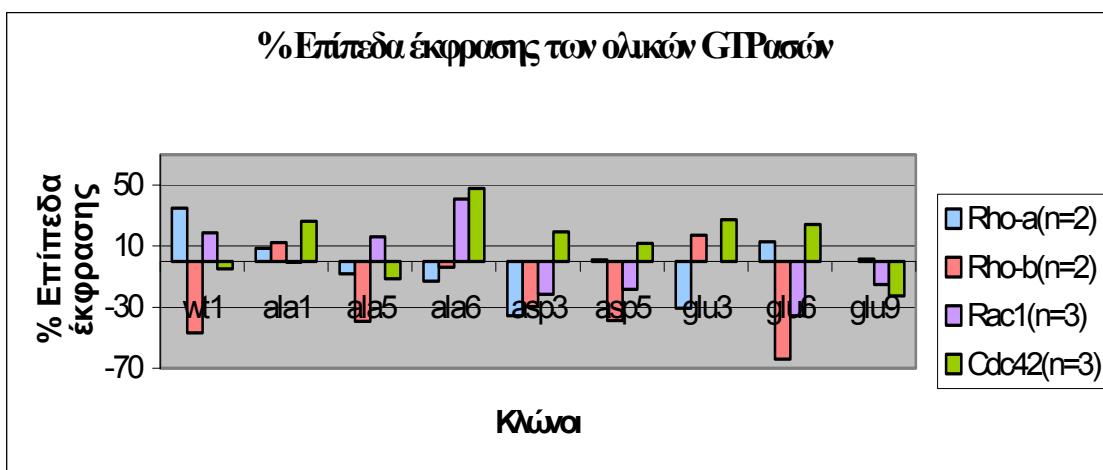
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία εστιών πρόσφυσης και των μικρών GTPασών, στους μεταλλαγμένους κλώνους της ακτίνης.

Στην προσπάθεια μελέτης των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών που συνδέουν τα ινίδια της ακτίνης με μεμβρανικές πρωτεΐνες και συμμετέχουν στη δημιουργία εστιών πρόσφυσης, καθώς και των μικρών GTPασών, τα ολικά εκχυλίσματα των κυτταρικών κλώνων υποβλήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Συγκεκριμένα οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν στις κατάλληλες κάθε φορά συνθήκες με τα αντίστοιχα αντισώματα κατά των πρωτεϊνών Fak, Talin, Paxillin, Vinculin (σχήμα 1), Rhoa, Rhob, Rac και Cdc42 (σχήμα 2).



**Σχήμα 1.** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης στους εννέα κλώνους, μετά από επώαση με τα αντισώματα κατά των Fak, Talin, Paxillin και Vincullin. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των τιμών μετά από αφαίρεση των τιμών των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών στα φυσιολογικά OK κύτταρα, ενώ όπου n = ο αριθμός των πειραμάτων.



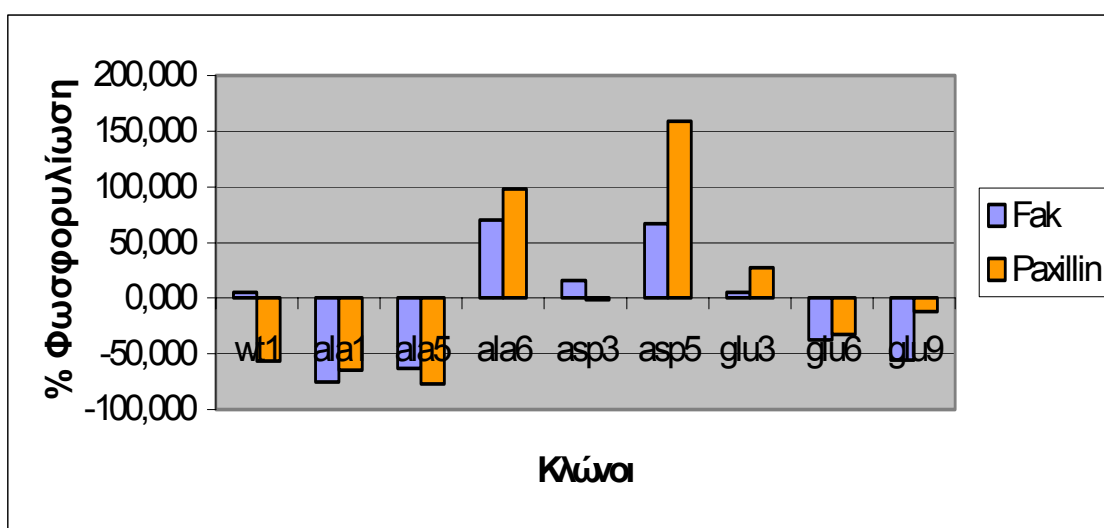
**Σχήμα 2.** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης στους εννέα κλώνους, μετά από επώαση με τα αντισώματα κατά των Rhoa, Rhob, Rac και Cdc42. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους, μετά από αφαίρεση των τιμών των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών στα φυσιολογικά OK κύτταρα, ενώ όπου n= ο αριθμός των πειραμάτων.

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα (Tsapara et. al. 1999), γνωρίζουμε ότι από τους κλώνους αυτούς, οι wt1, ala6, asp3 και glu6 είναι αυτοί με τη μεγαλύτερη έκφραση flag-actin. Για το λόγο αυτό προτιμήσαμε να μελετήσουμε την έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών στους κλώνους αυτούς ως προς τα φυσιολογικά OK κύτταρα.

Αξίζει να παρατηρήσει κανείς ότι από τις παραπάνω πρωτεΐνες, μόνο η Fak παρουσιάζει σαφή μείωση στα επίπεδα έκφρασης, στους επιλεγμένους τέσσερις μεταλλαγμένους κλώνους σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αγρίου τύπου, μετά από αφαίρεση των αντίστοιχων τιμών στα OK κύτταρα. Όσον αφορά τις υπόλοιπες πρωτεΐνες, δεν παρατηρείται σταθερή τάση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παραπάνω τέσσερις μεταλλαγμένοι κλώνοι δεν εμφανίζουν μεταβολές, σε σχέση με τα κύτταρα OK που φέρουν την αγρίου τύπου μορφή της ακτίνης σε σύντηξη με τον επίτοπο flag (wt1), τουλάχιστον όσον αφορά τη μετάδοση του μηνύματος, μέσω των παραπάνω πρωτεϊνών.

### 3.2 Φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών.

Όπως είναι γνωστό, η φωσφορυλίωση σε τυροσίνη των πρωτεϊνών πρόσδεσης της ακτίνης στην πλασματική μεμβράνη σχετίζεται με το σχηματισμό των μικροϊνιδίων και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, (Kim et. al., 2001). Επίσης είναι γνωστό ότι η Fak φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνη μετά από επίδραση ορμονών, πεπτιδίων, αυξητικών παραγόντων και εξωκυττάριων μηνυμάτων (Koukouritaki et. al, 1999b). Η Fak, με τη σειρά της φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεΐνες, όπως βινκουλίνη και παξιλλίνη. Για τη μελέτη των επιπέδων φωσφορυλίωσης σε τυροσίνη των ανωτέρω πρωτεϊνών, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει φωσφοτυροσίνες και έπειτα τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (1000μg ολικής πρωτεΐνης), αναλύθηκαν παραπέρα με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας αντισώματα κατά των πρωτεϊνών Fak και Paxillin. Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται τα δεδομένα από τα αντίστοιχα πειράματα ανοσοκατακρήμνιση για τους εννέα κλώνους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων Fak και Paxillin, εμφανίζουν κοινή τάση στους διαφορετικούς κλώνους των OK. Όσον αφορά τους επιλεγμένους τέσσερις κλώνους, ο ala6 παρουσιάζει τη μέγιστη έκφραση των Fak και Paxillin, ενώ στους αγρίου τύπου wt1, asp3 και glu6 εμφανίζονται οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες με σχεδόν παρόμοιο



ποσοστό ή μικρότερο από αυτό των φυσιολογικών OK.

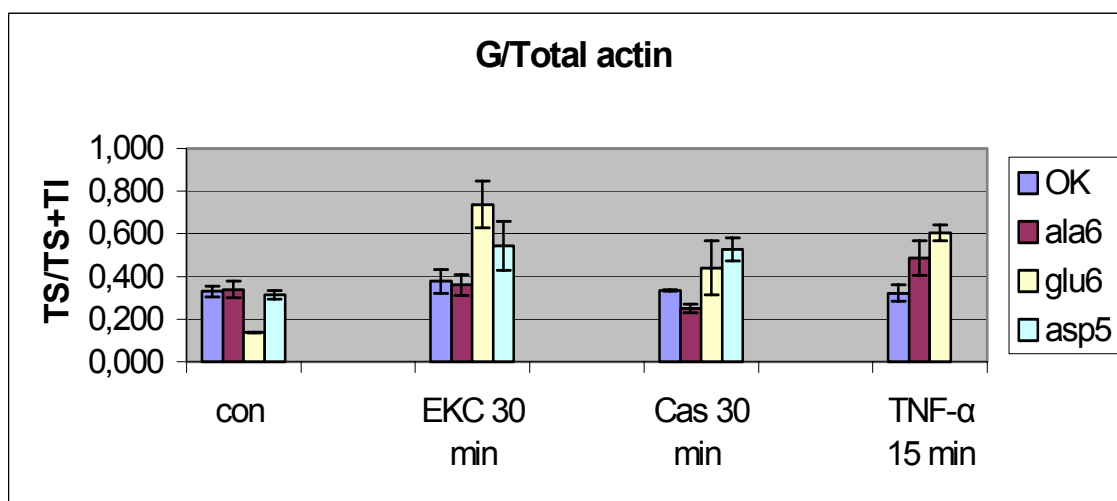
**Σχήμα 3.** Επίπεδα φωσφορυλίωσης μετά από ανοσοκατακρήμνιση με το μονοκλωνικό αντίσωμα φωσφοτυροσίνης στους εννέα κλώνους, και επώαση με τα αντισώματα κατά των Fak και Paxillin. Οι

τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους μετά από αφαίρεση των τιμών των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών στα φυσιολογικά OK κύτταρα.

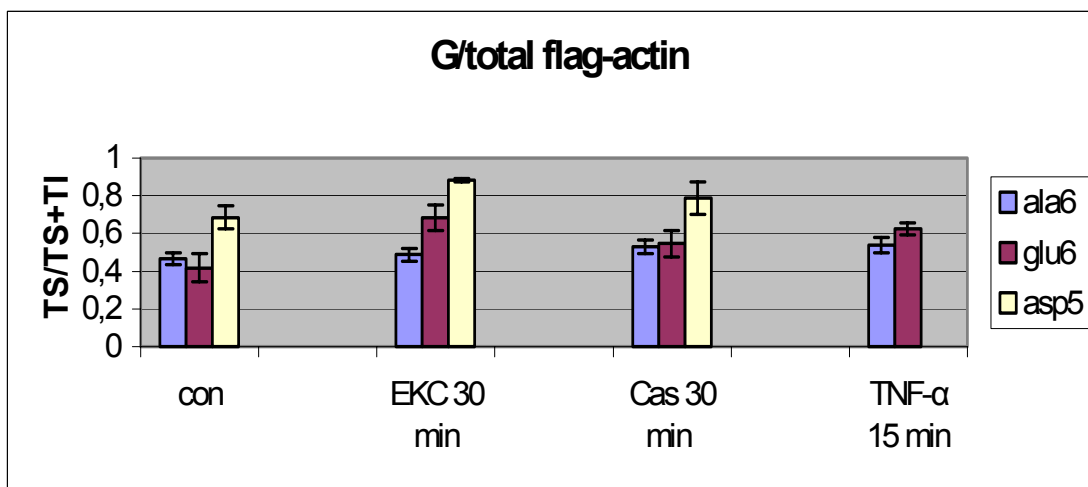
### 3.3 Μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών πεπτιδίων στη δυναμική ισορροπία μεταξύ μονομερούς (G) προς πολυμερή ακτίνη (F) ακτίνης, με τη μέθοδο του κλασματικού διαχωρισμού στο Triton X-100 και Western ανάλυση.

#### 3.3.1 Επίδραση των οπιοειδών (EKC και $a_{s1}$ -cas) και του παράγοντα TNF- $\alpha$ στο κλάσμα μονομερούς/ολική ακτίνη στους μεταλλαγμένους κλώνους και στα φυσιολογικά OK.

Τα φυσιολογικά OK καθώς και οι μεταλλαγμένοι κλώνοι επώαστηκαν για 30 min με τα οπιοειδή πεπτιδία  $a_{s1}$ -cas και EKC σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ M και για 15 min με 10ng/ml TNF- $\alpha$ . Με τη μέθοδο της κλασματοποίησης του κυτταροσκελετού σε διαλυτό και αδιάλυτο στο Triton X-100 κλάσμα και την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό πρόγραμμα Image analysis, έγινε φανερό ότι ο λόγος της μονομερούς προς την ολική ακτίνη (G/Total actin), αυξήθηκε στους κλώνους wt1, ala6, asp5 και glu6, μετά από την επίδραση των οπιοειδών και του TNF- $\alpha$ , σχήμα 4, δράση κοινή με αυτή των φυσιολογικών OK, (Parakonstanti et. al 1996, 1999). Αυτό σημαίνει ότι όπως στα φυσιολογικά, έτσι και στους μεταλλαγμένους κλώνους των OK, η επίδραση των οπιοειδών και του TNF- $\alpha$ , οδηγούν στον αποπολυμερισμό της ενδογενούς ακτίνης. Παρόμοιο είναι το αποτέλεσμα και στην εξωγενή ακτίνη, που φέρει τον flag επίτοπο (σχήμα 5).



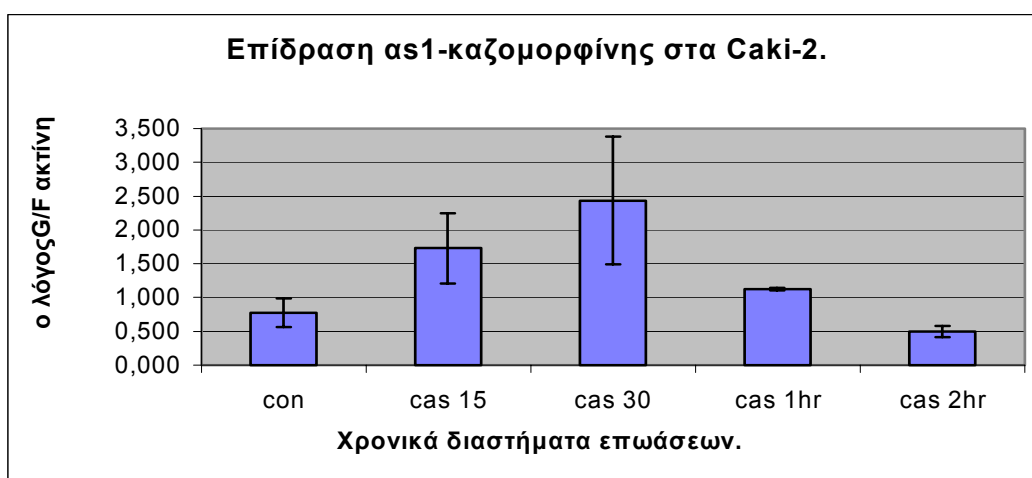
**Σχήμα 4.** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης στους τέσσερις από τους εννέα κλώνους, μετά από την επίδραση για 30 min με τα οπιοειδή  $a_{s1}$  cas και EKC σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ M και TNF- $\alpha$  10ng/ml, μετά από κλασματοποίηση στο Triton X-100 και επώαση με το αντίσωμα κατά της ακτίνης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους με  $\pm$  SE.



**Σχήμα 5.** Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης στους τέσσερις από τους εννέα κλώνους, μετά από την επίδραση για 30 min με τα οπιοειδή  $\alpha_{s1}$ -cas και EKC σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ M και TNF- $\alpha$  10ng/ml, μετά από κλασματοποίηση στο Triton X-100 και επώαση με το αντίσωμα κατά του επιτόπου flag της ακτίνης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους με  $\pm$  SE.

### 3.3.2 Επίδραση των οπιοειδών (EKC και $\alpha_{s1}$ -cas) στο κλάσμα μονομερούς/ολική ακτίνη στα καρκινικά κύτταρα Caki-2.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν οι μεταβολές της δυναμικής ισορροπίας πολυμερούς-μονομερούς ακτίνης είναι ένα γενικότερο φαινόμενο απόκρισης των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων νεφρού Caki-2 σε εξωτερικά ερεθίσματα, μελετήθηκε αρχικά η πιθανή δράση των οπιοειδών στην κατάσταση πολυμερισμού της ακτίνης. Τα κύτταρα Caki-2 επώαστηκαν για 15, 30, 60 και 120 λεπτά με τους οπιοειδείς αγωνιστές αιθυλκετοκυκλαζοσίνη (ethylketocyclazocine) και  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνη ( $\alpha_{s1}$ -casomorphin), σε συγκέντρωση  $10^{-8}$  M και ο λόγος (G/F), μονομερούς (G) προς πολυμερή ακτίνη (F), μετρήθηκε με την τεχνική Western Blot για τον προσδιορισμό της διαλυτής (μονομερούς-G) και αδιάλυτης (πολυμερούς-F)



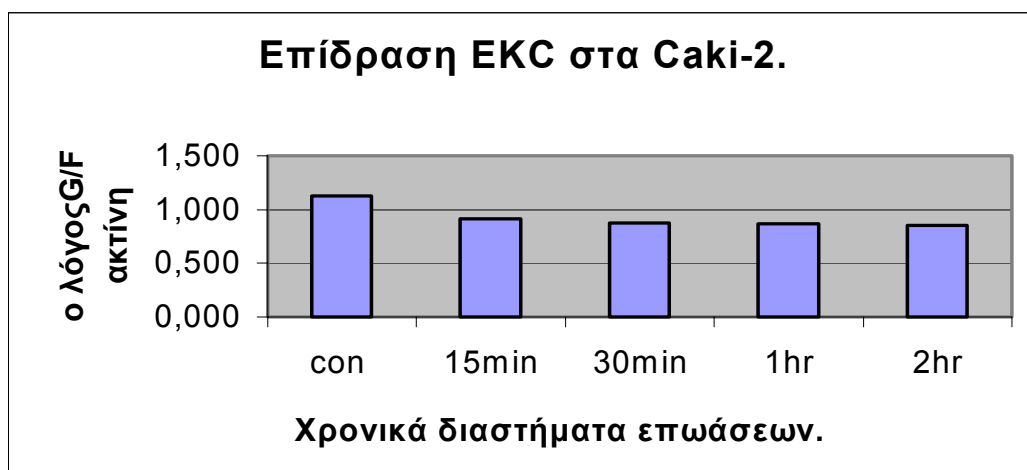
ακτίνης στο Triton X-100.

**Σχήμα 6.** Προσδιορισμός του λόγου μονομερούς (G)/ πολυμερή ακτίνη (F) μετά από έκθεση των κυττάρων Caki-2 για 15, 30, 60 και 120 min στο οπιοειδές  $\alpha_{s1}$ -cas σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ M, μετά από

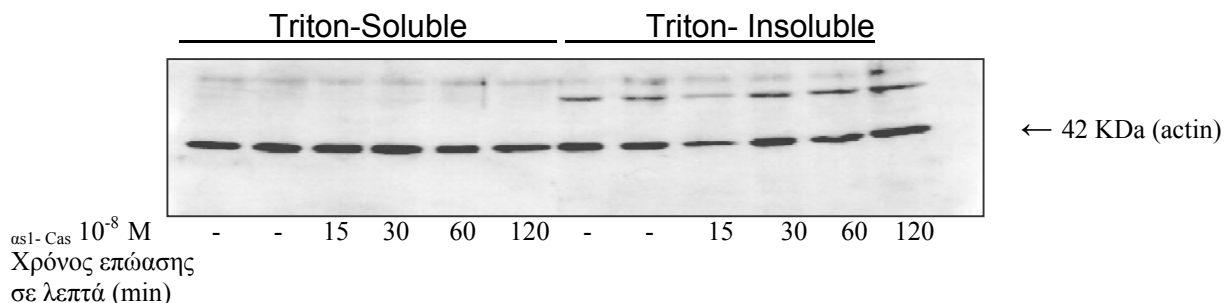
κλασματοποίηση στο Triton X-100. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους  $\pm$  το τυπικό σφάλμα πέντε αναξάρτητων πειραμάτων.

Όπως υπολογίστηκε από τη σχετική πυκνότητα των κυλίδων των Western Blots, ο λόγος TI/TS, δηλαδή το ποσοστό της πολυμερούς προς τη μονομερή ακτίνη στα κύτταρα που επώαστηκαν με  $\alpha_{S1}$ -καζομορφίνη για 15 και 30 λεπτά, αυξήθηκε σταδιακά στο διπλάσιο και στο τριπλάσιο αντίστοιχα, ως προς τα κύτταρα μάρτυρες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει αποπολυμερισμό του δικτύου της ακτίνης. Πέραν των 30 λεπτών τα κύτταρα επανήλθαν σχεδόν στην αρχική τους κατάσταση (σχήμα 6, εικόνα 1).

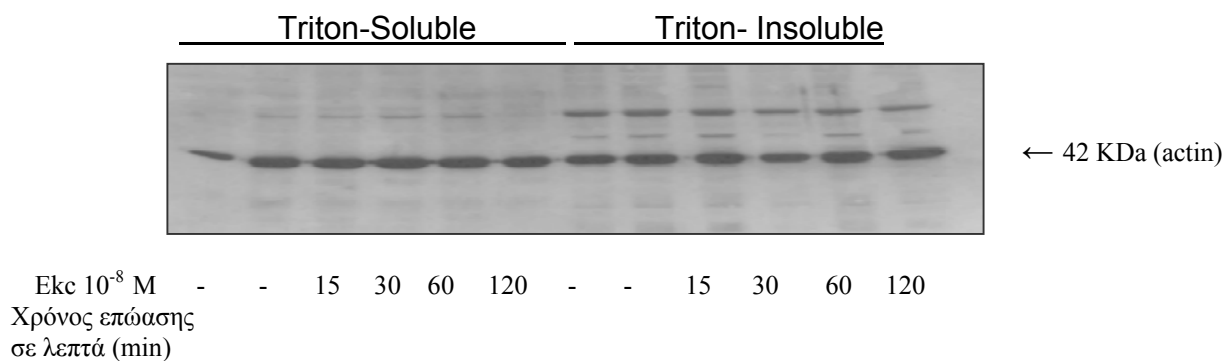
Αντίθετα η επίδραση της αιθυλκετοκυκλαζοσίνης στα κύτταρα Caki-2, είχε ως αποτέλεσμα τη συνεχή μείωση κατά 20%, 22%, 23% και 25% του λόγου μονομερούς προς πολυμερή ακτίνη (G/F), για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα των 15, 30, 60 και 120 λεπτών, γεγονός που ερμηνεύεται ως αύξηση της πολυμερούς ακτίνης (σχήμα 7, εικόνα 2).



**Σχήμα 7.** Προσδιορισμός του λόγου μονομερούς (G)/ πολυμερή ακτίνη (F) μετά από έκθεση των κυττάρων Caki-2 για 15, 30, 60 και 120 min στο ποιοειδές ΕΚC σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ M, μετά από κλασματοποίηση στο Triton X-100. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους πέντε αναξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 1. Ποσοτικός προσδιορισμός της πολυμερούς και μονομερούς ακτίνης παρουσία  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνης.



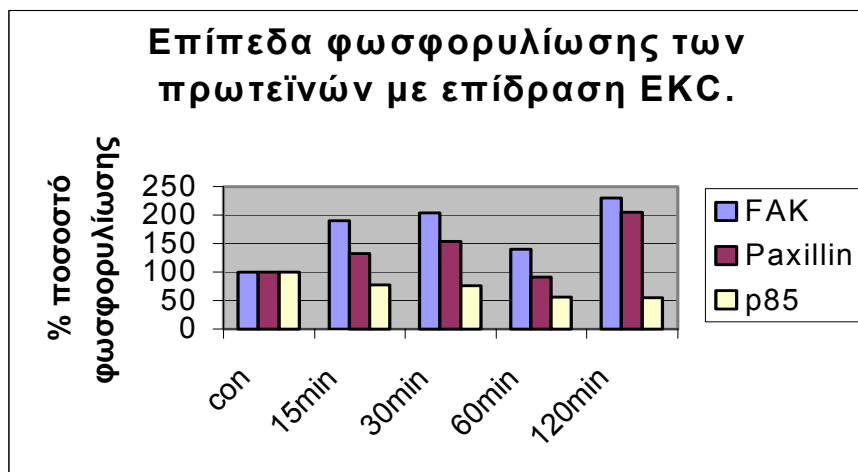
Εικόνα 2. Ποσοτικός προσδιορισμός της πολυμερούς και μονομερούς ακτίνης παρουσία ΕΚC.

### 3.4 Η φωσφορυλίωση σε τυροσίνη είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης του οπιοειδούς ΕΚC στα καρκινικά κύτταρα Caki-2.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της FAK σε τυροσίνη συμβαίνει σε απόκριση σε εξωκυττάρια μηνύματα, όπως ορμόνες, πεπίδια, αυξητικούς παράγοντες (Koukouritaki et. al. (1999b)). Η FAK με τη σειρά της φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεΐνες, όπως την παξιλλίνη, και τη βινκουλίνη. Είναι επίσης γνωστό ότι τα οπιοειδή επάγουν τη φωσφορυλίωση της FAK και της βινκουλίνης σε εμβρυικούς νευρώνες (Mangoura et.al.,1997).

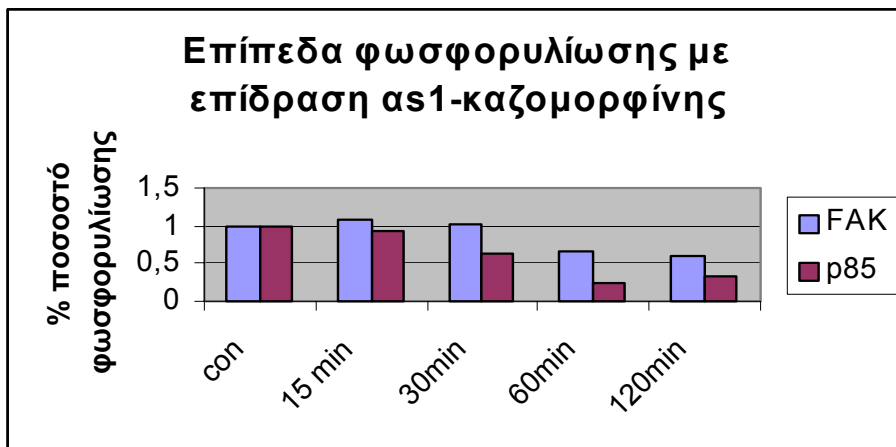
Για να διερευνήσουμε αν η φωσφορυλίωση της FAK σε τυροσίνη, είναι αποτέλεσμα της δράσης των οπιοειδών χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης. Τα κύτταρα Caki-2 επώαστηκαν με τους οπιοειδείς αγωνιστές αιθυλκετοκυκλοζοσίνη και  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνη για 15, 30, 60 και 120 λεπτά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα (1000 $\mu$ g ολικών πρωτεϊνών) ανοσοκατακρημνίστηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της φωσφοτυροσίνης και αναλύθηκαν περαιτέρω με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, μαζί με ίσες ποσότητες (100 $\mu$ g) ολικών εκχυλισμάτων (εικόνα 3).

Επώαση της νιτροκυτταρίνης με τα μονοκλωνικά αντισώματα των πρωτεϊνών FAK, βινκουλίνη, παξιλλίνη και p85 έδειξε ότι το ποσοστό φωσφορυλίωσης της FAK και της παξιλλίνης σε τυροσίνη ήταν υψηλό σε κύτταρα που επώαστηκαν για 15 και 30 λεπτά με αιθυλκετοκυκλοαζοσίνη ως προς τα κύτταρα μάρτυρες, (σχήμα 8, εικόνα 3A), ενώ η p85 φωσφορυλιωνόταν ελάχιστα παρουσία οπιοειδών. Για την εξαγωγή των παρακάτω αποτελεσμάτων ελήφθησαν υπόψιν οι λόγοι των επιπέδων των φωσφορυλιωμένων προς των επιπέδων των ολικών πρωτεϊνών.

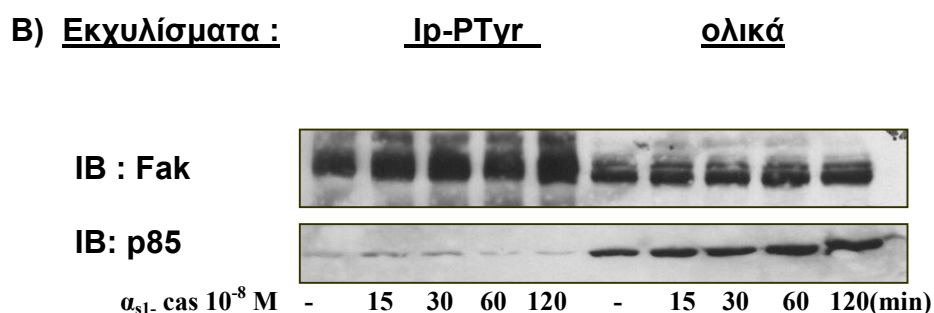
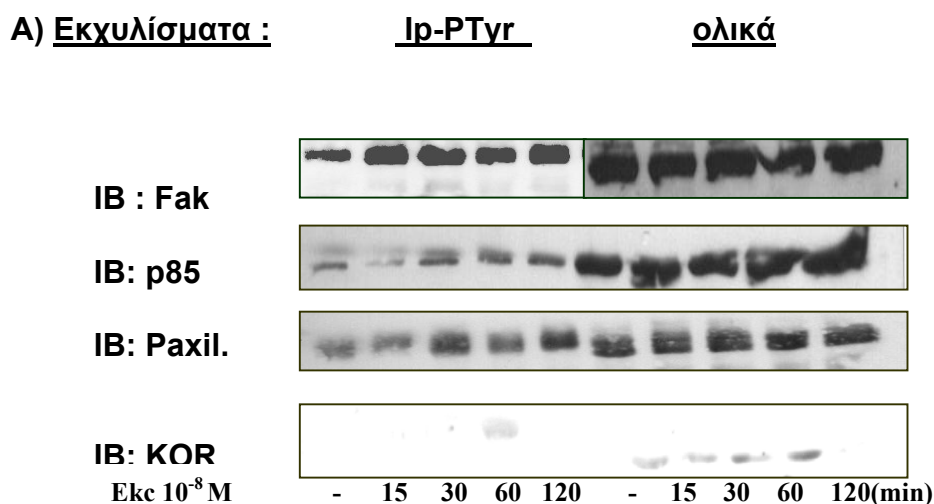


**Σχήμα 8.** Επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών FAK, Paxillin και της υπομονάδας p85 της PI-3 κινάσης, μετά από επώαση με  $10^{-8}$  M αιθυλκετοκυκλοαζοσίνη για 15, 30, 60 και 120 λεπτά.

Αντίθετα με τα αποτελέσματα της ΕΚC, η φωσφορυλίωση της FAK στα κύτταρα Caki-2, με επίδραση με  $\alpha_{s1}$  καζομορφίνης δε φαίνεται να είναι σημαντική, όπως και η φωσφορυλίωση της υπομονάδας p85 της PI-3 κινάσης (σχήμα 9, εικόνα 3B). Επίσης με τη χρήση του ειδικού αντισώματος ενάντια στον υποδοχέα των κ-οπιοειδών, παρατηρήθηκε η έκφρασή του στα ολικά εκχυλίσματα μετά από την επώαση με τα οπιοειδή, ενώ δεν παρατηρήθηκε ισχυρή φωσφορυλίωση του σε τυροσίνη (εικόνα 3A).



**Σχήμα 9.** Επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών FAK και της υπομονάδας p85 της PI-3 κινάσης, μετά από επώαση με  $10^{-8}$  M α<sub>s1</sub>-καζομορφίνη για 15, 30, 60 και 120 λεπτά.



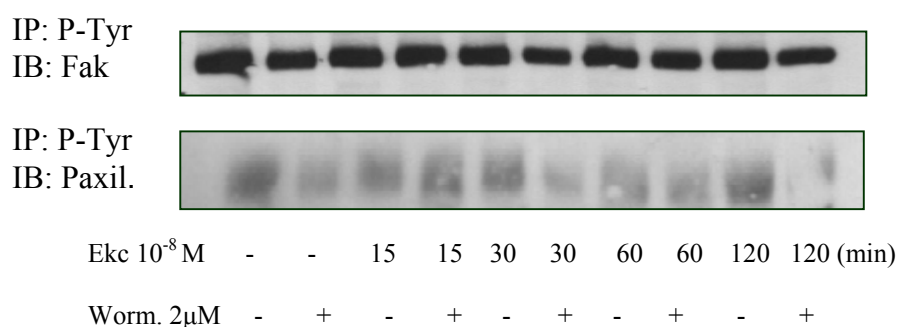
**Εικόνα 3.** Επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Fak, Paxillin και p85 και του υποδοχέα των οπιοειδών (KOR) και επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών μετά από επώαση Α) με  $10^{-8}$  M αιθυλκετοκυκλοαζοσίνη και Β) με  $10^{-8}$  M α<sub>s1</sub>-καζομορφίνη για 15, 30, 60 και 120 λεπτά.

Το γεγονός ότι η υπομονάδα p85 της PI-3 δεν φωσφορυλιώνεται παρουσία οπιοειδών δεν αποκλείει το γεγονός ενεργοποίησής της, όπως έδειξαν πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα στο εργαστήριό μας. Επίσης προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι παρόλο που οι πρωτεΐνες Fak, Paxillin και p85 δεν φωσφορυλιώνονται



παρουσία οπιοειδών (Papakonstanti et. al. 1998), παρατηρείται ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης, στα φυσιολογικά OK, μέσω της οικογένειας των p21 ενεργοποιημένων κινασών (Papakonstanti et. al. 2002).

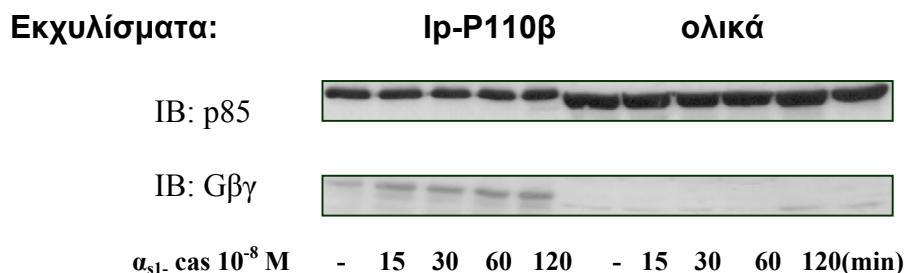
Προκειμένου να διερευνήσουμε την πιθανή σχέση ενεργοποίησης της PI-3 κινάσης με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Fak και Παξιλλίνη παρουσία του οπιοειδούς EKC, επαναλάβαμε το πείραμα παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα (Sano et. al., 2000) της PI-3 κινάσης, τη Βορτμανίνη (Wortmannin). Επώση των καρκινικών κυττάρων Caki-2 με το οπιοειδές EKC παρουσία του αναστολέα, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Fak και Παξιλλίνη, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, απουσία του οπιοειδούς EKC (εικόνα 4), γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή της PI-3 στο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη δημιουργία εστιών πρόσφυσης.



**Εικόνα 4.** Ανοσοκατακρήμνιση με φωσφοτυροσίνη παρουσία του αναστολέα, Βορτμανίνη με συγκέντρωση 2μM. Επώση με Βορτμανίνη μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Fak και Παξιλλίνη από τη δράση της EKC 10<sup>-8</sup>M.

### 3.5 Αλληλεπίδραση των υπομονάδων της PI-3 κινάσης παρουσία οπιοειδών με τις υπομονάδες Gβγ στα καρκινικά κύτταρα Caki-2.

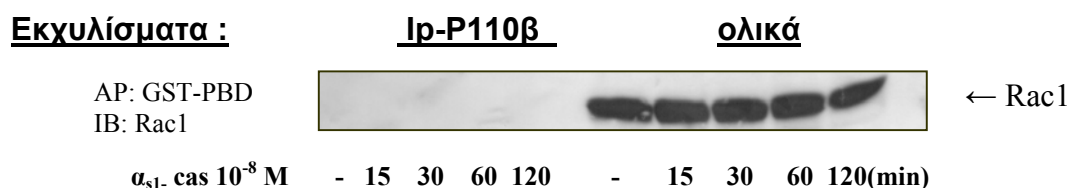
Γνωρίζουμε ότι οι υποδοχείς των οπιοειδών συζεύγνται με τις τριμερείς G πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των PI-3 και PAK-1. Αυτή η τάξη των υποδοχέων συνδέεται με την ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης κατά την απελευθέρωση των Gβγ υπομονάδων από την α-υπομονάδα, όταν η τελευταία ενεργοποιείται με σύνδεση με το GTP. Επειδή έχει δείχτει πρόσφατα ότι η απελευθέρωση των Gβγ από τους υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με τις πρωτεΐνες G (GPCRs) ενεργοποιεί την PI-3 κινάση β (Murga et. al., 2000), εξετάσαμε εάν ισχύει αυτός ο μηχανισμός στο σύστημά μας. Για το λόγο αυτό, μετά την επίδραση με τα οπιοειδή ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα κατά της υπομονάδας p110β και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα κατά των Gβγ υπομονάδων. Η ανοσοαποτύπωση με το ειδικό αντίσωμα των Gβγ έδειξε ότι συγκατακρημνίζονται με την υπομονάδα p110β, ενώ με αφαίρεση των πρωτεϊνικών κηλίδων της νιτροκυτταρίνης και επώση με το αντίσωμα κατά της ρυθμιστικής υπομονάδας (p85), έγινε ορατή η συγκατακρήμνιση της ρυθμιστικής και της καταλυτικής υπομονάδας της PI-3 κινάσης (εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Μετά από επώαση με  $\alpha_{s1}$ - cas  $10^{-8}$  M ίσοι όγκοι κυτταρικών εκχυλισμάτων ανοσοκατακρήμνιστηκαν με το αντίσωμα της p-110β, ενώ με ανοσοαποτύπωση ανιχνεύθηκαν οι Gβγ και p85 να συγκατακρήμνίζονται με την καταλυτική υπομονάδα p110.

### 3.6 Τα οπιοειδή δεν ενεργοποιούν τις μικρές GTPασες, Rac1 και Cdc 42.

Επειδή ένα επόμενο βήμα από την ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης είναι η ενεργοποίηση των μικρών GTPασών Cdc42 και Rac1, που εμπλέκονται σε μορφολογικές αλλαγές (Hall 1998), εξετάσαμε αν οι μικρές GTPασες ενεργοποιούνται από την επίδραση των οπιοειδών. Έγιναν πειράματα κατακρήμνισης λόγω συγγένειας με την GST-fusion πρωτεΐνη που ανταποκρίνεται στο p21 κομμάτι σύνδεσης της PAK1 (GST-PBD), το οποίο συνδέεται ειδικά με τις ενεργές Cdc42-GTP και Rac-GTP, σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (Benard et. al., 1999). Με χρήση των αντίστοιχων αντισωμάτων έγινε η ανίχνευση των αντίστοιχων ενεργών πρωτεϊνών Rac1-GTP (εικόνα 6) και Cdc42-GTP, που όπως έδειξε, οι μικρές GTPασες δεν ενεργοποιούνται από την επίδραση των δύο οπιοειδών.



**Εικόνα 6.** Ανίχνευση της πρωτεΐνης Rac1 μετά από κατακρήμνιση συγγένειας με τη GTP-PBD συνδεδεμένη γλουταθειόνη σε σφαιρίδια αгарόζης και σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Caki-2 μετά από επώαση με  $\alpha_{s1}$  .cas για 15, 30, 60 και 120 λεπτά.

#### 4. Συζήτηση αποτελεσμάτων και προοπτικές.

Είναι γνωστό ότι ο κυτταροσκελετός συμμετέχει σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, όπως την κυτταρική διαίρεση, την ανάπτυξη των κυττάρων και σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σε νεοπλασματικά κύτταρα οι αλλαγές του κυτταροσκελετού συνοδεύονται από αύξηση του λόγου μονομερούς/ολική ακτίνη (G/Total) (Stournaras 1996). Αυτό σημαίνει ότι αυξάνεται η μονομερής ακτίνη στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, γεγονός που συνοδεύεται από αποδιοργάνωση των μικροϊνιδίων.

Τα οπιοειδή όπως είναι γνωστό αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων νεοπλασματικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων του μαστού (Kampa et al., 1996). Δρουν μέσω των κ<sub>i</sub> θέσεων σύνδεσης και προκαλούν αλλαγές στη δυναμική του πολυμερισμού της ακτίνης και την οργάνωση των μικροϊνιδίων της στα φυσιολογικά εγγύς νεφροσωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (OK: Opossum Kidney cells), γεγονός που σχετίζεται με την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Papakonstanti et al., 1998).

Μία ακόμα πιο πρόσφατη εργασία, στο εργαστήριο όπου εκπονήθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, στα κύτταρα OK, έδειξε ότι η επίδραση των οπιοειδών στις παραπάνω συνθήκες, επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης της PAK1, μέσω της PI-3, χωρίς να ενεργοποιούνται τα ενδιάμεσα, Cdc42/Rac ή Akt. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι μικρές GTPάσες δεν περιλαμβάνονται στην αλληλεπίδραση PI-3-PAK1 (Papakonstanti et al., 2002).

Βασίζόμενοι λοιπόν στο καλά μελετημένο μονοπάτι μεταφοράς σήματος στα επιθηλιακά κύτταρα από εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (OK), υπό την επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών α<sub>S1</sub> καζομορφίνη και αιθυλκετοκυκλαζοσίνη, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση τους στη μεταγωγή σήματος στους κυτταρικούς κλώνους των OK, που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη ακτίνη με καλά χαρακτηρισμένο φαινότυπο (Tsapara et al., 1999) και στα καρκινικά, μη μεταστατικά κύτταρα από εγγύς νεφροσωληναριακό ανθρώπινο επιθήλιο, Caki-2.

Διερευνήσαμε την πιθανή συμμετοχή των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη, των πρωτεϊνών των εστιών πρόσφυσης και των μικρών GTPασών, καθώς και τις μεταβολές στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (FAK, PI3 κινάση, ταλίνη, βινκουλίνη και παξιλλίνη) πριν την επίδραση των οπιοειδών στο σύστημα αυτό.

Από τη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία των εστιών πρόσφυσης και των μικρών GTPασών, στους μόνιμους κυτταρικούς κλώνους των OK, ως προς τα φυσιολογικά OK κύτταρα. Επίσης τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών FAK και παξιλλίνη μεταβάλλονται με ανάλογο τρόπο, γεγονός που υποδεικνύει ότι συμμετέχουν από κοινού στη μετάδοση του μηνύματος στους συγκεκριμένους κλώνους.

Εν συνεχεία ακολούθησε η επίδραση των οπιοειδών α<sub>S1</sub>-cas και EKC, καθώς και του παράγοντα TNF-α που οδήγησαν σε αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους μεταλλαγμένους κυτταρικούς κλώνους των OK με παρατηρούμενη αύξηση του λόγου μονομερούς/ολική ακτίνη, αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει την κοινή δράση των παραπάνω παραγόντων στα φυσιολογικά και στα μεταλλαγμένα OK (Papakonstanti et al., 1998).

Γνωρίζοντας λοιπόν τη δράση των οπιοειδών σε φυσιολογικά και μεταλλαγμένα OK κύτταρα, θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση τους στη δυναμική ισορροπία του πολυμερισμού της ακτίνης στα αντίστοιχα ανθρώπινα

καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού Caki-2. Η επίδραση δύο διαφορετικών οπιοειδών αγωνιστών, της αιθυλκετοκυκλοζοσίνης και της  $\alpha_{s1}$ -καζομορφίνης, ήταν διαφορετική στη δυναμική πολυμερισμού της ακτίνης. Η καζομορφίνη επέφερε παροδική αύξηση του λόγου μονομερούς/πολυμερή ακτίνη (G/F) στο μέγιστο δράσης 30 λεπτά, αποτέλεσμα κοινό με τα φυσιολογικά OK, αλλά η καζομορφίνη επέφερε συνεχιζόμενη μείωση του λόγου G/F, γεγονός που ερμηνεύεται ως επαγόμενη με το χρόνο αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης.

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα η φωσφορυλίωση των εστιών πρόσφυσης ρυθμίζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και όπως είναι πολύ γνωστό και από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας, ο πολυμερισμός της ακτίνης σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των εστιών πρόσφυσης, όπως των Fak, paxillin και vinculin, με επίδραση του παράγοντα TNF- $\alpha$  και της δεξαμεθαζόνης (Koukouritaki et. al., 1999b).

Για να διερευνήσουμε παραπέρα τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον πιθανό μηχανισμό πολυμερισμού/αποπολυμερισμού της ακτίνης, μελετήσαμε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης των εστιών πρόσφυσης FAK (Focal Adhesion Kinase) και την ενδεχόμενη αλληλεπίδρασή της με την κινάση-3 των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI-3 κινάση). Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με το μονοκλωνικό αντίσωμα της φωσφοτυροσίνης, έδειξαν ισχυρή φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό των εστιών πρόσφυσης, Fak και Paxillin, υπό την επίδραση 15 και 30 λεπτών EKC, γεγονός που επιβεβαιώνει τα μέχρι τώρα δεδομένα. Η υπομονάδα p85 της PI-3 κινάσης φωσφορυλιώνεται ελάχιστα παρουσία των δύο οπιοειδών αγωνιστών, ενώ η βινκουλίνη καθόλου. Επίσης η επίδραση των οπιοειδών δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών.

Όσον αφορά το μονοπάτι φωσφορυλίωσης σε τυροσίνη με επίδραση καζομορφίνης, αυτό δε φαίνεται να είναι ενεργό στα καρκινικά κύτταρα OK, γεγονός που συμφωνεί με την παραπάνω δυναμική αποπολυμερισμού της ακτίνης. Επειδή γνωρίζουμε ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες εμπλέκονται στο σχηματισμό συνδέσμων επαφής των κυττάρων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το οπιοειδές EKC με τη συμπεριφορά που έχει φαίνεται να αυξάνει τη συνοχή των κυττάρων, ενώ η καζομορφίνη οδηγεί στη μετανάστευσή τους.

Το γεγονός ότι η υπομονάδα p85 της PI-3 δεν φωσφορυλιώνεται παρουσία οπιοειδών δεν αποκλείει το γεγονός ενεργοποίησής της, όπως έδειξαν πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα στο εργαστήριό μας. Επίσης προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι παρόλο που δεν φωσφορυλιώνονται παρουσία οπιοειδών οι πρωτεΐνες Fak, Paxillin και p85 (Papakonstanti et. al. 1998) παρατηρείται ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης, στα φυσιολογικά OK, μέσω της οικογένειας των p21 ενεργοποιημένων κινασών, παρουσία οπιοειδών (Papakonstanti et. al. 2002).

Για να εξακριβώσουμε την πιθανή συμμετοχή της PI-3 κινάσης στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών παρουσία του οπιοειδούς EKC, χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα της PI-3 κινάσης, τη βορτμανίνη (wortmannin). Επώση των καρκινικών κυττάρων Caki-2 με το οπιοειδές EKC παρουσία του αναστολέα, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Fak και παξιλλίνη, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, απουσία του οπιοειδούς EKC, γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή της PI-3 στο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη δημιουργία εστιών πρόσφυσης.

Επειδή στην ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης εμπλέκονται και οι μικρές GTPάσες Cdc42 και Rac1, που είναι υπεύθυνες για μορφολογικές αλλαγές (Hall 1998), εξετάσαμε αν οι μικρές GTPάσες ενεργοποιούνται από την επίδραση των οπιοειδών. Πειράματα κατακρήμνισης λόγω συγγένειας με τη GST-fusion πρωτεΐνη

που ανταποκρίνεται στο p21 κομμάτι σύνδεσης της PAK1 (GST-PBD), το οποίο συνδέεται ειδικά με τις ενεργές Cdc42-GTP και Rac-GTP, και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση των αντίστοιχων αντισωμάτων για την ανίχνευση των αντίστοιχων ενεργών πρωτεϊνών Rac1-GTP και Cdc42-GTP, έδειξε ότι οι μικρές GTPασες δεν ενεργοποιούνται από την επίδραση των δύο οπιοειδών, αποτέλεσμα που υποδεικνύει μια κοινή συμπεριφορά των καρκινικών με τα φυσιολογικά OK κύτταρα στη μετάδοση του μηνύματος (Papakonstanti et. al., 2002).

Τέλος η διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των οπιοειδών στα εν λόγω καρκινικά κύτταρα, υπόθεση που πηγάζει από τα ευρήματα του μηχανισμού δράσης τους στα φυσιολογικά νεφροσωληναριακά κύτταρα, αποτελεί μελλοντικό στόχο μελέτης. Η συνέχιση της μελέτης αυτής, σχετικά με την αντικαρκινική δράση των οπιοειδών, τα οποία μέχρι τώρα χρησιμοποιούνται ως ισχυρά αναλγητικά, μέσω των μεταβολών του κυτταροσκελετού της ακτίνης που θα οδηγεί στο φαινόμενο της απόπτωσης, είναι ιδιαίτερης σημασίας. Τα προσδοκώμενα αποτελέσματα θα επιτρέψουν τη συσχέτιση μεταξύ λειτουργικών αποκρίσεων, μετά από δράση οπιοειδών, καρκινικών εγγύς σωληναριακών κυττάρων με ενδεχόμενες μεταβολές στη δομή, αρχιτεκτονική οργάνωση, πολυμερισμό ή διασύνδεση των μακρομορίων και επιμέρους τμημάτων του κυτταροσκελετού τους. Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των οπιοειδών στα καρκινικά κύτταρα, δεδομένου ότι έχουμε ήδη αναλύσει το μηχανισμό δράσης τους σε αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα, θα βοηθήσει τόσο στην πλήρη κατανόηση της φυσιολογίας του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου του νεφρώνα, όσο και στη βελτίωση θεραπευτικών μεθόδων του νεφρικού καρκίνου.

Η σημασία των προσδοκώμενων αποτελεσμάτων, δηλαδή της πλήρους γνώσης του μοριακού μηχανισμού που οδηγεί σε απόπτωση τα καρκινικά κύτταρα και είναι διαφορετικός από αυτό των φυσιολογικών, θα είναι ορατή με την ανίχνευση μορίων που θα ενεργοποιούν το μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου εξειδικευμένα στα καρκινικά κύτταρα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ayscough KR, 1998, In vivo functions of actin binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 102-111
- Appleyard, S.M., McLaughlin, J.P. and Chavkin, C. (2000) Tyrosine phosphorylation of the kappa opioid receptors regulates agonist efficacy. *J Biol Chem*,
- Begg D.A., Rodewald R., and Rebhun L.I. The visualization of actin filament polarity in thin sections. Evidence for the uniform polarity of membrane-associated filaments. *J Cell Biol* 79(3): 846-52, 1978.
- Bokoch G.M., Vlahos C.J., Wang Y., Knaus U.G., and Traynor-Kaplan A.E. Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* 315 ( Pt 3): 775-9, 1996.
- Bonder E.M., and Mooseker M.S. Direct electron microscopic visualization of barbed end capping and filament cutting by intestinal microvillar 95-kdalton protein (villin): a new actin assembly assay using the *Limulus* acrosomal process. *J Cell Biol* 96(4): 1097-107, 1983.
- Bonder E.M., Fishkind D.J., and Mooseker M.S. Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* 34(2): 491-501, 1983.
- Burridge K., and Mangeat P. An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308(5961): 744-6, 1984.
- Burridge K. and Chrzanowska-Wodnicka M, 1996, Focal adhesions, contractility and signalling, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12 : 463-519
- Chen, H-C., Appedu, P.A., Isoda, H. and Guan, J-L. (1996). Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol. Chem*, 271, 26329-26334.
- R. Hugh Daniels and Gary M. Bokoch p21-Activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *TIBS* 24, Sept 1999.
- Defillipi Paola, Olivo Christina, Venturino Mascia, Dolce Laura, Silengo Lorenzo and Tarone Guido. Actin Cytoskeleton Organization in Response to Integrin-mediated Adhesion. *Microscopy Research and Technique* 47, 67-78, 1999.
- Drewes G and Faulstich H. 1990, The enhanced ATPase activity of glutathione-substituted actin provides a quantitative approach to filament stabilization , *J. Biol Chem.*, 265: 3017-3021
- Drewes G and Faulstich H. 1993, Cooperative effects on filament stability in actin modified at the C-terminus by substitution or truncation, *Eur. J. Biochem.*, 212 : 247-253
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (Wash. DC)* 279: 509-514, 1998.
- Hall A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 10: 31-54, 1994.
- Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Papakonstanti E., Stournaras C., Emmanouel D.S., and Castanas E. Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth. *J Cell Biochem* 63(4): 410-21, 1996.
- Jeffrey W. Thomas, Marion A. Cooley, Jill M. Broome, Ravi Salgia, James D. Griffin, Christian R. Lombardo and Michael D. Schaller, The Role of Focal Adhesion

- Kinase Binding in the Regulation of Tyrosine Phosphorylation of Paxillin. The Journal of Biol. Chem, Vo 274, 51, pp. 36684-36692, 1999.
- R.J. Jones, V.G. Brunton, M.C. Frame Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. European Journal of Cancer 36 (2000) 1595-1600 June 2000.
- Kabsh W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF and Holmes KC, 1990, Atomic structure of actin: DNase I complex, Nature, 347: 37-44
- Kampa M., Bakogeorgou E., Hatzoglou A., Damianaki A., Martin P.M., and Castanas E. Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. Eur J Pharmacol 335: 255-65, 1997.
- Kampa M., Loukas S., Hatzoglou A., Martin P., Martin P.M., and Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). Biochem J 319: 903-8, 1996.
- Karleen M. Nicholson, Neil G. Anderson. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cel. Signal. 14, pp. 381-395, 2001.
- Ulla G. Knaus, Gary M. Bokoch. The p-21 Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs), the International Journal of Bioch. & Cell Biol., 857-862, 1998.
- Korn E.D., Carlier M.F., and Pantaloni D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. Science 238(4827): 638-44, 1987.
- Korn E.D., Actin polymerization and its regulation by proteins from non muscle cells, Physiol. Rev., 62 : 672-737, 1982.
- Koukouritaki S.B., Theodoropoulos P.A., Margioris A.N., Gravanis A., and Stournaras C. Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. J. Cell. Biochem. 62: 251-261, 1996.
- Koukouritaki S.B., Vardaki E., Papakonstanti E.A., Lianos E., Stournaras C., and Emmanouel D.S. TNF- induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase. Molecular Medicine, 5: 382-392, 1999 b.
- Koukouritaki SB, Gravanis A, Stournaras C. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin regulates the signaling mechanism of the rapid nongenomic action of dexamethasone on actin cytoskeleton Mol Med Nov;5(11):731- 42, 1999a.
- Koyama H., Goodpasture C., Miller M.M., Teplitz R.L., and Riggs A.D. Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). In Vitro 14(3): 239-46, 1978.
- Luna EJ and Hitt A, 1992 Cytoskeleton-plasma membrane Interactions, Science 258 : 955-964
- Machesky L.M, and Hall A. Rho: A connection between membrane receptor signaling and the cytoskeleton. Trends Cell Biol. 6: 304-310, 1996.
- Machesky L.M., and Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. J. Cell Biol. 138: 913-926, 1997.
- Schafer DA, Welch MD, Machesky LM, Bridgman PC, Meyer SM, Cooper JA. Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. J Cell Biol. 1998 Dec 28;143(7):1919-30.

- Moustakas A., and Stournaras C.  
Regulation of Actin Organisation by TGF- $\beta$  in H-ras-Transformed Fibroblasts. *J Cell Sci.*, 1999.
- Papakonstanti EA, Emmanouel DS, Gravanis A, Stournaras C. PLC-gamma1 signaling pathway and villin activation are involved in actin cytoskeleton reorganization induced by Na<sup>+</sup>/Pi cotransport up-regulation. *Mol Med* 2000 Apr;6 (4): 303-318
- Papakonstanti EA, Bakogeorgou E, Castanas E, Emmanouel DS, Hartig R, Stournaras C. Early alterations of actin cytoskeleton in OK cells by opioids. *J Cell Biochem.* 1998 Jul 1;70(1):60-9.
- Papakonstanti EA, Emmanouel DS, Gravanis A, Stournaras C.  
Na<sup>+</sup>/Pi co-transport alters rapidly cytoskeletal protein polymerization dynamics in opossum kidney cells. *Biochem J.* 1996 Apr 1;315 ( Pt 1):241-7
- Papakonstanti EA, and Stournaras C. Association of PI-3 Kinase with PAK1 Leads to Actin Phosphorylation and Cytoskeletal Reorganization. *Mol. Biol. Of the Cell*, Vol 13, 2946-2962, Aug. 2002.
- Pavalko F.M., Otey C.A., Simon K.O., and Burridge K. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans* 19(4): 1065-9, 1991
- Pollard T.D., and Cooper J.A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55: 987-1035, 1986.
- Pollard T.D., 1990, *Actin Curr. Opin. Cell Biol.*, 2: 33-40
- Ponte P, Gunning P, Blau H and Kebes L, 1983, Human actin genes are single copy for  $\alpha$ -skeletal  $\alpha$ -cardiac actin but multicopy for  $\beta$ - and  $\gamma$ -cytoskeletal genes : 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution, *Mol. Cell Biol.* 3: 1783-1791
- Rozycki MD, Myslik JC, Schutt CE, Lindberg U. Structural aspects of actin-binding proteins *Curr Opin Cell Biol* 1994 Feb;6(1):87-95
- Sanger JM and Sanger JW, 1980, Banding and polarity of actin filaments in interface and cleaving cells, *J. Cell Biol.*, 86: 568-575
- Sanger JM, Sanger JM and Jackusch, 1983, Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells, *J. Cell Biol.*, 96: 961-969
- Small JV, Rottner K, Kaverina I and Anderson KI, 1998, Assembling of actin cytoskeleton for cell attachment and movement, *Biochim. Biophys. Acta* 1404: 271-281
- Stossel T.P. Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* 99(1 Pt 2): 15s-21s, 1984
- Stournaras C, Drewes G, Blackholm H, Merkler I, Faulstich H. Glutathionyl(cysteine-374) actin forms filaments of low mechanical stability. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jan 19;1037(1):86-91.
- Stournaras, C., Stiakaki, E., Koukouritaki, S. B., Theodoropoulos, P. A., Kalmanti, M., Fostinis Y., and Gravanis, A. (1996). Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1339-1346.
- Tadaomi Takenawa, Toshiki Itoh, Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1533 190-206, 2001.
- Masahito Tamura, Jianguo Gu, Eric H. J. Danen, Takahisa Takino, Shingo Miyamoto and Kenneth M. Yamada. PTEN Interaction with Focal Adhesion Kinase and



- Suppression of the Extracellular Matrix-depedent Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway Apr. Journal of Biol. Chem. 20693-20703,1999.
- Tapon N., and Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9(1): 86-92, 1997.
- Tolias K.F., Cantley L.C., and Carpenter C.L. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 270(30): 17656-9, 1995.
- Tsapara A, Kardassis D, Moustakas A, Gravanis A, Stournaras C. Expression and characterization of Cys374 mutated human beta-actin in two different mammalian cell lines: impaired microfilament organization and stability. *FEBS Lett* 1999 Jul 16; 455(1-2): 117-22.
- Vandekerckhove J., and Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 122: 783-802, 1978.
- Vandekerckhove J, 1990 , Actin binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2 41-50.
- Igor Vivanco and Charles L. Sawyers. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway In Human Cancer. *Nature*, Vol 2, 489-501, 2002.
- Wachsstock D.H., Wilkins J.A., and Lin S. Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun* 146(2): 554-60, 1987
- Wymann P. Mathias, Luciano Pirola. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *BBA* 1436, 127-150, 1998.
- Bob van de Water, J. Fred Nagelkerke and James L. Stevens. *The Journal of Biol. Chem.* Vol 274, No19, pp. 13328-13337, May 1999
- Yamada K.M., and Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 76-85, 1997.
- Yamada Kenneh M. and Masaru Araki, Tumor suppressor PTEN : modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science* 114 (13).
- Zimmerle C.T., and Frieden C. Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry* 25(21): 6432-8, 1986.