

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

" Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP-90 με πρωτεΐνες και δομές του Κυτταροσκελετού "

Γιάννης Φωστήνης

Διδακτορική Διατριβή

Ηράκλειο, 1996

" Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP-90 με πρωτεΐνες και δομές του Κυτταροσκελετού "

Γιάννης Φωστίνης

Πτυχιούχος Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, 1984

Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο του Διδάκτορα Ιατρικής Επιστήμης με έμφαση στη Βιοχημεία

Εγκρίθηκε από την επταμελή εξεταστική επιτροπή :

<u>ΠΡΟΕΔΡΟΣ</u> :	Χ. Στουρνάρας	(Αναπλ. Καθ. - Παν/μιο Κρήτης)
<u>ΜΕΛΗ</u> :	Κ. Σέκερης	(Καθηγητής - Παν/μιο Αθηνών)
	Α. Γραβάνης	(Αναπλ. Καθ. - Παν/μιο Κρήτης)
	Δ. Εμμανουήλ	(Καθηγητής - Παν/μιο Κρήτης)
	Ε. Σαββάκη	(Καθηγήτρια - Παν/μιο Κρήτης)
	Α. Μαργιωρής	(Αναπλ. Καθ. - Παν/μιο Κρήτης)
	Π. Θεοδωρόπουλος	(Λέκτορας - Παν/μιο Κρήτης)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ένα από τα πλέον πολύπλοκα συστήματα του ανθρώπινου, και όχι μόνον, οργανισμού είναι το ενδοκρινικό. Πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο έχει σαν σκοπό να προσαρμόζει την δραστηριότητα των υπόλοιπων συστημάτων του οργανισμού, ώστε αυτά να ανταποκρίνονται στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις του εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος. Ο σκοπός αυτός επιτυγχάνεται με την έκκριση των ορμονών. Οι ορμόνες είναι ουσίες οι οποίες παράγονται από τους ενδοκρινείς αδένες και ελευθερώνονται στο αίμα. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φθάνουν τελικά στα κύτταρα “στόχους”, στα οποία δρουν μέσω υποδοχέων. Οι μηχανισμοί δράσης των ορμονών στα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό πεδίο έρευνας με προφανείς προεκτάσεις τόσο από βιοχημική - βιολογική όσο και από ιατρική - φαρμακευτική σκοπιά.

Κάθε κύτταρο διαθέτει, κατ’ αναλογία με τον σκελετό των οστών του σώματος, έναν πολύπλοκο ινιδιακό “σκελετό” πρωτεϊνικής φύσεως, τον Κυτταροσκελετό. Ο “σκελετός” αυτός καλείται να επιτελεί δύο βασικές λειτουργίες : αφενός μεν να δημιουργεί ένα στηρικτικό πλέγμα για το κύτταρο και τα συστατικά του, αφετέρου δε να συμμετέχει λειτουργικά σε μηχανισμούς μετακίνησης ολόκληρων κυττάρων ή οργανιδίων μέσα στο κύτταρο, αλλά και σε διάφορες ενδοκυτταρικές διαδικασίες. Την πιθανή συμμετοχή, λοιπόν, του “σκελετού” αυτού σε ορμονική δράση, και συγκεκριμένα στην οιστρογονική δράση, προσπάθησα να διερευνήσω στην παρούσα εργασία.

Η πρώτη προσέγγιση του ερωτήματος αφορούσε στο εάν ο κυτταροσκελετός συμμετέχει άμεσα, δηλαδή ως αποδέκτης, στην οιστρογονική δράση. Τα αποτελέσματα της προσέγγισης αυτής οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο κυτταροσκελετός δεν φαίνεται να αποτελεί αποδέκτη της δράσης των οιστρογόνων. Η επόμενη όμως προσέγγιση, η οποία αφορούσε στο εάν ο κυτταροσκελετός συμμετέχει έμμεσα στην οιστρογονική δράση, οδήγησε σε πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της προσέγγισης αυτής μας επέτρεψαν να υποθέσουμε βάσιμα την αλληλεπίδραση του κυτταροσκελετού με μια λειτουργική υπομονάδα του υποδοχέα όλων των στεροειδών ορμονών, την πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP-90, αλληλεπίδραση η οποία θα μπορούσε να υποστηρίξει ένα μοντέλο μετακίνησης του υποδοχέα μέσω του κυτταροσκελετού από το κυτταρόπλασμα μέχρι τον πυρήνα.

Η δράση των στεροειδών ορμονών είναι, ως γνωστόν, έμμεση. Οι στεροειδείς ορμόνες εισέρχονται μέσα στο κύτταρο “στόχος” παθητικά και καταλήγουν μέχρι τον πυρήνα όπου και συνδέονται με τους υποδοχείς τους. Οι υποδοχείς, ενεργοποιημένοι πλέον, εκφράζουν την στεροειδική δράση. Θέλω να

πιστεύω ότι τα συμπεράσματα της εργασίας αυτής αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την περαιτέρω προσπάθεια της πλήρους διαλεύκανσης του μηχανισμού μετακίνησης των υποδοχέων από την κυτταροπλασματική περιοχή σύνθεσης στην πυρηνική περιοχή ενεργοποίησης τους, ουσιαστικά δηλαδή στην προσπάθεια της πλήρους διαλεύκανσης του μηχανισμού της δράσης των στεροειδών ορμονών.

Τελειώνοντας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από τη θέση αυτή τον Αναπλ. Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης Χ. Στουρνάρα για την εποπτεία που άσκησε στην εργασία μου και για τις πολύτιμες οδηγίες και υποδείξεις του οι οποίες συνετέλεσαν στην καλύτερη παρουσίαση της διατριβής.

Πρέπει ακόμη να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή του ίδιου Πανεπιστημίου Α. Γραβάνη για την πολύπλευρη και πολύτιμη βοήθεια του στη εκπόνηση της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών Κ. Σέκερη για τις σημαντικές παρατηρήσεις του κατά την εκπόνηση της διατριβής, καθώς και την Dr. M. Catelli (Lab. Hormones, Bicetre, France) για τις πολύ χρήσιμες συζητήσεις της.

Θα ήταν, τέλος, παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω το επιστημονικό προσωπικό όλων των εργαστηρίων του Τομέα Βασικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης, και βεβαίως περισσότερο το προσωπικό του Εργαστηρίου της Βιοχημείας του Κυτταροσκελετού, για την υποστήριξη, επιστημονική και όχι μόνον, που μου προσέφεραν στις δύσκολες στιγμές που εκ των πραγμάτων συναντά κανείς κατά τη διάρκεια της εκπόνησης μιας εργασίας σαν την παρούσα.

Ηράκλειο Κρήτης , 1996

Γιάννης Π. Φωστίνης

στη μνήμη του πατέρα μου

στη Μαρία

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ADP	: Διφωσφορική αδενοσίνη
AR	: Υποδοχείς ανδρογόνων
Arg	: Αργινίνη
ATP	: Τριφωσφορική αδενοσίνη
Bis	: N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο
BSA	: Αλβουμίνη ορού βοός
CTP	: Τριφωσφορική κυτιδίνη
Cys	: Κυστεΐνη
DMSO	: Διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DNA	: Δισοξυ-ριβονουκλεϊκό οξύ
DTT	: Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	: Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EI	: Ενδιάμεσα ινίδια
EGTA	: Αιθυλενογλυκολ-δισ-(β-αμινοαιθυλαιθέρας)-N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ
ER	: Υποδοχείς οιστρογόνων
FBS	: Εμβρυϊκός ορός βοός
FITC	: Ισοθιοκυανική φθορεσκεΐνη
GAFP	: Οξίνη ινώδης πρωτεΐνη της γλοίας
GDP	: Διφωσφορική γουανοσίνη
GR	: Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών
GTP	: Τριφωσφορική γουανοσίνη
Hepes	: N-(2-υδροξυαιθυλο)-πιπεραζίνη-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
HRE	: Ορμονορυθμιζόμενα στοιχεία γονιδίων
HRP	: Υπεροξειδάση από ρεπάνια
HSP	: Πρωτεΐνες θερμικού σοκ
IgG	: Ανοσοσφαιρίνη Γ
KΣ	: Κυτταροσκελετός
Lys	: Λυσίνη
MAPs	: Πρωτεΐνες που συνδέονται με μικροσωληνίσκους
MI	: Μικροϊνίδια
MΣ	: Μικροσωληνίσκοι
MOPS	: Μορφολινο-προπανο-σουλφονικό οξύ
MTOC	: Κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων
PBS	: Ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα: 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4

Pipes	: Πιπεραζίνη-N,N'-δισ(2-αιθανοσουλφονικό οξύ)
PMSF	: Φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλ-φθορίδιο
PR	: Υποδοχείς προγεστερόνης
RNA	: Ριβονουκλεϊκό οξύ
SDS	: Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SR	: Υποδοχείς στεροειδών ορμονών
TEMED	: N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη
Tes	: N-τρिस(υδροξυμεθυλο)-πιπεραζίνη-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
Tris	: Τρिस(υδροξυμεθυλο)-μεθυλαμίνη
TTP	: Τριφωσφορική θυμιδίνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>1. Εισαγωγή</u>	1
<u>2. Υλικά και μέθοδοι</u>	
2.1. Υλικά	8
2.1.1. Βιολογικό υλικό	9
2.2. Μέθοδοι	
2.2.1. Απόψυξη κυττάρων	10
2.2.2. Καλλιέργεια κυττάρων	10
2.2.3. Κατάψυξη κυττάρων	10
2.2.4. Έλεγχος πληθυσμού και βιωσιμότητας κυττάρων	10
2.2.5. Ομογενοποίηση κυττάρων	10
2.2.6. Απομόνωση κυτταροπλάσματος	11
2.2.7. Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικών διαλυμάτων	
2.2.7.1. Μέθοδος Bradford	11
2.2.7.2. Μέθοδος απορρόφησης στα 280nm	11
2.2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης (SDS-PAGE)	12
2.2.9. Western blot	13
2.2.10. Ανοσοφθορισμός	15
2.2.10.1. Διπλός ανοσοφθορισμός	16
2.2.11. Εκχύλιση με Triton X-100	16
2.2.12. Απομόνωση τουμπουλίνης	17
2.2.13. Νεφελομετρική μέθοδος παρατήρησης πολυμερισμού τουμπουλίνης	17
2.2.14. Απομόνωση ακτίνης	18
2.2.15. Ιξωδομετρική μέθοδος παρατήρησης πολυμερισμού ακτίνης	18
2.2.16. Φασματομετρική μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης διαλυμάτων τουμπουλίνης και ακτίνης	18
2.2.17. Ανοσοκατακράτηση	19
2.2.18. Απομόνωση RNA	20
2.2.19. Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη	20
2.2.20. Φασματομετρικός ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων	20
2.2.21. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	21
2.2.22. Northern blot	22
2.2.23. Προετοιμασία των cDNAs	23
2.2.23.1. Προετοιμασία των cDNAs ακτίνης και τουμπουλίνης	25

3. Αποτελέσματα

3.1. Διερεύνηση οιστρογονικής δράσης στη διαδικασία πολυμερισμού τουμπουλίνης και ακτίνης	27
3.1.1. Απομόνωση τουμπουλίνης	27
3.1.1.1. Πολυμερισμός τουμπουλίνης παρουσία οιστρογόνων	27
3.1.2. Απομόνωση ακτίνης	28
3.1.2.1. Πολυμερισμός ακτίνης παρουσία οιστρογόνων	28
3.2. Διερεύνηση οιστρογονικής δράσης στην έκφραση τουμπουλίνης και ακτίνης	29
3.2.1. Κυτταρικό μοντέλο	29
3.2.2.1. Απομόνωση-καθαρισμός συνολικού RNA από κύτταρα Ishikawa μετά από επώαση παρουσία οιστρογόνων	30
3.2.2.2. Υβριδοποίηση των mRNAs ακτίνης και τουμπουλίνης	31
3.3. Διερεύνηση της ενδοκυττάριας μορφολογίας της HSP-90	31
3.3.1. Μορφολογία κυτταροσκελετικών δομών	32
3.3.2. Μορφολογική παρατήρηση της δομής της HSP-90	32
3.3.3. Συγκριτική μελέτη των μεθόδων μονιμοποίησης	33
3.3.4. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ	34
3.4. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ μετά από επώαση παρουσία αναστολέων των ΜΣ	34
3.4.1. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ μετά από επώαση παρουσία Et ₃ Pb ⁺	34
3.4.2. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ μετά από επώαση παρουσία κολχικίνης	35
3.5. Μορφολογία δομών HSP-90 και MI μετά από επώαση παρουσία κυτοχλασίνης B	36
3.6. Μορφολογία δομών HSP-90 και EI βιμεντίνης μετά από επώαση παρουσία Et₃Pb⁺	36
3.7. Μορφολογία δομών HSP-90 και EI κυτοκερατινών μετά από επώαση παρουσία συνδιασμού κολχικίνης και κυτοχλασίνης B	37
3.8. Μορφολογία δομών HSP-90 και κυτταροσκελετικών σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton X-100, μετά από επώαση απουσία και παρουσία κυτταροσκελετικών αναστολέων	
3.8.1. Μορφολογία δομών HSP-90 και κυτταροσκελετικών σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton	38

3.8.2. Μορφολογία δομών HSP-90 και βιμεντίνης σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton, μετά από επώαση παρουσία Et ₃ Pb ⁺	38
3.8.3. Μορφολογία δομών HSP-90 και βιμεντίνης σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton, μετά από επώαση παρουσία συνδιασμού κολχικίνης και κυτοχλασίνης B	39
3.9. Βιοχημικός έλεγχος αλληλεπίδρασης του A1 αντισώματος κατά της HSP-90 με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες	39
3.10. Πειράματα ανοσοπροσρόφησης προς επαλήθευση της συνοργάνωσης κυτοκερατινών - HSP-90	40
3.11. Συγκριτική μελέτη της ανθεκτικότητας των ΜΣ και των ΜΙ των κυττάρων Ishikawa και HEC-50 παρουσία των αντίστοιχων αναστολέων	41
3.11.1. Κυτταρική σειρά HEC-50	41
3.11.2.1. Μορφολογία δομών ΜΣ μετά από επώαση κυττάρων Ishikawa και HEC-50 απουσία και παρουσία Et ₃ Pb ⁺	41
3.11.2.2. Μορφολογία δομών ΜΙ μετά από επώαση κυττάρων Ishikawa και HEC-50 απουσία και παρουσία κυτοχλασίνης B	42
<u>4. Συζήτηση</u>	43
<u>5. Συμπεράσματα</u>	49
<u>Βιβλιογραφία</u>	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα χαρακτηρίζονται, εκτός των άλλων, από σαφές σχήμα και εσωτερική οργάνωση υψηλού βαθμού. Επιπλέον είναι ικανά να αλλάζουν το σχήμα τους, τη θέση εσωτερικών οργανιδίων τους και σε πολλές περιπτώσεις να μεταναστεύουν από ένα μέρος σε ένα άλλο. Οι κυτταρικές αυτές ιδιότητες του σχήματος, της εσωτερικής οργάνωσης, της μετακίνησης, και όχι μόνον, στηρίζονται σε ένα οργανωμένο σύστημα ινιδιακών δικτύων αλληλοσυνδεδεμένων λειτουργικά, τον "Κυτταροσκελετό" (ΚΣ).

Δύο διεξοδικά μελετημένοι τύποι ινιδίων του ΚΣ είναι τα μικροϊνίδια (ΜΙ) και οι μικροσωληνίσκοι (ΜΣ). Και οι δύο αυτοί τύποι ινιδίων σχηματίζονται από σφαιρικές πρωτεϊνικές υπομονάδες που μπορούν να συναρμολογούνται και να αποσυναρμολογούνται, με διαδικασίες πολυμερισμού, ταχέως μέσα στο κύτταρο.

Οι ΜΣ είναι κοίλοι κύλινδροι των οποίων το τοίχωμα απαρτίζεται από ευθύγραμμα δομικά στοιχεία, τα πρωτοϊνίδια. Υπομονάδα των πρωτοϊνιδίων αποτελεί η πρωτεΐνη τουμπουλίνη, σταθερό διμερές μοριακού βάρους 110kd που αποτελείται από δύο σφαιρικά μονομερή μοριακού βάρους 60 και 50 kd αντίστοιχα και ίδιου ισοηλεκτρικού σημείου (περίπου 5.5), τις α- και β- τουμπουλίνη. Στον σχηματισμό των ΜΣ συμμετέχει μια ομάδα πρωτεϊνών που επονομάζονται "πρωτεΐνες που συνδέονται με ΜΣ" (Microtubule-Associated Proteins, MAPs). Κατά τη συναρμολόγηση των ΜΣ κύριο ρόλο παίζουν επίσης τα ιόντα ασβεστίου (ανασταλτικό) και μαγνησίου (προαγωγικό), ενώ απαραίτητη θεωρείται η παρουσία GTP.

Τα ΜΙ έχουν τη μορφή νηματίων με υπομονάδα σύνθεσης την ακτίνη, πρωτεΐνη περίπου σφαιρική με μοριακό βάρος 42kd και ισοηλεκτρικό σημείο περίπου 5.4, η οποία εμφανίζεται σε διάφορες ισομορφές - ακτίνη σκελετικών μυών, καρδιακών μυών, λείων μυών, κυτταροπλασματική ακτίνη - που όμως είναι λειτουργικά όμοιες και ανταλλάξιμες. Κατά τον πολυμερισμό της ακτίνης προαγωγικό ρόλο παίζουν τα ιόντα μαγνησίου, ενώ αναγκαία θεωρείται η παρουσία ATP.

Μια τρίτη ομάδα πρωτεϊνικών ινιδίων του ΚΣ, με διάμετρο ενδιάμεση αυτής των ΜΙ και των ΜΣ, εξού και η ονομασία της σαν ενδιάμεσα ινίδια (ΕΙ), συναντάται στα περισσότερα κύτταρα· αυτή σχηματίζεται από ινώδεις πρωτεϊνικές υπομονάδες και χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με τα ΜΙ και τους ΜΣ. Η ομάδα των ΕΙ υποδιαιρείται, με βάση τα βιοχημικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που τα συνθέτουν, σε 5 υποομάδες : α) Ινίδια βιμεντίνης : Τα ινίδια της βιμεντίνης, πρωτεΐνης μοριακού βάρους 57kd, παρουσιάζονται κυρίως σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, αλλά και σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων ή κυτταρικών σειρών. β) Ινίδια δεσμίνης : Τα ινίδια της

δεσμίνης, πρωτεΐνης μοριακού βάρους 53kd, είναι τα χαρακτηριστικά ΕΙ των κυττάρων των λείων και γραμμωτών μυών. γ) Ινίδια κυτοκερατινών : Οι κυτοκερατίνες αποτελούν μια σύνθετη πρωτεϊνική οικογένεια που διαθέτει περίπου 20 μέλη με μοριακά βάρη μεταξύ 40 και 70 kd και ισοηλεκτρικά σημεία μεταξύ 5.0 και 8.5. Τα ινίδια των κυτοκερατινών είναι τα χαρακτηριστικά ΕΙ των επιθηλιακών κυττάρων. δ) Νευροϊνίδια : Ο ΚΣ των νευρώνων όλων των σπονδυλωτών και μερικών ασπόνδυλων αποτελείται από ΜΣ και νευροϊνίδια. Η υπομονάδα των νευροϊνιδίων είναι ένα τριμερές σύμπλοκο που αποτελείται από τρία πολυπεπτίδια μοριακών βαρών 200, 150 και 68 kd αντίστοιχα. ε) Γλοιακά ινίδια : Πολλά γλοιακά κύτταρα διαθέτουν ένα σύστημα ΕΙ των οποίων υπομονάδα είναι μια όξινη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50kd, η ινώδης όξινη πρωτεΐνη της γλοίας (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP).

Ο ΚΣ αρχικά είχε προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω των στηρικτικών ιδιοτήτων που διαθέτει· έχει όμως πλέον δειχθεί ότι εκτός αυτών των ιδιοτήτων διαθέτει και πληθώρα άλλων που του επιτρέπουν αφενός μεν να συμμετέχει λειτουργικά σε κυτταρικές διαδικασίες αφετέρου να γίνεται αποδέκτης ή ρυθμιστής της δράσης διαφόρων ουσιών :

Οι ΜΣ χρησιμοποιούν την χαρακτηριστική ικανότητα τους να πολυμερίζονται και να αποπολυμερίζονται ταχέως στο κύτταρο, ικανότητα που διαθέτουν και τα ΜΙ, για να κατασκευάσουν την μιτωτική άτρακτο κατά την αρχή της μίτωσης και να επανέλθουν στην ακτινική τους διάταξη στο τέλος αυτής, αποσύροντας συγχρόνως και τα χρωμοσώματα που αντιστοιχούν σε κάθε καινούργιο κύτταρο στα άκρα της ατράκτου (Alberts.1983). Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι οι ΜΣ εκτελούν χρέη "οδών μετατόπισης" για διάφορα κυτταρικά στοιχεία. Με πειράματα ανοσοφθορισμού, π.χ., έχει παρατηρηθεί ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια να βρίσκονται εντοπισμένα και συγκεντρωμένα γύρω από τα κέντρα οργάνωσης των ΜΣ, καθώς επίσης και να μετακινούνται, σε ευθύγραμμη τροχιά και με ασυνεχή βήματα, κατά μήκος των ΜΣ. Τα συγκεκριμένα οργανίδια διασκορπίζονται στο κυτταρόπλασμα όταν οι ΜΣ αποπολυμερίζονται, ενώ επανοργανώνονται ταχέως όταν οι ΜΣ επαναπολυμερίζονται (Matteoni.1987). Πειράματα ανοσοφθορισμού και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν δείξει επίσης ότι ΜΣ εντοπίζονται και στα μιτοχόνδρια τα οποία μετακινούνται κατά μήκος αυτών και διασκορπίζονται μετά από αποπολυμερισμό τους (Heggeness.1978, Stebbings.1987). Πρωτεΐνες, τέλος, που θεωρούντο διασκορπισμένες τυχαία στο κυτταρόπλασμα εμφανίζονται και "αγκυροβολημένες" επάνω στους ΜΣ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η HSP-90, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs), για την οποία γίνεται αναφορά παρακάτω.

Τα ΜΙ της ακτίνης, εξάλλου, συνεργάζονται με διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες τους προσδίδουν ποικίλες ικανότητες : Η σύνδεση της ακτίνης με τις "μυϊκές" πρωτεΐνες μυσίνη, τροπομυσίνη, α-ακτινίνη και φιλαμίνη επιτρέπει στα ΜΙ να συμμετέχουν σε φαινόμενα συστολής στο κύτταρο (Weber.1974, Lazarides.1975a, Lazarides.1975b) ενώ ο συνδιασμός της με πρωτεΐνες όπως οι γελσολίνη, φραγμίνη, βιλλίνη, φιμπρίνη και καλμοδουλίνη προσδίδει στα ΜΙ την ικανότητα ρύθμισης του ιξώδους του κυτταροπλάσματος (Yin.1979, Hasegawa.1980, Weber.1981). Συνεργασία της ακτίνης με τις πρωτεΐνες βινκουλίνη και ταλίνη επιτρέπει στα ΜΙ να συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη (Geiger.1979, BurrIDGE.1980, BurrIDGE.1983) και να συμμετέχουν με αυτό τον τρόπο σε μια αλυσίδα που μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών καταλήγει σε ένα εξωκυττάριο πλέγμα· το πλέγμα αυτό, του οποίου βασικά συστατικά είναι οι πρωτεΐνες ινωδονεκτίνη και κολλαγόνο, αποτελεί το μέσο πρόσφυσης των φυσιολογικών κυττάρων σε στερεό υπόστρωμα.

Πολλές μελέτες, τέλος, έχουν γίνει και εξακολουθούν να γίνονται σχετικά με τις ιδιότητες των ΕΙ και τελικά με το ρόλο τους στην κυτταρική λειτουργία, ο οποίος όμως ακόμη παραμένει ασαφής. Έχει, π.χ., δειχθεί ότι σε επιθηλιακά κύτταρα ΕΙ συνδέονται με τον πυρήνα και συνυφανώνονται με δεσμοσωμάτια παντού μέσα στον επιθηλιακό ιστό (Fey.1984). Ειδικότερες, μάλιστα, έρευνες σχετικά με τις περιοχές σύνδεσης των ΕΙ σε ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν τα ΕΙ της βιμεντίνης να συνδέονται αφενός μεν στον πυρήνα, πλησίον των πόρων του πυρηνικού φακέλλου καθώς και στο εσωτερικό του, και συγκεκριμένα στο πυρηνικό έλασμα των λαμινών, αφετέρου δε στην πλασματική μεμβράνη, στην περιοχή της αγκυρίνης (Georgatos.1987a, Georgatos.1987b). Πειράματα εκχύλισης και ανοσοφθορισμού παρουσιάζουν τα ΕΙ σαν περιοχές αγκυροβόλησης για τα μιτοχόνδρια σε ινοβλάστες δέρματος (Mose-Larsen.1982). Σε καλλιέργειες νεφρικών κυττάρων ΕΙ εμφανίζονται να συνδέονται με τα πολυριβοσωμάτια και μέσω αυτών με τον μηχανισμό της μετάφρασης (Zumbe.1982). Έχει επίσης δειχθεί ότι κατά την μετάφραση σχηματίζεται από ΕΙ ένας κλωβός ο οποίος περικλείει την μιτωτική άτρακτο, αποκλείοντας έτσι ορισμένα κυτταρικά χαρακτηριστικά από την περιοχή αυτή (Zieve.1980).

HSPs : Όλοι οι οργανισμοί απαντούν στη θέρμανση επάγοντας την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs). Οι περισσότερες HSPs έχουν καθοριστεί με βάση το μοριακό τους βάρος (Kaufmann.1990). Η προσέγγιση αυτή οδήγησε στην ομαδοποίηση τους σε οικογένειες διαφορετικού μοριακού βάρους. Τα μέλη κάθε οικογένειας εκτός από το μοριακό βάρος διαθέτουν και άλλα κοινά χαρακτηριστικά, ενώ κοινές ομάδες οικογενειών έχουν

παρατηρηθεί σε διαφορετικούς οργανισμούς. Οι οικογένειες των HSPs έχουν ως εξής:

HSP-110 : Ομάδα HSPs μοριακού βάρους 100-110 kd. Υποστηρίζεται ότι εντοπίζονται στο ριβοσωμικό DNA, συνδέονται με RNA ή σύμπλεγμα πρωτεϊνών που προσδένεται σε RNA και προστατεύουν την παραγωγή ριβοσωμάτων από θερμικό σοκ.

HSP-70 : Ετερογενής ομάδα με κύρια μέλη τις HSP-70, HSC-70, grp-78, BiP και DnaK. Συμμετέχουν στο δίπλωμα ή το ξεδίπλωμα πρωτεϊνών, την πρωτεϊνική διαμετακόμιση, την οργάνωση πολυμερών συμπλόκων, την οργάνωση ανοσοσφαιρινών και την παραγωγή αντιγόνων τάξης II. Εκτελούν χρέη αντιγόνων πολλών παθογόνων οργανισμών και, όπως και όλες οι HSPs, φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη διαδικασία της αυτοανασίας.

HSP-60 : Κύρια μέλη της ομάδας αυτής είναι οι HSP-60 και groEL. Συμμετέχουν και αυτές στο δίπλωμα ή το ξεδίπλωμα πρωτεϊνών και την οργάνωση πολυμερών συμπλόκων. Εκτελούν χρέη αντιγόνων πολλών παθογόνων οργανισμών.

Γιουμπικουΐτινη : Πρωτεΐνη μεγέθους 76 αμινοξέων που συμμετέχει σε διαδικασίες αποδιάταξης πρωτεϊνών, παραγωγής αντιγόνων τάξης I και μετακίνησης λεμφοκυττάρων.

HSP-90 : Πρωτεΐνη (στην πραγματικότητα ομάδα πρωτεϊνών) μοριακού βάρους της τάξης των 90kd που είναι παρούσα ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα και μάλιστα σε αφθονία ακόμη και σε φυσιολογικές θερμοκρασίες. Η HSP-90 εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένη με διάφορα είδη πρωτεϊνών, υπό την ίδια όμως πάντα ιδιότητα, αυτήν του "μοριακού συνοδού". Η πρώτη πρωτεΐνη με την οποία φάνηκε να συνδέεται ήταν η pp60^{SrC}, πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το src ογκογονίδιο του ρετροϊού RSV (Rous Sarcoma Virus) (Brugge.1981, Oppermann.1981). Πρόκειται για μια κινάση τυροσίνης η οποία αμέσως μόλις συντίθεται συνδέεται με την HSP-90 και με μια φωσφοπρωτεΐνη 50kd. Όταν πλέον η pp60^{SrC} αποδεδεμευθεί από την HSP-90 φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνη, εισέρχεται στη μεμβράνη και ενεργοποιείται σαν κινάση (Courtneidge.1982, Brugge.1983). Αυτά τα δεδομένα οδήγησαν στην πρόταση ότι η HSP-90 συνδέεται με την pp60^{SrC}, διατηρώντας την διαλυτή και ανενεργή, ενώ αυτή μεταφέρεται στην συγκεκριμένη θέση της στη μεμβράνη.

Εκτός από την pp60^{SrC} τέσσερις ακόμη πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια, τα yes, fps, fgf και fes, και έχουν επίσης την ιδιότητα κινάσης τυροσίνης, δημιουργούν σταθερά σύμπλοκα με πρωτεΐνες μεγέθους 90kd και 50kd. Σε μερικές περιπτώσεις αυτή η 90kd πρωτεΐνη έχει ταυτοποιηθεί σαν την HSP-90 (Adkins.1982, Lipsich.1982, Ziemiecki.1986a). Οι κινάσες αυτές υπό τη μορφή συμπλόκων είναι ανίκανες να αυτοφωσφορυλιωθούν, ικανότητα που

διαθέτουν οι μονομερείς μορφές τους (Brugge.1981, Ziemiecki.1986b). Επιπλέον το κλάσμα των κινασών αυτών που καταβυθίζεται από λυμένα κύτταρα με αντισώματα έναντι της HSP-90 εμφανίζεται υποφωσφορυλιωμένο.

Η άλλη ομάδα των συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η HSP-90 περιλαμβάνει τα σύμπλοκα των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Τα σύμπλοκα αυτά περιέχουν, εκτός από τις πρωτεΐνες που συνδέονται με τις ορμόνες, και πρωτεΐνες μοριακού βάρους 90kd με συγκεκριμένη στοιχειομετρία στο σύμπλοκο, οι οποίες έχουν πλέον ταυτοποιηθεί σαν HSP-90 (Renoir.1986, Sanchez.1986, Redeuilh.1987, Catelli.1988). Η HSP-90 σαν υπομονάδα του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών προστατεύει τον υποδοχέα και τον διατηρεί ανενεργό, καλύπτοντας την περιοχή δέσμευσης του στο χρωμόσωμα, μέχρι την ορμονική ενεργοποίηση του (Baulieu.1987, Groyer.1987), όπως φαίνεται και από τον μηχανισμό της ορμονικής δράσης :

Μηχανισμός δράσης στεροειδών ορμονών : Οι στεροειδείς ορμόνες, ρυθμιστικές ενώσεις που δρουν σε μεταγραφικό επίπεδο (Bishop.1985, Ringold.1985, Yamamoto.1985), ενεργούν στα κύτταρα-στόχους εμμέσως μέσω πρωτεϊνών-υποδοχέων (Steroid Receptors, SR), οι οποίοι και αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα των κυττάρων αυτών. Οι υποδοχείς όλων των στεροειδών ορμονών [Οιστρογόνων (ER), Προγεστερόνης (PR), Ανδρογόνων (AR), Γλυκοκορτικοειδών (GR)] εμφανίζονται μορφολογικά όμοιοι, με δομή που εμφανίζει 4 περιοχές, τις A/B, C, D και E, κατά σειρά από το αμίνο- προς το καρβόξυ- τελικό άκρο (Green.1986) (εικόνα 1). Η A/B περιοχή, που αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη περιοχή των SR, φαίνεται να είναι σημαντική στον καθορισμό του ιστού-στόχου και της ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων (Tora.1988). Στο ποικίλο της μέγεθος (100-600 αμινοξικές ομάδες) οφείλεται και η ποικιλία των μοριακών βαρών των SR (75-120 kd). Η C περιοχή αποτελεί την περιοχή σύνδεσης των υποδοχέων με τα γονίδια. Είναι περιοχή μεγέθους 70 αμινοξικών ομάδων, πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys, Arg) και με μια χαρακτηριστική οργάνωση κυστεϊνικών ομάδων, με δομή δύο δακτυλίων του τύπου 2cys-2cys που σταθεροποιείται από ιόντα Zn^{2+} , τους "δακτυλίους-Zn" ("Zn-fingers") (Miller.1985, Berg.1988), όπως σχηματικά παρουσιάζεται στην εικόνα (2). Η περιοχή αυτή καθορίζει τον βαθμό εξειδίκευσης της δράσης των SR στα ορμονορυθμιζόμενα στοιχεία των γονιδίων-στόχων (Hormone-Regulating Elements, HREs). Η D περιοχή εκτελεί χρέη συνδέσμου των C και E, αν και δεν φαίνεται να μεταφέρει κάποια πληροφορία μεταξύ τους. Αποτελείται από 30 αμινοξικές ομάδες, δεν είναι συντηρημένη περιοχή και πιθανολογείται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων (Adler.1988). Η E περιοχή τέλος, μεγέθους 250 αμινοξικών ομάδων, αποτελεί τη περιοχή σύνδεσης

των υποδοχέων με τις ορμόνες (Webster.1988). Είναι περιοχή πλούσια σε υδροφοβικές ομάδες και παρουσιάζει ποικιλία ομολογίας που κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50%, με ένα τμήμα 20 αμινοξικών ομάδων να εμφανίζεται έντονα συντηρημένο. Οι SR απουσία ορμονών απαντούν υπό την ανενεργή μορφή συμπλόκων με HSP-90 σε αναλογία 2:2 για τους ER και 2:1 για τους υπόλοιπους. Οι HSP-90 διαθέτουν 2 φορτισμένες περιοχές, τις A και B. Η περιοχή A εντοπίζεται στο αμίνο-τελικό άκρο, είναι αρνητικά φορτισμένη με κατανομή φορτίου όμοια με αυτήν των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA και σχηματίζει δομή α-έλικας όμοια με αυτήν του DNA. Έχει προταθεί και υποστηριχθεί λοιπόν ότι η αλληλεπίδραση των SR με τις HSP-90 βασίζεται στην ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικά φορτισμένων "Zn-fingers" περιοχών των SR που αναγνωρίζουν τη δομή του DNA και των αρνητικά φορτισμένων περιοχών A των HSP-90 που παρουσιάζουν μια DNA-δομή. Η παρουσία των στεροειδών ορμονών, οι οποίες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη παθητικά λόγω του μικρού μεγέθους και του λιπόφιλου χαρακτήρα τους, οδηγεί στην ενεργοποίηση των SR : Μετά από σύνδεση των ορμονών στις E/F περιοχές των SR απομακρύνονται οι HSP-90 με αποτέλεσμα να απελευθερωθούν οι "Zn-fingers" περιοχές. Το νέο σύμπλοκο είναι πλέον ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί στα HREs που εντοπίζει στα χρωμοσώματα, μεταφέροντας τελικά την ορμονική δράση στο μεταγραφικό επίπεδο. Η παρουσία, αντίθετα, αντιορμονών (π.χ. RU-486) οδηγεί στην κάλυψη των E/F περιοχών των SR χωρίς αντίστοιχη απομάκρυνση των HSP-90 και τελικά στην αδρανοποίηση των SR. Οι αρχικές απόψεις σχετικά με την περιοχή συνάντησης-ενεργοποίησης των SR από τις ορμόνες υποστήριζαν ότι η σύνδεση αυτή επιτελείται στο κυτταρόπλασμα (Jensen.1972). Τελευταίες όμως μελέτες οδηγούν στην άποψη ότι η σύνδεση αυτή επιτελείται στον πυρήνα (Fleming.1980, Welshons.1984, Gravanis.1986b). Από πολλούς μάλιστα υποστηρίζεται ότι οι HSP-90 δεν δρουν μόνον προστατευτικά κατά την μετακίνηση των SR από την κυτταροπλασματική περιοχή σύνθεσης στην πυρηνική περιοχή ενεργοποίησης τους, αλλά επίσης συμμετέχουν στον μηχανισμό μετακίνησης τους (Schlesinger.1986), ο οποίος πάντως παραμένει άγνωστος.

Λόγω της απανταχού παρουσίας και της αφθονίας της HSP-90 στα κύτταρα, αρκετές υποθέσεις έχουν γίνει σχετικά με την αλληλεπίδραση της HSP-90 και με άλλες συντηρημένες πρωτεΐνες, αλληλεπίδραση που πιθανόν να συνδέεται με ουσιώδεις κυτταρικές λειτουργίες. Κάποιες μελέτες με απομονωμένη HSP-90 έδειξαν ότι αυτή συνδέεται, σε *in vitro* πειράματα, με απομονωμένη ακτίνη και μάλιστα με μια μέσω Ca^{2+} -καλμοδουλίνης ρυθμιζόμενη διαδικασία (Koyasu.1986, Nishida.1986). οι παρατηρήσεις όμως αυτές, που απαιτούσαν μάλιστα υπερβολικά μεγάλες συγκεντρώσεις των δύο πρωτεϊνών, δεν επαληθεύθηκαν ούτε σε

κυτταρικές καλλιέργειες ούτε σε κυτταροπλασματικά παρασκευάσματα (Sanchez.1988). Πλέον πρόσφατα όμως πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακράτησης έδειξαν την HSP-90 να συνδέεται με ΜΣ τόσο σε κυτταροπλασματικά παρασκευάσματα όσο και σε άθικτα κύτταρα (Bresnick.1988, Sanchez.1988, Redmond.1989). Η μελέτη της συνοργάνωσης της HSP-90 με δομές του κυτταροσκελετού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο στη διερεύνηση πιθανών συσχετισμών της HSP-90 με μηχανισμούς μετακίνησης πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο, όπως για παράδειγμα οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, με τις οποίες έχει ήδη δειχθεί ότι συνδέεται.

Τα βασικά δύο ερωτήματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν το κατά πόσο ο ΚΣ θα μπορούσε να ρυθμίζει την οιστρογονική δράση αφενός, ή θα μπορούσε να συμμετέχει στη διαδικασία μετακίνησης των υποδοχέων των οιστρογόνων από την κυτταροπλασματική περιοχή ενεργοποίησης στην πυρηνική περιοχή δράσης τους αφετέρου. Κατά την προσέγγιση του πρώτου σκέλους των ερωτημάτων εξετάσαμε εάν η παρουσία των οιστρογόνων επιφέρει αλλαγές σε δίκτυα του ΚΣ τα οποία υπόκεινται σε ρύθμιση της δυναμικής ισορροπίας πολυμερισμού-αποπολυμερισμού, δηλαδή τα δίκτυα των ΜΣ της τουμπουλίνης και των ΜΙ της ακτίνης, τα οποία χαρακτηρίζονται και ως τα πλέον ευμετάβλητα. Η πιθανή οιστρογονική ρυθμιστική δράση μελετήθηκε είτε στα πλαίσια της οργάνωσης των δικτύων αυτών, όπου ελέγχθηκε ο *in vitro* πολυμερισμός της τουμπουλίνης και της ακτίνης παρουσία οιστρογόνων, είτε στα πλαίσια της έκφρασης των πρωτεϊνών που τα συνθέτουν, όπου ελέγχθηκε η έκφραση των mRNAs των δύο αυτών πρωτεϊνών κατά την οιστρογονική παρουσία. Το δεύτερο σκέλος των ερωτημάτων, αυτό δηλαδή της συμμετοχής του ΚΣ στη διαδικασία της οιστρογονικής δράσης, προσεγγίστηκε μέσω της πιθανής συνοργάνωσης του ΚΣ με την HSP-90. Η συνοργάνωση αυτή, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, θα μπορούσε να συσχετίσει τον ΚΣ με τον μηχανισμό μετακίνησης στο κύτταρο του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών. Στα πλαίσια αυτά εξετάσαμε τόσο μορφολογικά όσο και με βιοχημικές μεθόδους την αλληλεπίδραση της HSP-90 με δίκτυα του ΚΣ στο κυτταρικό μας μοντέλο. Το μοντέλο αυτό (κυτταρική σειρά Ishikawa) προέρχεται από καλώς διαφοροποιημένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνων και βεβαίως εκφράζει την HSP-90, καθώς και τα δίκτυα των ΜΣ της τουμπουλίνης, των ΜΙ της ακτίνης, των ΕΙ της βιμεντίνης και των ΕΙ των κυτοκερατινών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

Τα κοινά αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τους οίκους Merck (Hohenbrunn, Germany), Serva (Heidelberg, Germany), Ferak (Berlin, Germany), Malinckrodt (St. Louis, USA), Sigma (St. Louis, USA).

Το θρεπτικό μέσο MEM, ο ορός FBS και τα διαλύματα γλουταμίνης και πενικυλλίνης-στρεπτομυκίνης ήταν από την Flow Lab. (Irvine, Scotland). Το διάλυμα PBS και το διάλυμα τρυψίνης(0.05%)-EDTA(0.02%) ήταν από την Gibco, Inc. (Grand Island, N.Y., USA).

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και οι μάρτυρες μοριακών βαρών πρωτεϊνών ήταν από την Pharmacia-LKB (Sweden). Οι μεμβράνες πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης (gene-screen) και οι μάρτυρες μοριακών βαρών DNA ήταν από την NEN-DuPont (Boston, USA). Η κολχικίνη ήταν από την Serva (Heidelberg, Germany). Ο τριαιθυλιούχος μόλυβδος ήταν από την Ventron (Karlsruhe, Germany). Η κυτοχλασίνη B, η οιστραδιόλη και η 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη ήταν από την Sigma (St. Louis, USA). Το σύμπλοκο ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη ήταν από την Molecular Probes, Inc. (Eugene, USA).

Οι προσημασμένες με FITC ανοσοσφαιρίνες Γ (IgG) από κασίκα κατά ανοσοσφαιρινών από ποντικό ή κουνέλι ήταν από την Immunotech (Marseilles, France). Οι προσημασμένες με Texas-Red ανοσοσφαιρίνες Γ (IgG) από πρόβατο κατά ανοσοσφαιρινών από ποντικό και από γάιδαρο κατά ανοσοσφαιρινών από κουνέλι ήταν από την Amersham (Buckinghamshire, England). Οι προσημασμένες με HRP ανοσοσφαιρίνες Γ (IgG) από πρόβατο κατά ανοσοσφαιρινών από ποντικό και από γάιδαρο κατά ανοσοσφαιρινών από κουνέλι ήταν επίσης από την Amersham (Buckinghamshire, England).

Τα διαλύματα dGTP, dTTP και εξανουκλεοτιδίων, τα περιοριστικά ένζυμα, η DNA-πολυμεράση I (τμήμα Klenow) και η RNAάση A ήταν από την Pharmacia-LKB (Sweden). Τα διαλύματα των προσημασμένων, με ^{32}P σε α -θέση, dATP και dCTP ήταν από την NEN-DuPont (Boston, USA).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού κατά των α , β -τουμπουλίνης, ακτίνης, βιμεντίνης, δεσμίνης και κυτοκερατινών (8.13) ήταν από την Sigma (St. Louis, USA). Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της HSP-90 (AC88) ήταν ευγενής προσφορά του Dr. D. Toft (Mayo Clinic, Rochester). Το πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού κατά της HSP-90 (A1) ήταν ευγενής προσφορά της Dr. M. Catelli (Lab. Hormones, Bicetre, France). Η πρωτεΐνη βιμεντίνη ήταν ευγενής προσφορά του Dr. P. Traub (Max Plank Institute, Heidelberg, Germany). Τα cDNAs για την α -

τουμπουλίνη (~1.7kb μέγεθος, σε pBR322 πλασμίδιο σε PstI θέση) και την β-τουμπουλίνη (~1.8kb μέγεθος, σε pBR322 πλασμίδιο σε HindIII θέση) ήταν ευγενής προσφορά του Dr. H. Ponstingl (DKFZ, Heidelberg, Germany). Το cDNA για την β-ακτίνη (1.5kb μέγεθος, σε pUC-18 πλασμίδιο σε PstI θέση) ήταν ευγενής προσφορά του Δρ. Β. Ζαννή (Boston, USA).

Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Protein A-Sepharose CL-4B και Sephadex G-50 της Pharmacia-LKB (Sweden) και DEAE DE-52 της Whatman (Springfield, England).

2.1.1. Βιολογικό Υλικό

Οι κυτταρικές σειρές Ishikawa και HEC-50 ανήκαν στον Αναπλ. Καθ. Α. Γραβάνη.

Οι αποξηραμένοι μύες κουνελιού ήταν έργο του Αναπλ. Καθ. Χ. Στουρνάρα.

Οι εγκέφαλοι χοίρων ήταν προσφορά των σφαγείων Ηρακλείου.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Απόψυξη κυττάρων : Αιώρημα κυττάρων ($5-10 \times 10^6$ κύτταρα/ml) από τους -70°C θερμαίνεται στους 37°C και αμέσως μετά φυγοκεντρείται ($600 \times g$, 10min, θ.π.). Τα κύτταρα εκπλύνονται με θρεπτικό μέσο και επαναφυγοκεντρούνται. Μετά επανασκορπίζονται σε θρεπτικό μέσο και ακολουθεί καλλιέργεια τους.

2.2.2. Καλλιέργεια κυττάρων : (Holinka.1986a) Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο MEM που περιέχει 15% V/v ορό (FBS) με αδρανοποιημένο το πρωτεϊνικό του συμπλήρωμα (η αδρανοποίηση επιτυγχάνεται με θέρμανση του ορού στους 56°C για 20min), 10mM γλουταμίνη, 50IU/ml πενικυλλίνη, 50μg/ml στρεπτομυκίνη και 30mM NaHCO_3 (για τον ορό και το διάλυμα NaHCO_3 απαιτείται διήθηση από φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.2μm). Η καλλιέργεια γίνεται σε υγρό περιβάλλον, με 95% ατμοσφαιρικό αέρα και 5% CO_2 , στους 37°C . Όταν, μετά από αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε 2-3 ημέρες, τα κύτταρα φτάσουν σε υψηλή πυκνότητα, αποκολλώνται από τον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας με επώαση με διάλυμα τρυψίνης-EDTA στους 37°C για 10-15min. Μετά από φυγοκέντρηση, έκπλυση και επαναφυγοκέντρηση τα κύτταρα επανασκορπίζονται σε θρεπτικό μέσο και είναι έτοιμα για επανακαλλιέργεια, απομόνωση κυτταροπλάσματος ή νουκλεϊκών οξέων, ή κατάψυξη.

2.2.3. Κατάψυξη κυττάρων : Από κυτταρικό αιώρημα ($10-20 \times 10^6$ κύτταρα/ml), κλάσματα του 0.5ml τοποθετούνται σε αποστειρωμένους σωλήνες στους 0°C , και σε κάθε έναν από αυτούς προστίθεται στάγδην και με συνεχή ανάδευση 0.5ml μέσου κατάψυξης. Αυτά τα αιωρήματα των κυττάρων μεταφέρονται ακολούθως από τους 0°C στους -70°C .

Το μέσο κατάψυξης παρασκευάζεται με ανάμειξη θρεπτικού μέσου, DMSO και ορού σε αναλογίες 55/20/25, και διήθηση.

2.2.4. Έλεγχος πληθυσμού και βιωσιμότητας κυττάρων : 10μl κυτταρικού αιωρήματος αραιώνονται σε αναλογία 1:9 με διάλυμα χρωστικής trypan blue 0.01% W/v σε PBS. Τα ζωντανά κύτταρα καταμετρούνται σε πλακίδιο Mallassez.

2.2.5. Ομογενοποίηση κυττάρων : α) Με έμβολο από teflon, σε ομογενοποιητή Dounce. 3x5 κινήσεις, στις 200 στροφές/min, με ενδιάμεση παραμονή στους 0°C . β) Με υπέρηχους. Εκθεση σε υπέρηχους 3x15sec, με 2x15sec ενδιάμεση παραμονή στους 0°C .

2.2.6. Απομόνωση κυτταροπλάσματος : (Sanchez.1988) Τα κύτταρα εκπλύνονται με PBS, φυγοκεντρούνται, επανασκορπίζονται σε 1.5 όγκο ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 10mM HEPES-NaOH pH 7.4, 0.4mM EDTA, 1mM DTT και 1mM PMSF, και ομογενοποιούνται στους 0°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (27,000xg, 30min, 4°C). Το ίζημα, που αποτελείται κυρίως από πυρήνες και άθραυστα κύτταρα, απορρίπτεται. Το υπερκείμενο επαναφυγοκεντρείται (105,000xg, 60min, 4°C). Το ίζημα, που αποτελείται κυρίως από κομμάτια μεμβρανών, απορρίπτεται. Το υπερκείμενο (κυτταρόπλασμα) φυλάσσεται στους -70°C.

2.2.7. Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικών διαλυμάτων

2.2.7.1. Μέθοδος Bradford : (Bradford.1976) Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο pH. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm ενώ η ελεύθερη χρωστική στα 465nm.

Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται ως εξής : 100mg της χρωστικής διαλύονται σε 50ml 95% αιθανόλη + 100ml 85% H₃PO₄ και αραιώνεται με H₂O μέχρι το 1lt και διηθείται.

Με βάση την απορρόφηση του δείγματος στα 595nm προσδιορίζεται η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη, από πρότυπη καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με διαλύματα BSA γνωστών συγκεντρώσεων. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη, ευαίσθητη (ανιχνεύει 5-50μg πρωτεΐνης), ενώ έχει ελάχιστες παρεμποδίσεις.

2.2.7.2. Μέθοδος απορρόφησης στα 280nm : Οι περισσότερες πρωτεΐνες απορροφούν το φως στην υπεριώδη περιοχή, με μέγιστο στα 280nm. Η απορρόφηση οφείλεται κυρίως στην παρουσία τυροσίνης και τρυπτοφάνης, που είναι τα δύο από τα τρία αμινοξέα που απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία. Το τρίτο, η φαιθυλαλανίνη, επειδή έχει πολύ χαμηλό συντελεστή μοριακής απόσβεσης, δεν συμβάλλει συνήθως στο φάσμα απορρόφησης των πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά μειονεκτήματα, με κυριότερα την μη ικανοποιητική ακρίβεια και την μη ικανοποιητική εξειδίκευση, καθώς και άλλες ουσίες εκτός από τις πρωτεΐνες απορροφούν στα 280nm· έχει όμως το μεγάλο πλεονέκτημα ότι κατά την μέτρηση το πρωτεϊνικό διάλυμα δεν καταστρέφεται. Χρησιμοποιείται συνήθως για ποιοτική ανίχνευση ομοιογενών πρωτεϊνικών διαλυμάτων σε καθαρή κατάσταση και με γνωστό τον συντελεστή απορρόφησης ε₂₈₀.

2.2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης (SDS-PAGE) : (Laemmli.1970) Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται

για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και τον προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους με μεγάλη ακρίβεια.

Το ακρυλαμίδιο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων από 2% μέχρι και περισσότερο από 20%. Ο πολυμερισμός 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. Το ρόλο του συνδέσμου των αλυσίδων του πολυακρυλαμίδιου για τη δημιουργία του δικτύου παίζει το N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο (Bis).

Στην SDS-ηλεκτροφόρηση σαν αποδιατακτικός παράγοντας χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό SDS. Η δράση του οφείλεται στο γεγονός ότι μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών δεσμεύεται, ανεξάρτητα από μοριακό βάρος, με το SDS σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (14gr SDS / gr πρωτεΐνης) σχηματίζοντας επιμήκη σύμπλοκα με σαφή και καθορισμένη δευτεροταγή δομή. Η δέσμευση είναι ανεξάρτητη από την ιονική ισχύ, υδρόφοβη στη φύση και δίνει στα μόρια ένα καθαρό 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 μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη μέθοδο του Laemmli, με διαφορά στη χρήση επίπεδου (16cmx18cmx1.5mm) αντί κυλινδρικού πηκτώματος. Τα δύο στοιχεία του συστήματος είναι :

α) ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (12cm)

8-10% W/v ακρυλαμίδιο/Bis (29/1)

0.1% W/v SDS

0.375M Tris-HCl pH 8.8

0.05% W/v $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

0.05% V/v TEMED

β) ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (4cm)

4% W/v ακρυλαμίδιο/Bis (29/1)

0.1% W/v SDS

0.125M Tris-HCl pH 6.8

0.1% W/v $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

0.1% V/v TEMED

Τα δείγματα πριν εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού διανύουν απόσταση 1.5cm στο πήκτωμα επιστοίβαξης. Οι θέσεις (slots) όπου τοποθετούνται τα δείγματα σχηματίζονται από πλαστική οδοντωτή μήτρα με 10-20 θέσεις, η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοίβαξης.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

4% W/v SDS

4% V/v β-μερκαπτοαιθανόλη

0.125M Tris-HCl pH 6.8

10% V/v γλυκερόλη

0.02% W/v κυανούν της βρωμοφαινόλης

Τα δείγματα αραιώνονται με ίσο όγκο διαλύματος διαλυτοποίησης και θερμαίνονται στους 95°C για 4min. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, διατηρώντας πλέον μόνον την πρωτοταγή τους δομή.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΟΧΕΙΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ

192mM γλυκίνη

0.025M Tris

0.1% W/v SDS

(τελικό pH περίπου 8.3)

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ : Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης 30-35 volt μέχρις ότου ο δείκτης του μετώπου φθάσει 1cm πριν από το κάτω άκρο του πηκτώματος. Ο χρόνος που απαιτείται κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι 16-20 h.

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ-ΧΡΩΣΗ : Επιτυγχάνεται με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 0.2% W/v χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250, 7% V/v CH₃COOH, 43% V/v μεθανόλης για 2-4 h.

ΑΠΟΧΡΩΣΗ-ΕΜΦΑΝΙΣΗ : Επιτυγχάνεται με παραμονή του πηκτώματος σε διάλυμα 7% V/v CH₃COOH, 43% V/v μεθανόλης για 16-20 h, οπότε και γίνονται ορατές οι θέσεις πρωτεϊνών ποσότητας μέχρι και 100ng.

2.2.9. Western blot : (Towbin.1979, Burnette.1981) Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε πρωτεϊνικά διαλύματα με χρήση αντισωμάτων.

Πρωτεΐνες, ήδη διαχωρισμένες μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρονται και προσκολλώνται από το πήκτωμα σε στερεό στρώμα, με

αποτέλεσμα να δημιουργείται ακριβές αντίγραφο του πηκτώματος με τη μορφή κηλίδων (immunoblots). Σαν στερεό στρώμα χρησιμοποιούνται μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με πόρους διαμέτρου καθοριζόμενης από το μέγεθος της πρωτεΐνης που εξετάζεται (0.2-0.45 μm). Στη συνέχεια οι πρωτεϊνικές κηλίδες αντιδρούν με ειδικά αντισώματα, τα οποία ακολούθως ανιχνεύονται με ανοσοενζυμικούς ανιχνευτές. Η ευαισθησία της μεθόδου φθάνει το 1ng πρωτεΐνης.

Τα στάδια της τροποποιημένης τεχνικής είναι τα εξής :

α) ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ :

Λίγο πριν το τέλος της ηλεκτροφόρησης μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και δύο χαρτιά Whatman 3MM κόβονται στις ακριβείς διαστάσεις του πηκτώματος. Η μεμβράνη βυθίζεται σε δοχείο με διάλυμα μεταφοράς (192mM γλυκίνη, 0.025M Tris, 0.1% W/v SDS, τελικό pH περίπου 8.3). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκπλύνεται σε διάλυμα μεταφοράς, ενώ στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και τα χαρτιά 3MM. Ακολούθως συναρμολογείται το "σάντουιτς" μεταφοράς: Μεταξύ των δύο σφουγγαριών της συσκευής τοποθετούνται κατά σειράν ένα χαρτί 3MM, το πήκτωμα, η μεμβράνη και το άλλο χαρτί 3MM, με προσοχή να μην παραμείνουν φυσαλίδες μεταξύ τους. Το "σάντουιτς" τοποθετείται στη συσκευή με το διάλυμα μεταφοράς, στους 4°C, με το πήκτωμα προς την κάθοδο, και η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών επιτελείται μέσα στο πεδίο που δημιουργείται από το μέγιστο (100%) της προσφερόμενης από τη συσκευή τάσης, στους 4°C, σε 1-2 h. Μετά το τέλος της μεταφοράς ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης για 10min σε διάλυμα 50% V/v ισοπροπανόλης, με σκοπό την έκπλυση του SDS και τη μονιμοποίηση των πρωτεϊνών. Επίσης ακολουθεί εμφάνιση του πηκτώματος για έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών.

β) ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ :

β1) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΓΙΑ ΚΑΛΥΨΗ ΜΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ:

Η μεμβράνη εκπλύνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-NaCl (25mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl) και επωάζεται σε διάλυμα παρεμπόδισης (0.1% V/v Tween-20 και 0.1% W/v ζελατίνη σε Tris-NaCl) για 2h σε θ.π..

β2) ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΠΡΩΤΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ-ΣΤΟΧΟ :

Η μεμβράνη επωάζεται μέσα σε - 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ - διάλυμα αντισώματος αραιωμένου σε διάλυμα παρεμπόδισης στην προτεινόμενη αραιώση (1:50 έως 1:1000), για 2h σε θ.π.. Ακολουθούν τέσσερις εκπλύσεις των 15min σε διάλυμα παρεμπόδισης σε θ.π..

β3) ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ :

Η μεμβράνη επωάζεται μέσα σε - 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ - διάλυμα ανοσοσφαιρίνης, συμβατής με το αντίσωμα και προσημασμένης με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP),

αραιωμένου σε διάλυμα παρεμπόδισης, για 2h σε θ.π.. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις των 3min σε διάλυμα Tris-NaCl σε θ.π..

β4) ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ : Το διάλυμα εμφάνισης παρασκευάζεται επιτόπου : 30mg 4-χλωρο-1-ναφθόλης (4C1N) διαλύονται σε 10ml μεθανόλης τα οποία ακολούθως αραιώνονται 1:9 σε διάλυμα 0.1M ιμιδαζόλιου σε Tris-NaCl· μετά προστίθενται 50μl 30% V/v H₂O₂ και αμέσως η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο διάλυμα αυτό. Το H₂O₂ οξειδώνει την 4C1N, η οποία και χρωματίζεται, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο πρωτεΐνη-αντίσωμα-ανοσοσφαιρίνη-υπεροξειδάση-4C1N να γίνεται ορατό, σε χρόνο 5-30 min. Όταν ολοκληρωθεί η χρώση, η αντίδραση σταματάει με έκπλυση της μεμβράνης σε H₂O. Η χρώση με την πάροδο του χρόνου, και κυρίως με έκθεση σε φώς, χάνεται. Η μεμβράνη φυλάσσεται στεγνή σε σκοτεινό μέρος μέχρι να φωτογραφηθεί.

2.2.10. Ανοσοφθορισμός : Πρόκειται για μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μορφολογική παρατήρηση της παρουσίας ή και της οργάνωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα.

Τα κύτταρα αρχικά υπόκεινται, μέσω κατάλληλης επώασης, σε μονιμοποίηση και διαπερατοποίηση. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη αφενός μεν για να μονιμοποιηθεί η εσωτερική οργάνωση των κυττάρων και να σταθεροποιηθούν οι τυχόν δομές ή δίκτυα τα οποία σχηματίζουν ή οργανώνουν ή στα οποία συμμετέχουν οι προς παρατήρηση πρωτεΐνες, αφετέρου δε για να γίνουν οι κυτταρικές μεμβράνες διαπερατές για τα αντίστοιχα αντισώματα. Οι βασικές αρχές της τεχνικής από το σημείο αυτό και μετά είναι παρόμοιες με αυτές της western blot : οι πρωτεΐνες αναγνωρίζονται στα κύτταρα από τα αντίστοιχα αντισώματα. Αυτά ακολούθως αναγνωρίζονται από τις αντίστοιχες ανοσοσφαιρίνες προσημασμένες με κάποια φθορίζουσα ουσία. Το σύμπλοκο πλέον πρωτεΐνη-αντίσωμα-ανοσοσφαιρίνη-φθορίζουσα, μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στο υπεριώδες, εκπέμπει μέσω της φθορίζουσας ουσίας σε άλλο μήκος κύματος, στο ορατό.

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού όπως ήδη περιγράφηκε, με τα δύο δηλαδή στάδια επώασης με αντισώματα και ανοσοσφαιρίνες (έμμεσος ανοσοφθορισμός), εφαρμόζεται για όλες τις πρωτεΐνες εκτός από την ακτίνη (άμεσος φθορισμός). Ειδικά για την ακτίνη, μετά την μονιμοποίηση-διαπερατοποίηση των κυττάρων εφαρμόζεται μόνον ένα στάδιο επώασης (άμεσος φθορισμός) με το σύμπλοκο ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη. Η ροδαμίνη είναι φθορίζουσα ουσία, ενώ η φαλλοϊδίνη είναι μία φαλλοτοξίνη που συνδέεται ομοιοπολικά με δεσμό υψηλής συγγένειας με την F-ακτίνη σταθεροποιώντας συγχρόνως τις δομές των MI (Wieland.1977).

Αναλυτικά η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε έχει ως εξής (Redmond.1989, Stournaras.1991) : Τα κύτταρα τοποθετούνται επάνω σε καλυπτρίδες (10^5 κύτταρα/καλυπτρίδα), μέσα σε τρυβλία, και καλλιεργούνται για τουλάχιστον 24h. Μετά η καλυπτρίδα εκπλύνεται με PBS και τα κύτταρα μονιμοποιούνται και διαπερατοποιούνται. Η κύρια μέθοδος μονιμοποίησης-διαπερατοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμβάπτιση των καλυπτρίδων σε διάλυμα ακετόνης-μεθανόλης, σε αναλογία 9:1, για 20, 40 ή 60 min σε θ.π.· εναλλακτικά, όπου απαιτήθηκε, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εμβάπτισης σε διάλυμα 3.7% W/v παραφορμαλδεΰδης σε PBS για 20min, 60min ή 12h, έκπλυσης με PBS και εμβάπτισης σε ακετόνη -20°C για 5min. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις των 3min με PBS σε θ.π. και επώαση των κυττάρων με 100μl αντισώματος, στην κατάλληλη αραιώση, ανά καλυπτρίδα, για 20min στους 4°C. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις των 3min με PBS σε θ.π. και επώαση των κυττάρων με 100μl αντίστοιχης ανοσοσφαιρίνης, προσημασμένης με φθορίζουσα ουσία (FITC ή Texas Red), στην κατάλληλη αραιώση, ανά καλυπτρίδα, για 20min στους 4°C. Για παρατήρηση της ακτίνης αρκεί μια επώαση των κυττάρων με 100μl διαλύματος ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης αραιωμένου 1:9 σε PBS, ανά καλυπτρίδα, για 20min στους 4°C. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις των 3min με PBS σε θ.π. και τοποθέτηση των καλυπτρίδων ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες εφοδιασμένες με 20μl 50% V/v γλυκερόλης σε PBS. Τα κύτταρα παρατηρούνται και φωτογραφίζονται σε μικροσκόπιο (Leitz Dialux 2 OEB) εφοδιασμένο με φακούς μεγένθυσης 400X και 1000X, συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας και κάμερα 35mm.

2.2.10.1. Διπλός ανοσοφθορισμός : Όταν δύο αντισώματα προέρχονται από διαφορετικά είδη είναι δυνατόν, μέσω αυτών, να παρατηρήσουμε συγχρόνως δύο διαφορετικές δομές στο ίδιο κύτταρο. Προς τούτο τα προς παρατήρηση κύτταρα επωάζονται αρχικά με το ένα αντίσωμα σε συνδιασμό με την αντίστοιχη προσημασμένη ανοσοσφαιρίνη (π.χ. FITC-IgG) και ακολούθως με το δεύτερο αντίσωμα σε συνδιασμό με την αντίστοιχη ανοσοσφαιρίνη προσημασμένη με φθορίζουσα ουσία που εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος (π.χ. Texas Red - IgG). Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας το σύμπλοκο ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη για την ακτίνη και ένα αντίσωμα σε συνδιασμό με την αντίστοιχη προσημασμένη με FITC ανοσοσφαιρίνη.

2.2.11. Εκχύλιση με Triton : (Schliva.1981) Η τεχνική της εκχύλισης των κυττάρων με Triton X-100, χαρακτηριστικό μη ιοντικό απορρυπαντικό, εφαρμόζεται για να εκχυλιστούν από το εσωτερικό των κυττάρων τα κυτταρικά συστατικά που είναι λιγότερο σταθερά από το κυτταροσκελετικό δίκτυο. Η βασική αυτή ιδιότητα

του κυτταροσκελετού να ανθίσταται σε τέτοιου είδους απορρυπαντικά επιτρέπει την περαιτέρω καθαρότερη παρατήρηση του σε πειράματα ανοσοφθορισμού, χωρίς πιθανές παρεμποδίσεις, καθώς και την παρατήρηση τυχόν άλλων πρωτεϊνών που είτε συνδέονται με τον κυτταροσκελετό είτε σχηματίζουν δομές εξίσου ανθεκτικές σε μη ιοντικά απορρυπαντικά.

Τα προς εκχύλιση κύτταρα εκπλύνονται με ρυθμιστικό διάλυμα PHEM (60mM HEPES, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 6.9) και ακολούθως επωάζονται με διάλυμα 0.15% V/v Triton X-100 σε PHEM για 1-1.5 min. Η παρατήρηση των πρωτεϊνών που ακολουθεί γίνεται με την τεχνική του ανοσοφθορισμού που έχει ήδη περιγραφεί.

2.2.12. Απομόνωση τουμπουλίνης : (Shelanski.1973) Η απομόνωση της τουμπουλίνης βασίζεται στην ιδιότητα της πρωτεΐνης αυτής να πολυμερίζεται και να αποπολυμερίζεται ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται.

Εγκέφαλος χοίρου (400-800 gr) καθαρίζεται από λιπαρούς ιστούς και εκπλύνεται με διάλυμα Α που περιέχει 55mM NaH₂PO₄, 10mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1mM EDTA, με pH 6.5. Στη συνέχεια προστίθενται 0.75 όγκοι διαλύματος Α και το μείγμα ομογενοποιείται σε συσκευή ULTRA-TURRAX στους 0°C. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται (15,000xg, 30min, 4°C) για έναν πρώτο καθαρισμό από σχετικά μεγάλα στερεά, και το υπερκείμενο επαναφυγοκεντρείται (100,000xg, 30min, 4°C). Το πρωτεϊνικό διάλυμα που λαμβάνεται σαν υπερκείμενο γίνεται 4M σε γλυκερόλη και 1mM σε GTP, αναδεύεται καλά και επωάζεται 30min στους 37°C. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η τουμπουλίνη πολυμερίζεται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (100,000xg, 30min, 37°C), μετά την οποία η τουμπουλίνη συγκεντρώνεται στο ίζημα. Το ίζημα επανασκορπίζεται σε όγκο διαλύματος Β (100mM Pipes, 1mM MgCl₂, 0.1mM GTP, pH 6.9) ίσο με το 1/10 του όγκου του υπερκείμενου που απορρίπτεται, το μείγμα ομογενοποιείται σε συσκευή Dounce στους 0°C και παραμένει στους 0°C για 30min. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η τουμπουλίνη αποπολυμερίζεται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (100,000xg, 30min, 4°C) μετά την οποία η τουμπουλίνη λαμβάνεται υπό μορφήν διαλύματος στο υπερκείμενο. Για περαιτέρω καθαρισμό και συμπύκνωση του διαλύματος της τουμπουλίνης, τα στάδια πολυμερισμού και αποπολυμερισμού που περιγράφηκαν παραπάνω επαναλαμβάνονται ακόμη μια φορά. Το τελικό υπερκείμενο γίνεται 4M σε γλυκερόλη και φυλάσσεται στους -70°C.

2.2.13. Νεφελομετρική μέθοδος παρατήρησης πολυμερισμού τουμπουλίνης : (Faulstich.1984b) Η μέθοδος στηρίζεται στην αύξηση της απορρόφησης διαλύματος τουμπουλίνης, όταν αυτό βρεθεί σε συνθήκες πολυμερισμού. 1ml

διαλύματος τουμπουλίνης (στο οποίο συνυπάρχουν και οι MAPs) συγκέντρωσης $2 \times 10^{-5} \text{M}$ μεταφέρεται από τους 0°C σε κυψελίδα φασματομέτρου, προστίθενται 10μl διαλύματος 100mM GTP και παρακολουθείται η απορρόφηση στα 350nm, στους 37°C , για 30min.

2.2.14. Απομόνωση ακτίνης : (Faulstich.1984a) Η απομόνωση της ακτίνης βασίζεται στην ιδιότητα της πρωτεΐνης αυτής να πολυμερίζεται και να αποπολυμερίζεται ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται.

Σε 1.5gr αποξηραμένου μυ κουνελιού προστίθενται 30ml H_2O και το μείγμα παραμένει στους 0°C για 20min. Ακολουθεί μια πρώτη διήθηση σε ηθμό κενού (Buchner) και μια δεύτερη διήθηση του διηθήματος σε πτηχωτό ηθμό. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που λαμβάνεται σαν διήθημα γίνεται 2mM σε Tris και 1.5mM σε MgCl_2 , αναδεύεται καλά και παραμένει σε ηρεμία για 90min σε θ.π.. Κάτω από τις συνθήκες αυτές η ακτίνη πολυμερίζεται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του μείγματος ($250,000 \times g$, 60min, 4°C). Το ίζημα εκπλύνεται με ρυθμιστικό διάλυμα A που περιέχει 1mM Tris-HCl pH 7.4 και 100mM KCl, μεταφέρεται σε 20ml διαλύματος A και ομογενοποιείται σε συσκευή Dounce στους 0°C . Με νέα φυγοκέντρηση του μείγματος ($250,000 \times g$, 60min, 4°C) η ακτίνη λαμβάνεται πολυμερισμένη και καθαρή, υπό μορφήν ιζήματος. Το ίζημα εκπλύνεται με διάλυμα A και μεταφέρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα B που περιέχει 1mM Tris-HCl pH 7.4 και $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ATP. Το μείγμα ομογενοποιείται σε συσκευή Dounce στους 0°C . Κάτω από τις συνθήκες αυτές η ακτίνη λαμβάνεται αποπολυμερισμένη, υπό μορφήν διαλύματος και τελικής συγκέντρωσης $2 \times 10^{-5} \text{M}$. Το διάλυμα αυτό της ακτίνης χρησιμοποιείται άμεσα για πειράματα πολυμερισμού, αλλιώς φυλάσσεται στους -70°C .

2.2.15. Ιξωδομετρική μέθοδος παρατήρησης πολυμερισμού ακτίνης : (Faulstich.1984a) Η μέθοδος στηρίζεται στην αύξηση του ιξώδους διαλύματος ακτίνης, όταν αυτό βρεθεί σε συνθήκες πολυμερισμού.

1ml διαλύματος ακτίνης τοποθετείται από τους 0°C σε ιξωδόμετρο Ostwald, προστίθενται 50μl διαλύματος 40mM MgCl_2 και μετράται το ιξώδες του, στους 25°C , για 15min. Το ιξώδες σε κάθε χρονική στιγμή x υπολογίζεται, με βάση τους χρόνους που καταμετρούνται, από τη σχέση $\eta_x = t_x / t_0$.

2.2.16. Φασματομετρική μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης διαλυμάτων τουμπουλίνης και ακτίνης : (Faulstich.1984a, Faulstich.1984b) Η μέθοδος στηρίζεται στην εφαρμογή του νόμου Lambert-Beer : $A = \epsilon \times L \times c$, όπου A είναι η απορρόφηση διαλύματος πρωτεΐνης συγκέντρωσης c και σταθεράς απορρόφησης ϵ , μέσα σε κυψελίδα ενεργού μήκους (διαδρομής της δέσμης φωτός) L, στο

υπεριώδεις. Οι κυψελίδες που χρησιμοποιούμε είναι ενεργού μήκους 1cm· έτσι ο νόμος τροποποιείται, ως προς την συγκέντρωση, σε $c = A / \epsilon$.

Για τα διαλύματα τουμπουλίνης μετράται η απορρόφηση στα 280nm, όπου η σταθερά απορρόφησης ϵ_{tub} είναι $123,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Για τα διαλύματα ακτίνης μετράται η απορρόφηση στα 290nm, όπου η σταθερά απορρόφησης ϵ_{act} είναι $26,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.17. Ανοσοκατακράτηση : Η μέθοδος αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή χρωματογραφίας αγχιστείας. Στον τύπο αυτό χρωματογραφίας το μόριο που πρόκειται να απομονωθεί δεσμεύεται ισχυρά και αντιστρεπτά με μια συμπληρωματική ως προς αυτό ουσία (υποκαταστάτης), ακινητοποιημένη σε αδιάλυτο στήριγμα (μήτρα). Στην περίπτωση της ανοσοκατακράτησης τα μόρια που πρόκειται να δεσμευθούν είναι αντισώματα (ανοσοσφαιρίνες).

Στην παρούσα εφαρμογή ο υποκαταστάτης είναι μόρια πρωτεΐνης A, ακινητοποιημένα σε μήτρα πηκτώματος αγαρόζης (protein A-sepharose). Η πρωτεΐνη A δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια τις ανοσοσφαιρίνες Γ (IgG) και αρκετές από τις υπόλοιπες ανοσοσφαιρίνες των περισσότερων θηλαστικών, αντιδρώντας με το σταθερό τμήμα τους (Fc). Επειδή στην αντίδραση αυτή δεν συμμετέχει το τμήμα της ανοσοσφαιρίνης που της προσδίδει την ιδιότητα του αντισώματος, το σύμπλοκο που δημιουργείται μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και τον καθαρισμό των αντίστοιχων πρωτεϊνών-αντιγόνων από πρωτεϊνικά διαλύματα.

Κλάσμα κυτταροπλάσματος αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος 50mM NaCl σε διάλυμα HEG (10mM Hepes-NaOH pH 7.6, 1mM EDTA, 10% v/v γλυκερόλη), στους 0°C, και στο μείγμα προστίθεται το σχετικό με την προς μελέτη πρωτεΐνη αντίσωμα, στην ενδεικνυόμενη συγκέντρωση. Το μείγμα επωάζεται, με ανάδευση, για 4-16 h στους 0°C, οπότε και ολοκληρώνεται η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Το μείγμα μετά προστίθεται σε 50ml καθαρού όγκου πηκτώματος (δημιουργείται από 20μg protein A-sepharose) προεξισορροπημένου σε διάλυμα 50mM NaCl σε HEG και επωάζονται μαζί, με ανάδευση, για 4h στους 0°C, οπότε και ολοκληρώνεται η σύνδεση πρωτεΐνης A-αντισώματος. Μετά από 3 εκπλύσεις του πηκτώματος με 1ml διαλύματος 50mM NaCl σε HEG, ακολουθούν δύο διαφορετικές κατά περίπτωση σειρές εκπλύσεων :

α) Δύο εκπλύσεις με 1ml διαλύματος 50mM NaCl σε HEG· οι ήπιες συνθήκες έκπλυσης δεν απομακρύνουν πρωτεΐνες που τυχόν είναι συνδεδεμένες με την πρωτεΐνη-αντιγόνο.

β) Μια έκπλυση με 1ml διαλύματος 400mM NaCl σε HEG, και μια έκπλυση με 1ml διαλύματος 400mM NaCl, 0.2% v/v Triton X-100 σε HEG· κάτω από τις συνθήκες αυτές διατηρούνται μόνον οι ισχυροί δεσμοί αντιγόνου-αντισώματος.

Το πήκτωμα ακολούθως διασκορπίζεται σε διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων, το πρωτεϊνικό διάλυμα ηλεκτροφορείται, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολουθεί υβριδοποίηση.

2.2.18. Απομόνωση RNA : (Auffray.1980) Τα κύτταρα εκπλύνονται με PBS, φυγοκεντρούνται και αναμιγνύονται με (1ml / 10×10^6 κύτταρα) φρέσκο διάλυμα λύσης, που περιέχει 6M ουρία, 3M LiCl, 10mM EDTA, 2% V/v Triton X-100 και 0.5% W/v SDS, από τους 0°C. Το μείγμα αναδεύεται έντονα για 1min και μετά αφήνεται σε ηρεμία για 12-16 h στους 0°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (15,000xg, 30min, 4°C), απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος, που περιέχει κατά βάση RNA, σε (100μl / 10×10^6 κύτταρα) διάλυμα που περιέχει 10mM Tris-HCl pH 7.4 και 1mM EDTA.

2.2.19. Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη : (Maniatis.1989) Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από υδατικά διαλύματα νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα της φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι κορεσμένο σε 2M Tris-HCl pH 7.4. Επιπλέον περιέχει 0.1% V/v β-μερκαπτοαιθανόλη (αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών) και 0.05% W/v 8-υδροξυκινολίνη (αντιοξειδωτικός παράγοντας που χρωματίζει κίτρινη την φαινολική στοιβάδα). Στο RNA ή DNA υδατικό διάλυμα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης. Το μείγμα ανακινείται έντονα και φυγοκεντρείται (15,000xg, 5min, 4°C). Η φαινολική στοιβάδα απορρίπτεται, η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές, με ίσο όγκο μείγματος φαινόλης-χλωροφόρμιου αναλογίας 1:1 και ίσο όγκο χλωροφόρμιου αντίστοιχα, και η υδατική φάση τελικά γίνεται 75% V/v σε αιθανόλη και 0.3M σε CH₃COONa pH 6.0. Το μείγμα ανακινείται και παραμένει τουλάχιστον 4h στους -20°C ή 15min στους -70°C. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (15,000xg, 15min, 4°C), έκπλυση του ιζήματος με 75% V/v αιθανόλη και ξήρανση. Το ίζημα, ξηρό πλέον, διαλύεται σε H₂O. Εάν πρόκειται να συντηρηθεί, το RNA διάλυμα γίνεται πάλι 75% V/v σε αιθανόλη και 0.3M σε CH₃COONa pH 6.0 και φυλάσσεται στους -20°C, ενώ το DNA διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C στην υδατική του μορφή.

2.2.20. Φασματομετρικός ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων : (Davis.1986) Τα νουκλεοτίδια που συνθέτουν τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστο στα 260nm. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων.

Για RNA διαλύματα η συγκέντρωση υπολογίζεται σαν το δεκαπλάσιο της απορρόφησης, στα 260nm, όγκου 4μl αραιωμένου σε 1ml H₂O. Η καθαρότητα του ίδιου διαλύματος εκφράζεται με το λόγο A_{260} / A_{280} . Ο λόγος αυτός πρέπει να πλησιάζει το 2.0 και τουλάχιστον να μην είναι μικρότερος του 1.6· στην περίπτωση αυτή ικανή ποσότητα πρωτεϊνών ή φαινόλης έχει παραμείνει στο διάλυμα.

Για DNA διαλύματα οι ίδιες πληροφορίες λαμβάνονται από την απορρόφηση όγκου 5μl αραιωμένου σε 1ml H₂O στα 260nm και στα 280nm.

2.2.21. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης : (Davis.1986)

Τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να διαχωριστούν σε οριζόντια πηκτή αγαρόζης ανάλογα με το μέγεθος τους. Αυτό επιτυγχάνεται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα της πηκτής, σε περιβάλλον στο οποίο τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζονται αρνητικά φορτισμένα. Ο προσδιορισμός της θέσης τους πάνω στην πηκτή μπορεί να γίνει απευθείας, με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 1μg/ml, το οποίο έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται πάνω σε νουκλεϊκά οξέα και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός μήκους κύματος 254 ή 365 nm. Η μέθοδος εντόπισης αυτή είναι πολύ ευαίσθητη· μικρά ποσά RNA ή DNA (μέχρι και 1ng) μπορούν να ανιχνευθούν με απλή εξέταση της πηκτής στο υπεριώδες.

Η περιεκτικότητα των διαφόρων πηκτών σε αγαρόζη διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων των οποίων επιχειρείται ο διαχωρισμός, και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0.5% W/v για οξέα των 200-2,000 βάσεων και 1.5% W/v για οξέα των 20,000-100,000 βάσεων.

α) RNA ΔΕΙΓΜΑΤΑ : Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχει 20mM MOPS, 5mM CH₃COONa και 1mM EDTA, με pH 5.5-7.0.

Το RNA δείγμα από τους -20°C φυγοκεντρείται (15,000xg, 15min, 4°C), το ίζημα εκπλύνεται με 75% V/v αιθανόλη, ξηραίνεται και διαλύεται σε 25μl διαλύματος διαλυτοποίησης (50% V/v φορμαμίδιο, 0.025% W/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 8% V/v γλυκερόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης). Ακολουθεί θέρμανση στους 95°C για 3min και αμέσως μετά τοποθέτηση στους 0°C, όπου διατηρείται αποδιαταγμένο.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τάση 50-100 volt για 1-4 h, μέχρις ότου δηλαδή η χρωστική διανύσει τα 3/4 της πηκτής.

β) DNA ΔΕΙΓΜΑΤΑ : Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχει 50mM Tris, 50mM H₃BO₃ και 1mM EDTA.

Το DNA δείγμα αραιώνεται σε αναλογία 9:1 με διάλυμα διαλυτοποίησης που περιέχει 0.25% W/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% W/v ξυλόλιο-κυανόλη, 10mM EDTA και 80% V/v γλυκερόλη.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τάση 50-100 volt για 1-4 h, μέχρις ότου δηλαδή η χρωστική διανύσει τα 3/4 της πηκτής.

2.2.22. Northern blot : Τεχνική που χρησιμοποιείται για την ειδική ανίχνευση RNA μορίων, που έχουν μεταφερθεί από πηκτή αγαρόζης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με τη βοήθεια ραδιενεργά σημασμένων συμπληρωματικών μορίων DNA (c-DNAs) που χρησιμοποιούνται σαν ειδικοί ανιχνευτές (probes).

α) ΜΕΤΑΦΟΡΑ RNA : (Davis.1986) Δείγματα RNA ηλεκτροφορούνται όπως έχει ήδη περιγραφεί, με τη διαφορά ότι το διάλυμα διαλυτοποίησης και η πηκτή αγαρόζης περιέχουν φορμαλδεΰδη σε τελική συγκέντρωση 2.2M. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εκπλύνεται δύο φορές, επί 20min κάθε φορά, με διάλυμα μεταφοράς το οποίο περιέχει 1.5M NaCl και 0.15M κιτρικό νάτριο σε pH 7.0, για να απομακρυνθεί η περίσσεια της φορμαλδεΰδης. Συγχρόνως κόβονται στις ακριβείς διαστάσεις της πηκτής μια μεμβράνη πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης και τέσσερα χαρτιά whatman 3MM, και η μεμβράνη βυθίζεται σε H₂O. Στη συνέχεια η πηκτή, η μεμβράνη και τα χαρτιά διατάσσονται με τη σειρά που φαίνεται στην εικόνα (3). Η μεταφορά του RNA επιτυγχάνεται μέσω της μετακίνησης υγρού από τη δεξαμενή στα υδρόφιλα χαρτιά και ολοκληρώνεται σε 12-16 h. Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη εκπλύνεται με H₂O, στεγνώνει για 10min στους 80°C και τελικά εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, με την πλευρά του RNA προς την πηγή και σε απόσταση από αυτήν 12-15 cm, για 2-5 min, με σκοπό την μονιμοποίηση του RNA στην μεμβράνη. Η μεμβράνη φυλάσσεται πλέον για μελλοντική υβριδοποίηση.

β) ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ : (Smith.1980, Church.1984, Maniatis.1989)

β1) ΠΡΟΪΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ : Η μεμβράνη εκπλύνεται με διάλυμα 40mM φωσφορικών (διάλυμα 1M φωσφορικών παρασκευάζεται με διάλυση 71g Na₂HPO₄ και 4ml 85% V/v H₃PO₄ σε 1lt H₂O), μετά βυθίζεται σε 10ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο περιέχει 0.5M φωσφορικών, 7% W/v SDS, 1% W/v BSA και 1mM EDTA, προθερμασμένο στους 65°C, και παραμένει στους 65°C για τουλάχιστον 1h.

β2) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ - ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ : 5μl διαλύματος του προς μελέτη cDNA συγκέντρωσης 5-20 μg/ml θερμαίνονται για 2min στους 95°C και αμέσως μετά ψύχονται στους 0°C. Ακολούθως προστίθενται στο διάλυμα 14μl

διαλύματος ολιγονουκλεοτιδίων (το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με ανάμειξη, σε αναλογίες 25:25:7, των εξής διαλυμάτων: α) 1M Hepes-NaOH pH 6.6, β) 100μM dGTP και 100μM dTTP σε διάλυμα 250mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM MgCl₂, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, γ) 90 units/ml εξανουκλεοτίδια σε διάλυμα 1mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA), 1μl διαλύματος 10% W/v BSA, 3μl διαλύματος 12.5μM dATP[α-³²P], 3μl διαλύματος 12.5μM dCTP[α-³²P] και 2μl διαλύματος 5 units/μl DNA-πολυμεράσης I (τμήμα Klenow). Το διάλυμα επωάζεται στους 37°C για 0.5-4 h. Η δράση του ενζύμου διακόπτεται με την προσθήκη 2μl διαλύματος 0.5M EDTA pH 8.0. Το διάλυμα συμπληρώνεται με διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA μέχρι τα 100μl και διέρχεται από στήλη χρωματογραφίας Sephadex G-50, προεξισορροπημένη σε διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, ως εξής : η στήλη που έχει συμπιεστεί μέσα σε σύριγγα ινσουλίνης μετά από φυγοκέντρηση (1,600xg, 5min, θ.π.) επαναφυγοκεντρείται μαζί με το διάλυμα κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες.

Το διάλυμα που λαμβάνεται από την στήλη θερμαίνεται στους 95°C για 2min και αμέσως μετά ψύχεται στους 0°C. Ακολούθως προστίθεται στο διάλυμα υβριδοποίησης όπου βρίσκεται βυθισμένη η μεμβράνη, της οποίας η επώαση στους 65°C συνεχίζεται για 16-20 h.

γ) ΕΜΦΑΝΙΣΗ : Η μεμβράνη εκπλύνεται σε διάλυμα έκπλυσης, το οποίο περιέχει 40mM φωσφορικών, 5% W/v SDS και 1mM EDTA, προθερμασμένο στους 65°C, 3 φορές από 20min. Ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ στους -70°C.

Εάν η μεμβράνη πρόκειται να επανυβριδοποιηθεί εκπλύνεται σε διάλυμα 10mM φωσφορικών, 0.1% W/v SDS και 1mM EDTA, στους 95°C για 10min.

2.2.23. Προετοιμασία των cDNAs : (Hanahan.1983, Davis.1986, Maniatis.1989)

Όλα τα cDNAs προσφέρθηκαν σε βακτηριακές αποικίες, ενσωματωμένα σε πλασμίδια. Τα στάδια επεξεργασίας τους είναι τα εξής:

α) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ : Μια από τις αποικίες των βακτηρίων αναπτύσσεται σε 10ml LB-μέσου με το κατάλληλο αντιβιοτικό, σε ανακινητή θερμοκρασίας 37°C για 6-8 h. Το LB-μέσο παρασκευάζεται με διάλυση 5gr NaCl, 10gr bacto-tryptone και 5gr bacto-yeast extract σε 1lt H₂O. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η τετρακυκλίνη σε συγκέντρωση 12.5 μg/ml και η αμπικυλλίνη σε συγκέντρωση 50μg/ml. Η βακτηριακή καλλιέργεια είτε αναμιγνύεται με ίσο όγκο γλυκερόλης και φυλάσσεται σε κλάσματα του 0.5-1 ml στους -70°C είτε χρησιμοποιείται όπως περιγράφεται αμέσως μετά.

Η καλλιέργεια των βακτηρίων αραιώνεται από τα 10ml σε 4 κωνικές φιάλες με 250ml από το ίδιο LB-μέσο στην κάθε μια, και επωάζεται στις ίδιες συνθήκες για

12-16 h. Τα αιωρήματα φυγοκεντρώνται (2,000xg, 4°C, 10min), κάθε ίζημα επανασκορπίζεται σε 5ml διαλύματος GTE (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA), εκπλύνεται και φυγοκεντρείται (2,500xg, 4°C, 20min). Κάθε ίζημα επανασκορπίζεται σε 5ml διαλύματος GTE, στο αιώρημα προστίθενται 10ml διαλύματος που περιέχει 0.2N NaOH και 1% W/v SDS, το αιώρημα ανακινείται έντονα και παραμένει στους 0°C για 10min. Κάτω από τις συνθήκες αυτές οι βακτηριακές μεμβράνες χάνουν τη συνοχή τους και ανοίγουν. Σε κάθε αιώρημα προστίθενται 7.5ml διαλύματος που περιέχει 3M CH₃COOK και 11.5% V/v CH₃COOH σε pH 5.2, το αιώρημα ανακινείται έντονα και παραμένει στους 0°C για 10min. Κάτω από αυτές τις συνθήκες καταβυθίζονται οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA των βακτηρίων. Ακολούθως κάθε αιώρημα φυγοκεντρείται (10,000xg, 4°C, 30min), το υπερκείμενο, αφού περάσει από φίλτρο υαλοβάμβακα για να κατακρατηθούν αιωρούμενα σωματίδια, αναμιγνύεται με 0.6 όγκους ισοπροπανόλης και παραμένει στους 0°C για 10min· παρουσία ισοπροπανόλης καθιζάνουν το DNA και το RNA. Μετά από φυγοκέντρηση (8,000xg, 4°C, 20min) κάθε ίζημα διαλύεται σε 5ml διαλύματος 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA, προστίθενται σε αυτό 5ml διαλύματος 5M LiCl, ανακινείται έντονα και παραμένει στους 0°C για 20min. Στο περιβάλλον του LiCl καθιζάνει το RNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (8,000xg, 4°C, 20min), απόρριψη των ιζημάτων και ανάμειξη κάθε υπερκείμενου με 2.5 όγκους αιθανόλης, με σκοπό την καταβύθιση του πλασμιδιακού DNA. Μετά από παραμονή στους 0°C για 20min και φυγοκέντρηση (5,000xg, 4°C, 20min) όλα τα ιζήματα επαναδιαλύονται από κοινού σε 500μl διαλύματος 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 50μl διαλύματος 2mg/ml RNAάσης A και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20min με σκοπό την αποικοδόμηση του RNA που τυχόν παρέμεινε. Στο διάλυμα προστίθενται 500μl διαλύματος που περιέχει 2.5M NaCl και 20% V/v πολυαιθυλενογλυκόλη (MB 8,000) και μετά από παραμονή στους 0°C για 30min το DNA επανακαθιζάνει. Μετά από φυγοκέντρηση (15,000xg, 4°C, 15min), το ίζημα επαναδιαλύεται σε 400μl διαλύματος 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη και φασματομετρικός προσδιορισμός όπως έχουν ήδη περιγραφεί.

β) ΑΠΟΚΟΛΛΗΣΗ ΤΩΝ cDNAs ΑΠΟ ΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ENZYMΩΝ : "Μια μονάδα (unit) ενζύμου έχει τη δυνατότητα να τεμαχίσει ένα μg DNA μετά από επώαση για 1h στους 37°C σε περιβάλλον 10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM MgCl₂, 1mM DTT και NaCl συγκέντρωσης 0, 50, 100 ή 150 mM, που ποικίλει σε σχέση με το ένζυμο." Με γνώμονα αυτά τα στοιχεία αναμιγνύονται όγκοι διαλυμάτων (α) πλασμιδίου εφοδιασμένου με cDNA ικανής ποσότητας, (β) ενζύμου με αντίστοιχο πλήθος μονάδων, (γ) 100mM Tris-HCl pH

7.4, 100mM MgCl₂, 10mM DTT και NaCl συγκέντρωσης 0, 0.5, 1 ή 1.5 M που ποικίλει σε σχέση με το ένζυμο, και (δ) H₂O μέχρι ο όγκος του τελικού διαλύματος να γίνει δεκαπλάσιος του όγκου του διαλύματος (γ). Ακολουθεί επώαση του διαλύματος στους 37°C για 1h. Ολόκληρη η ποσότητα του διαλύματος αμέσως μετά ηλεκτροφορείται σαν αυτοτελές δείγμα, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η περιοχή της αγαρόζης με το cDNA, όπως φαίνεται στο υπεριώδες, κόβεται, τοποθετείται μέσα σε σακούλα διαπίδωσης και βυθίζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης, με τη μεγάλη της διάσταση παράλληλα με τα ηλεκτρόδια· η συσκευή περιέχει τώρα διάλυμα 25mM Tris, 25mM H₃BO₃ και 0.5mM EDTA, ενώ η σακούλα διαπίδωσης περιέχει 0.5ml του ίδιου διαλύματος. Στη συσκευή εφαρμόζεται πεδίο σταθερής τάσης 150 volt για 1h και αμέσως μετά πεδίο ίδιας τάσης αλλά με ανεστραμμένους τους πόλους για 1min. Το DNA έχει πλέον μεταφερθεί από την αγαρόζη στο διάλυμα μέσα στη σακούλα διαπίδωσης. Το διάλυμα αυτό, καθώς και 0.5ml ακόμη με το οποίο εκπλύνεται η σακούλα διαπίδωσης, διέρχεται από μια μίνι στήλη χρωματογραφίας DEAE DE-52, προεξισορροπημένης με διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA. Το καθαρό DNA το οποίο προσροφάται στη στήλη επανακτάται με διέλευση από τη στήλη 400μl διαλύματος 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA, 2M NaCl. Στα 400μl του διαλύματος που λαμβάνονται από τη στήλη, προστίθενται 2-2.5 όγκοι αιθανόλης, οπότε και καταβυθίζεται το DNA. Με διαδικασίες που έχουν ήδη περιγραφεί, τελικά λαμβάνεται υδατικό διάλυμα του συγκεκριμένου cDNA, γνωστής συγκέντρωσης και καθαρότητας, το οποίο φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.23.1. Προετοιμασία των cDNAs ακτίνης και τουμπουλίνης

Τα cDNAs των α- και β- τουμπουλίνης ήταν ενσωματωμένα σε βακτήρια τύπου *e.coli* (RR1)· της α-τουμπουλίνης σε pBR322 πλασμίδιο και σε θέση PstI, ενώ της β-τουμπουλίνης επίσης σε pBR322 πλασμίδιο αλλά σε θέση HindIII. Τα πλασμίδια απομονώθηκαν μετά από εκχύλιση από τα βακτήρια, και η συγκέντρωση και η καθαρότητα τους ελέγχθηκε φασματομετρικά· 5-10 μl αραιώθηκαν στο 1ml με H₂O και φασματομετρήθηκαν στην περιοχή των 220-320 nm. Στα φάσματα (εικόνες 4,5) φαίνεται η νουκλεοτιδική μόνον σύνθεση των διαλυμάτων (μία μόνον κορυφή απορρόφησης, στην περιοχή των 260nm), η καθαρότητα των διαλυμάτων εκφράζεται από τον λόγο A_{260} / A_{280} , ενώ η συγκέντρωση των διαλυμάτων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την απορρόφηση στα 260nm. Το cDNA της β-ακτίνης αντίθετα είχε προσφερθεί κατευθείαν σε πλασμίδιο pUC-18 και σε PstI θέση.

Ακολούθησε αποκόλληση των cDNAs από τα πλασμίδια με την βοήθεια των αντίστοιχων περιοριστικών ενζύμων. Τα αποτελέσματα της απομόνωσης των cDNAs ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση, σε πήκτωμα αγαρόζης, των πλασμιδίων πριν και μετά την δράση των αντίστοιχων περιοριστικών ενζύμων, καθώς και των cDNAs μετά το πέρας του καθαρισμού. Στις εικόνες (6,7,8) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων αυτών, στις οποίες αφενός επαληθεύονται τα μεγέθη των πλασμιδίων και των cDNAs, αφετέρου ελέγχεται η δράση των ενζύμων στα πλασμίδια. Σαν μάρτυρας μεγεθών χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις διάλυμα DNA βακτηριοφάγου λ μετά από δράση σε αυτό του ενζύμου HindIII (λHindIII), το οποίο περιλαμβάνει μια ομάδα μεγεθών DNA από 0.56 έως 23.1 kb.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Διερεύνηση οιστρογονικής δράσης στη διαδικασία πολυμερισμού τουμπουλίνης και ακτίνης

Ο αρχικός προβληματισμός, ο οποίος οδήγησε τελικά στο βασικό ερώτημα της συνοργάνωσης της HSP-90 με δομές του ΚΣ, ήταν εάν ο ΚΣ εμπλέκεται στη δράση των οιστρογόνων ορμονών. Η καταρχήν προσέγγιση του προβληματισμού αυτού αφορούσε στο εάν ο ΚΣ αποτελεί κυτταρικό στοιχείο όπου θα μπορούσε να εκφρασθεί άμεσα η δράση των οιστρογόνων. Σε μια πρώτη σειρά πειραμάτων εξετάσαμε εάν η παρουσία των οιστρογόνων έχει επίδραση στην *in vitro* οργάνωση εκείνων των δικτύων του ΚΣ που βασίζονται σε μια δυναμική ισορροπία πολυμερισμού-αποπολυμερισμού, δηλαδή των ΜΣ και των ΜΙ. Για το σκοπό αυτό διερευνήσαμε τη δράση των οιστρογόνων στη διαδικασία πολυμερισμού της τουμπουλίνης και της ακτίνης.

3.1.1. Απομόνωση τουμπουλίνης

Για την απομόνωση της τουμπουλίνης εφαρμόσαμε σε ομογενοποίημα από εγκεφάλους χοίρων την μέθοδο εναλλαγής των συνθηκών πολυμερισμού - αποπολυμερισμού της, όπως περιγράφηκε (Shelanski.1973). Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του διαλύματος της τουμπουλίνης ελέγχθηκαν φασματομετρικά. 10μl αραιώθηκαν 1:100 με διάλυμα Α και φασματομετρήθηκαν στην περιοχή των 220-320 nm. Στο φάσμα (εικόνα **9**) φαίνεται η πρωτεϊνική μόνη σύνθεση του διαλύματος (μία μόνη κορυφή απορρόφησης, στην περιοχή των 280nm), ενώ η συγκέντρωση του διαλύματος υπολογίζεται - χρησιμοποιώντας την απορρόφηση στα 280nm - σε $1.6 \times 10^{-4} \text{M}$. Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου, τέλος, ταυτοποιείται η πρωτεΐνη του διαλύματος και ως προς το μέγεθος της. Πράγματι η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στην περιοχή των 50kd, περιοχή μεγέθους των δύο μονομερών α- και β- τουμπουλίνης (εικόνα **9α**).

3.1.1.1. Πολυμερισμός τουμπουλίνης παρουσία οιστρογόνων

Ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης παρατηρήθηκε νεφελομετρικά. Σε 1ml διαλύματος τουμπουλίνης αραιωμένου 1:10 με διάλυμα Α (τελική συγκέντρωση $1.6 \times 10^{-5} \text{M}$), στους 0°C προστίθενται 10 μl διαλύματος 100mM GTP και η κινητική του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω της μεταβολής της απορρόφησης του διαλύματος, στους 37°C, στα 350nm για 30min. Η καμπύλη της απορρόφησης του

συγκεκριμένου διαλύματος τουμπουλίνης σε σχέση με τον χρόνο, η οποία φαίνεται στην εικόνα (10), αποτελεί χαρακτηριστική καμπύλη πολυμερισμού τουμπουλίνης. Μετά από ένα αρχικό στάδιο όπου δεν παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης, λόγω σχηματισμού ολιγομερών που αποτελούν και τα κέντρα εκκίνησης του πολυμερισμού, ακολουθεί αύξηση της απορρόφησης μέχρι ενός χρονικού σημείου όπου και σταθεροποιείται. Στο σημείο αυτό έχει επέλθει πλέον δυναμική ισορροπία πολυμερισμού - αποπολυμερισμού της τουμπουλίνης.

Ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης ακολούθως παρατηρήθηκε παρουσία οιστραδιόλης σε συγκέντρωση $10^{-8}M$, της αντιοιστρογόνου ουσίας 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$, καθώς και του συνδιασμού αυτών. Οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν μέσα στις περιοχές των φυσιολογικών τιμών της οιστραδιόλης και της αντιοιστρογονικής δράσης της 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης. Όπως φαίνεται στην εικόνα (11), οι καμπύλες του πολυμερισμού και στις τρεις περιπτώσεις είναι πανομοιότυπες με την καμπύλη πολυμερισμού της τουμπουλίνης απουσία των παραγόντων αυτών. Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι παράγοντες αυτοί δεν επιφέρουν καμία αλλαγή ούτε στο ρυθμό ούτε στην έκταση του *in vitro* πολυμερισμού της τουμπουλίνης.

3.1.2. Απομόνωση ακτίνης

Για την απομόνωση της ακτίνης εφαρμόσαμε την μέθοδο εναλλαγής των συνθηκών πολυμερισμού-αποπολυμερισμού της σε ομογενοποίηση από αποξηραμένους μύες ποντικών, όπως έχει περιγραφεί (Faulstich.1984a). Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του διαλύματος της ακτίνης ελέγχθηκαν φασματομετρικά. 1ml φασματομετρήθηκε στην περιοχή των 220-320 nm. Στο φάσμα (εικόνα 12) φαίνεται η πρωτεϊνική μόνον σύνθεση του διαλύματος (μία κύρια κορυφή απορρόφησης, στην περιοχή των 290nm), ενώ η συγκέντρωση του διαλύματος υπολογίζεται - χρησιμοποιώντας την απορρόφηση στα 290nm - σε $2.1 \times 10^{-5}M$. Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου, τέλος, ταυτοποιείται η πρωτεΐνη του διαλύματος και ως προς το μέγεθος της, το οποίο τοποθετείται στην περιοχή των 42kd, περιοχή δηλαδή του μεγέθους της ακτίνης (εικόνα 12α).

3.1.2.1. Πολυμερισμός ακτίνης παρουσία οιστρογόνων

Ο πολυμερισμός της ακτίνης παρατηρήθηκε ιξωδομετρικά. Σε 1ml διαλύματος ακτίνης προστίθενται 50μl διαλύματος 40mM $MgCl_2$ και η κινητική του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω της μεταβολής του ιξώδους του διαλύματος στους 25°C για 15min. Η καμπύλη του ιξώδους του συγκεκριμένου διαλύματος

ακτίνης σε σχέση με τον χρόνο, η οποία φαίνεται στην εικόνα (13), αποτελεί χαρακτηριστική καμπύλη πολυμερισμού της ακτίνης. Το ιξώδες αυξάνεται ραγδαία μέσα στα πρώτα 3min και μετά τα 5min περίπου έχει σταθεροποιηθεί, γεγονός που σημαίνει ότι ο πολυμερισμός έχει σχεδόν ολοκληρωθεί.

Ο πολυμερισμός της ακτίνης ακολούθως παρατηρήθηκε παρουσία οιστραδιόλης συγκέντρωσης $10^{-8}M$, 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης συγκέντρωσης $10^{-6}M$ και του συνδιασμού αυτών. Όπως φαίνεται στην εικόνα (14), οι καμπύλες του πολυμερισμού και στις τρεις περιπτώσεις είναι πανομοιότυπες με την καμπύλη πολυμερισμού της ακτίνης απουσία των παραγόντων αυτών. Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδήγησαν στο ίδιο συμπέρασμα, όπως και στην περίπτωση της τουμπουλίνης, ότι οι παράγοντες αυτοί δεν επιφέρουν καμία αλλαγή ούτε στο ρυθμό ούτε στην έκταση του *in vitro* πολυμερισμού της ακτίνης.

3.2. Διερεύνηση οιστρογονικής δράσης στην έκφραση τουμπουλίνης και ακτίνης

Εχει αναφερθεί βιβλιογραφικά (Hsu.1987) ότι σε άωρες μήτρες αρουραίων παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης των ισομορφών της ακτίνης στις 4-12 h μετά τη χορήγηση οιστραδιόλης. Ακολούθησε λοιπόν μια σειρά πειραμάτων Northern blot, μέσα από τα οποία θελήσαμε να ελέγξουμε εάν, στο δικό μας κυτταρικό μοντέλο, η παρουσία οιστρογόνων επιφέρει κάποια μεταβολή στην έκφραση των mRNAs της ακτίνης ή της τουμπουλίνης.

3.2.1. Κυτταρικό μοντέλο

Πειραματικό μας μοντέλο αποτελεί η κυτταρική σειρά Ishikawa. Πρόκειται για επιθηλιακή σειρά προερχόμενη από καλώς διαφοροποιημένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου και διαθέτει υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης (Nishida.1985). Στην εικόνα (15) παρουσιάζουμε μικροφωτογραφία των κυττάρων Ishikawa σε καλλιέργεια. Εκτός από την απλή στοιβάδα που δημιουργούν τα κύτταρα, διακρίνεται και μια από τις πολυστοιβαδικές περιοχές που οργανώνονται από τα κύτταρα αυτά και αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς.

Από μελέτες που έχουν δημοσιευθεί, έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά απαντούν στην παρουσία οιστρογόνων. Καταρχήν έχει δείχθει ότι η παρουσία οιστραδιόλης επιδρά στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Holinka.1986a, Holinka.1986c). Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων αυτών, όπως φαίνεται στην εικόνα (16), παρουσιάζει αρχικά εκθετική μορφή η οποία τελικά καταλήγει σε

επίπεδο. Η παρουσία όμως οιστραδιόλης ενεργοποιεί τα κύτταρα τα οποία πλέον συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με εκθετικά αυξανόμενο ρυθμό. Η παρουσία τέλος της αντιοιστρογόνου 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης επαναφέρει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων στην αρχική του μορφή, αναστέλλοντας έτσι τη δράση της οιστραδιόλης.

Έχει επίσης δειχθεί ότι η οιστραδιόλη επιδρά στην ενεργότητα της DNA-πολυμεράσης α και της αλκαλικής φωσφατάσης των κυττάρων αυτών (Gravanis.1986a, Holinka.1986b). Η DNA-πολυμεράση α είναι ένζυμο που μετέχει στη σύνθεση του DNA και η ενεργότητα του σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ιστούς-στόχους στεροειδών ορμονών όπως τις οιστρογόνο-διεγειρόμενες μήτρες αρουραίων, ενώ η αλκαλική φωσφατάση είναι ένζυμο που έχει δειχθεί ότι επιδέχεται ρύθμιση από ορμόνες ωοθηκών σε μήτρες τρωκτικών και πιθήκων (Holinka.1977a, Holinka.1977b, Holinka.1979). Όπως φαίνεται στις εικόνες (17,18), η οιστραδιόλη έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην ενεργότητα και των δύο ενζύμων στην περιοχή συγκέντρωσης 10^{-9} - 10^{-7} M (φυσιολογικά επίπεδα οιστραδιόλης 10^{-8} M), η οποία αναστέλλεται παρουσία εκατονταπλάσιας συγκέντρωσης 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης. Στην εικόνα (19) παρουσιάζεται η κινητική της επίδρασης της οιστραδιόλης στην ενεργότητα της DNA-πολυμεράσης α . Αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου αρχίζει να γίνεται εμφανής στις 4h μετά τη χορήγηση οιστραδιόλης, παρουσιάζεται μέγιστη στις 18h και εξασθενεί μετά τις 32h. Στην εικόνα (20) παρουσιάζεται η κινητική της επίδρασης της οιστραδιόλης στην ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης. Η ενεργότητα του ενζύμου αρχίζει να αυξάνεται αισθητά 2 ημέρες μετά την χορήγηση οιστραδιόλης και παρουσιάζει το μέγιστο της αύξησης στις 3 ημέρες.

3.2.2.1. Απομόνωση-καθαρισμός συνολικού RNA από κύτταρα Ishikawa μετά από επώαση παρουσία οιστρογόνων

Από κύτταρα Ishikawa, τα οποία είχαν προηγουμένως επωασθεί για 8h απουσία και παρουσία οιστραδιόλης 10^{-8} M, 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης 10^{-6} M και του συνδιασμού αυτών, απομονώθηκε και καθαρίστηκε, μετά από εκχύλιση με φαινόλη, το συνολικό κυτταρικό RNA. Οι συγκεντρώσεις επώασης επιλέχθηκαν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσα στις περιοχές των φυσιολογικών τιμών της οιστραδιόλης και της αντιοιστρογονικής δράσης της 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης. Η συγκέντρωση των RNA διαλυμάτων υπολογίστηκε φασματομετρικά.

10 μ g από τα τέσσερα αυτά διαλύματα RNA διαχωρίστηκαν αρχικά σε ένα δοκιμαστικό πήκτωμα αγαρόζης για να ελεγχθεί ο βαθμός καθαρότητας, από προσμίξεις DNA, και μετουσίωσης, λόγω της τυχόν ύπαρξης RNA-ασων, του RNA.

Όπως φαίνεται στην εικόνα (21), είναι ορατές στο υπεριώδες οι θέσεις των δύο ριβοσωμικών RNAs, απόδειξη της απουσίας RNA-ασών στα διαλύματα, ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύεται DNA σε αυτά.

3.2.2.2. Υβριδοποίηση των mRNAs ακτίνης και τουμπουλίνης

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας καθαρισμού, ίδιες ποσότητες συνολικού RNA (10μg) και από τα τέσσερα διαλύματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία φορμαλδεΐδης, από όπου μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης (gene screen) όπου και μονιμοποιήθηκαν, όπως περιγράφεται. Κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης, στην έκθεση στο υπεριώδες ήσαν ορατές οι θέσεις των ριβοσωμικών RNAs (2 και 5 kb), οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες μεγέθους στις υβριδοποιήσεις που ακολουθούν.

Στις υβριδοποιήσεις που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν σαν ιχνηθέτες (probes) για τα mRNAs της τουμπουλίνης και της ακτίνης, προσημασμένα με P³², τα cDNAs των α-τουμπουλίνης, β-τουμπουλίνης και β-ακτίνης. Τα cDNAs αυτά είχαν προηγουμένως απομονωθεί και καθαριστεί όπως περιγράφεται πιο πάνω.

Στην εικόνα (22) παρουσιάζεται η αυτοραδιογραφία που ελήφθη από την υβριδοποίηση με το cDNA της α-τουμπουλίνης. Όπως φαίνεται, και στα τέσσερα δείγματα, οι θέσεις όπου ανιχνεύεται το mRNA της α-τουμπουλίνης όχι μόνον βρίσκονται στην ίδια θέση αλλά έχουν και την ίδια ένταση. Και στις τέσσερις, δηλαδή, συνθήκες επώασης το μέγεθος αλλά και η συγκέντρωση του παραγόμενου mRNA παραμένουν ίδια. Ομοια αποτελέσματα είχαν και οι αυτοραδιογραφίες με τα cDNAs της β-τουμπουλίνης και της β-ακτίνης που ακολούθησαν (εικόνες 23,24). Τα ευρήματα αυτά μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι, στο συγκεκριμένο κυτταρικό μοντέλο και στις συγκεκριμένες συνθήκες επώασης, η παρουσία της οιστρογόνου οιστραδιόλης, της αντιοιστρογόνου 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης ή του συνδιασμού τους δεν επιφέρει αλλαγές, ποιοτικές ή ποσοτικές, στην έκφραση των mRNAs των δύο αυτών πρωτεϊνών.

3.3. Διερεύνηση της ενδοκυττάριας μορφολογίας της HSP-90

Τα αποτελέσματα που προηγήθηκαν, και που έδειξαν ότι τα οιστρογόνα δεν επιδρούν ούτε στον μηχανισμό πολυμερισμού της ακτίνης και της τουμπουλίνης ούτε στη γονιδιακή τους έκφραση, οδήγησαν τελικά στο βασικό ερώτημα, που αφορά τη συμμετοχή του ΚΣ στη ρύθμιση της μετατόπισης του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών από την κυτταροπλασματική περιοχή ενεργοποίησης στην

πυρηνική περιοχή δράσης τους. Προσεγγίσαμε το εν λόγω ερώτημα με βάση την διερεύνηση της συνοργάνωσης της HSP-90 με τον ΚΣ, δεδομένου ότι σε πρόσφατες δημοσιεύσεις έχει δειχθεί συνεντοπισμός της HSP-90 με τους ΜΣ σε κυτταρικά μοντέλα (Bresnick.1988, Sanchez.1988, Redmond.1989). Ερευνήσαμε αν στο δικό μας κυτταρικό μοντέλο η HSP-90 συνδέεται με δομές του κυτταροσκελετικού δικτύου, γεγονός που θα οδηγούσε στην έμμεση συσχέτιση του ΚΣ με την δράση στεροειδών ορμονών.

3.3.1. Μορφολογία κυτταροσκελετικών δομών

Τα πρώτα πειράματα ανοσοφθορισμού έγιναν με σκοπό να καθορίσουμε τη μορφολογία των επιμέρους δικτύων του ΚΣ στο κυτταρικό μας μοντέλο. Σε κύτταρα Ishikawa, μονιμοποιημένα παρουσία ακετόνης-μεθανόλης (9:1) για 20min και με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των α- ή β- τουμπουλίνης, βιμεντίνης, δεσμίνης και κυτοκερατινών (8.13) και του συμπλόκου ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη για την ακτίνη, παρατηρήσαμε την οργάνωση και μορφολογία των δικτύων των ΜΣ, των MI, των EI της βιμεντίνης και των EI των κυτοκερατινών. Στην εικόνα (25α) φαίνεται το πλέγμα των ΜΣ. Διακρίνεται καθαρά το κέντρο οργάνωσης των ΜΣ από όπου και ξεκινούν οι ΜΣ και απλώνονται ακτινωτά σε όλη την κυτταροπλασματική επιφάνεια. Στην εικόνα (25β) εμφανίζεται καθαρά και η άτρακτος που σχηματίζουν οι ΜΣ κατά τη φάση της μίτωσης. Στην εικόνα (25γ) παρουσιάζεται το δίκτυο των MI, τα οποία εμφανίζονται υπό τη μορφή ινιδίων του stress σχεδόν παράλληλων μεταξύ τους τα οποία επίσης εκτείνονται σε όλη την επιφάνεια του κυτταροπλάσματος. Στην εικόνα (25δ) φαίνεται το πλέγμα των EI της βιμεντίνης. Τα ινίδια αυτά εμφανίζονται να εκτείνονται συγκεντρωμένα κυρίως γύρω από τον πυρήνα και από εκεί να απλώνονται και προς την υπόλοιπη επιφάνεια του κυτταροπλάσματος. Τέλος, στην εικόνα (25ε) παρουσιάζεται το πλέγμα των EI των κυτοκερατινών. Η ποικιλία των κυτοκερατινών σχηματίζει ένα κυματοειδές πλέγμα ινιδίων σε όλη την κυτταροπλασματική περιοχή. Τα EI της δεσμίνης δεν εκφράζονται στα κύτταρα Ishikawa (εικόνα 25στ), κάτι που εξάλλου αναμενόταν λόγω της επιθηλιακής προέλευσης τους.

3.3.2. Μορφολογική παρατήρηση της δομής της HSP-90

Ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό να διερευνήσουμε την μορφολογική κατανομή της HSP-90 στο κυτταρικό μοντέλο των κυττάρων Ishikawa. Προς τούτο χρησιμοποιήσαμε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της HSP-90 (A1), καθώς και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της HSP-90 (AC88) (Redmond.1989). Η μέθοδος

μονιμοποίησης που αρχικά εφαρμόσαμε έχει περιγραφεί από τους Redmond et al (Redmond.1989) και περιλαμβάνει μονιμοποίηση παρουσία φορμαλδεΐδης (3.7%) για 12h και περαιτέρω εμβάπτιση σε ακετόνη -20°C για 5min. Στην εικόνα (26α) φαίνεται αχνά η ινιδιακή δομή της HSP-90 όπως εμφανίζεται με το AC88 αντίσωμα. Αντίθετα, όπως φαίνεται και στην εικόνα (26β), το αντίσωμα A1 δίνει έναν ασαφή φθορισμό. Εφαρμόζοντας όμως την μέθοδο μονιμοποίησης παρουσία ακετόνης-μεθανόλης για 20min, τα αποτελέσματα ήσαν αντίστροφα. Η εμφάνιση με το AC88 αντίσωμα έδωσε έναν πολύ ασθενή και ασαφή φθορισμό (εικόνα 26γ) εν αντιθέσει με το A1 αντίσωμα με το οποίο εμφανίστηκε ευδιάκριτη πλέον η ινιδιακή δομή της HSP-90 (εικόνα 26δ). Στην εικόνα (26ε) όμως φαίνεται και η δομή των ΜΣ όπως αυτή εμφανίζεται μετά από μονιμοποίηση παρουσία φορμαλδεΐδης. Είναι χαρακτηριστικός ο ασθενής φθορισμός και η ελλατωμένη ευκρίνεια. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μορφολογική παρατήρηση ινιδιακών δομών στα κύτταρα φαίνεται ότι επηρεάζεται από τις τεχνικές μονιμοποίησης των κυττάρων. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε συγκριτική διερεύνηση των δύο αυτών μεθόδων μονιμοποίησης για την αρτιότερη αξιολόγηση των μορφολογικών πειραμάτων.

3.3.3. Συγκριτική μελέτη των μεθόδων μονιμοποίησης

Όπως έχει δημοσιευθεί στο παρελθόν (Leong.1989), αλλά όπως έδειξαν και μορφολογικά μας πειράματα (3.3.2.), η τεχνική μονιμοποίησης των κυττάρων επηρεάζει σημαντικά τις μορφολογικές παρατηρήσεις ινιδιακών δομών. Με βάση τα παραπάνω θελήσαμε να συγκρίνουμε τις δύο μεθόδους μονιμοποίησης των κυττάρων Ishikawa, δηλαδή την μονιμοποίηση με ακετόνη-μεθανόλη και την μονιμοποίηση με φορμαλδεΐδη για 20 και για 60 min. Στις εικόνες (27α-δ, 28α-δ) φαίνεται καθαρά ότι κατά τη μονιμοποίηση φορμαλδεΐδης παρατηρείται μια μείωση του φθορισμού και μια ελλάτωση της ευκρίνειας της ανοσοβαφής με τα αντισώματα κατά της τουμπουλίνης και της βιμεντίνης, κάτι που δεν παρατηρείται κατά τη μονιμοποίηση ακετόνης-μεθανόλης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με δημοσιευμένα δεδομένα (Leong.1989) που δείχνουν ότι η μέθοδος μονιμοποίησης ιστών με φορμαλδεΐδη, ειδικότερα μάλιστα όταν εφαρμόζεται για μεγάλους χρόνους, παρεμποδίζει την ανοσοβαφή με αντισώματα των κυτταροσκελετικών δομών, και ειδικότερα αυτών των EI. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η μονιμοποίηση των κυττάρων Ishikawa με φορμαλδεΐδη για μεγάλους χρόνους δεν είναι η ενδεδειγμένη μέθοδος για ανοσοβαφή και μορφολογική παρατήρηση τόσο των δομών του ΚΣ όσο και της HSP-90. Για τους λόγους αυτούς επιλέξαμε την πιό ήπια μέθοδο μονιμοποίησης, παρουσία ακετόνης-μεθανόλης για 20min, για όλα τα πειράματα ανοσοφθορισμού που ακολούθησαν.

3.3.4. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ

Εφαρμόζοντας πλέον την μέθοδο μονιμοποίησης παρουσία ακετόνης-μεθανόλης, και με τη χρήση του A1 αντισώματος, μελετήσαμε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού την μορφολογία της δομής της HSP-90 εκ παραλλήλου με τη δομή των ΜΣ στα κύτταρα Ishikawa. Στην εικόνα (29α) φαίνεται ξεκάθαρα ο ινιδιακός χαρακτήρας της δομής της HSP-90 σε κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο της μεσόφασης. Στην εικόνα (29β), εξάλλου, η δομή της HSP-90 φαίνεται να σχεδιάζει τη μιτωτική άτρακτο σε κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο της μίτωσης. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι σε επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου η HSP-90 φαίνεται να συνδέεται με δομές ΜΣ. Ετσι επιβεβαιώνουμε τις δημοσιευμένες παρατηρήσεις αναφορικά με τη σύνδεση της HSP-90 με τους ΜΣ σε διάφορα κυτταρικά εκχυλίσματα (Bresnick.1988, Sanchez.1988, Redmond.1989).

3.4. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ μετά από επώαση παρουσία αναστολέων των ΜΣ

Ακολουθως θέσαμε το ερώτημα τού κατά πόσον οι ΜΣ αποτελούν το μοναδικό κυτταροσκελετικό δομικό πλέγμα επάνω στο οποίο συνεντοπίζεται η HSP-90. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε μορφολογικά πειράματα παρουσία ενώσεων που αποδιατάσσουν τους ΜΣ. Χρησιμοποιήσαμε δύο γνωστούς αναστολείς των ΜΣ, την κολχικίνη και το ιόν του τριαιθυλιούχου μολύβδου (Et_3Pb^+), και παρατηρήσαμε τα αποτελέσματα της δράσης τους στον μορφολογικό εντοπισμό της HSP-90. Προηγουμένως, με μια σειρά επώασεων ελέγξαμε τη δραστηριότητα που έχουν οι ουσίες αυτές στους ΜΣ στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

3.4.1. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ μετά από επώαση παρουσία Et_3Pb^+

Στις εικόνες (30α-γ) φαίνονται τα αποτελέσματα της επώασης των κυττάρων παρουσία Et_3Pb^+ συγκεντρώσεων 10^{-6}M , $3 \times 10^{-6}\text{M}$ και 10^{-5}M για 3h. Το δίκτυο των ΜΣ φαίνεται να δέχεται κάποια επίδραση από την παρουσία Et_3Pb^+ 10^{-6}M . Η οργάνωση των ινιδίων φαίνεται να έχει διαταραχθεί, αλλά το πλέγμα υπάρχει. Αντίθετα, από την συγκέντρωση των $3 \times 10^{-6}\text{M}$ ο Et_3Pb^+ έχει επιφέρει πλήρη καταστροφή των ΜΣ. Όταν όμως εμφανίσαμε κύτταρα, μετά από επώαση παρουσία Et_3Pb^+ σε συγκεντρώσεις 10^{-5}M για 3h, σε συγκεντρώσεις δηλαδή όχι μικρότερες από αυτές που επιφέρουν πλήρη καταστροφή στο δίκτυο των ΜΣ, με το

αντίσωμα A1 κατά της HSP-90, τα αποτελέσματα ήσαν άκρως ενδιαφέροντα. Όπως φαίνεται στην εικόνα (30δ), σε συνθήκες όπου η καταστροφή των ΜΣ είναι πλήρης, υπάρχουν σημαντικά υπολείματα της ινιδιακής δομής της HSP-90. Τα δεδομένα αυτά επαληθεύθηκαν μετά από πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού τα οποία ήσαν εφικτά επειδή τα δύο αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε προέρχονταν από διαφορετικά είδη, και ειδικότερα το αντίσωμα κατά της τουμπουλίνης από ποντικό και το αντίσωμα A1 κατά της HSP-90 από κουνέλι. Είχαμε λοιπόν τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε μέσα στο ίδιο κύτταρο τις δομές της HSP-90 και των ΜΣ. Στις εικόνες (30ε,στ) φαίνεται καθαρά ότι σε κύτταρα, όπου λόγω επώασης παρουσία Et_3Pb^+ 10^{-5}M για 3h οι ΜΣ έχουν εξαφανιστεί πλήρως, υπάρχει υπομένουσα ινιδιακή δομή της HSP-90. Η υπομένουσα αυτή ινιδιακή δομή που παρατηρείται μετά από επώαση παρουσία Et_3Pb^+ μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η HSP-90 εμφανίζεται συνεντοπισμένη και με κάποια άλλη ινιδιακή δομή ανθεκτική σε αναστολείς των ΜΣ.

3.4.2. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΜΣ μετά από επώαση παρουσία κολχικίνης

Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα παρουσία κολχικίνης. Στις εικόνες (31α-γ) φαίνονται τα αποτελέσματα της επώασης των κυττάρων παρουσία κολχικίνης 10^{-5}M για 1, 2 και 3h. Η δράση της κολχικίνης στην 1h δεν έχει ολοκληρωθεί. Υπάρχουν ακόμη κάποια άθικτα ινίδια μέσα στον γενικά ασαφή φθορισμό. Από τις 2h, αντίθετα, η καταστροφή των ΜΣ είναι πλήρης. Μετά όμως από επώαση παρουσία κολχικίνης σε συγκεντρώσεις 10^{-5}M για 3h, σε συνθήκες δηλαδή που επιφέρουν πλήρη καταστροφή στο δίκτυο των ΜΣ, παρατηρήσαμε σαφείς ινιδιακές δομές με το αντίσωμα A1 κατά της HSP-90. Όπως φαίνεται στην εικόνα (31δ), σε συνθήκες όπου η καταστροφή των ΜΣ είναι πλήρης, υπάρχουν σημαντικά υπολείματα της ινιδιακής δομής της HSP-90. Επαληθεύσαμε αυτά τα αποτελέσματα και μετά από πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού. Στις εικόνες (31ε,στ) φαίνεται καθαρά ότι σε κύτταρα, όπου οι ΜΣ έχουν εξαφανιστεί πλήρως, μετά από επώαση με κολχικίνη 10^{-5}M , η ινιδιακή δομή της HSP-90 σαφώς παραμένει. Η υπομένουσα αυτή ινιδιακή δομή που παρατηρείται συνέτεινε στην υπόθεση ότι η HSP-90 εμφανίζεται συνεντοπισμένη και με κάποια άλλη, ή και άλλες, ινιδιακή δομή εκτός των ΜΣ.

3.5. Μορφολογία δομών HSP-90 και MI μετά από επώαση παρουσία κυτοχλασίνης B

Στην προσπάθεια μας να ερευνήσουμε τον πιθανό συνεντοπισμό της HSP-90 και με τα υπόλοιπα κυτταροσκελετικά δίκτυα συνεξετάσαμε καταρχήν την HSP-90 με τα MI. Όπως φαίνεται στις εικόνες (32α,β), οι δομές των MI και της HSP-90 δεν παρουσιάζουν μορφολογικά καμμία ομοιότητα. Παρόλα αυτά, και δεδομένου ότι οι Koyasu και Nishida (Koyasu.1986, Nishida.1986) έχουν περιγράψει στο παρελθόν αλληλεπίδραση της HSP-90 με την F-ακτίνη *in vitro*, διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση των MI με την HSP-90. Για το σκοπό αυτό συγκρίναμε τα αποτελέσματα της δράσης της κυτοχλασίνης B, κλασικού αναστολέα των MI, τόσο στις δομές της HSP-90, όσο και στις αντίστοιχες δομές των MI. Στις εικόνες (33α-γ) φαίνονται τα αποτελέσματα της επώασης των κυττάρων Ishikawa παρουσία κυτοχλασίνης B συγκεντρώσεων $3 \times 10^{-6} \text{M}$, $6 \times 10^{-6} \text{M}$ και 10^{-5}M για 3h. Στη συγκέντρωση των $3 \times 10^{-6} \text{M}$ η κυτοχλασίνη B έχει ήδη αρχίσει να καταστρέφει τα MI. Είναι ορατή η συνύπαρξη άθικτων ινιδίων με κόκκους έντονου φθορισμού, προϊόντα κατεστραμμένων ινιδίων. Στη συγκέντρωση των $6 \times 10^{-6} \text{M}$ η κυτοχλασίνη B έχει οδηγήσει σε καταστροφή υψηλού ποσοστού των MI και σε ανακατάταξη των άθικτων MI περιμετρικά προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τέλος, η συγκέντρωση των 10^{-5}M της κυτοχλασίνης B είναι πλέον ικανή για την πλήρη καταστροφή των MI. Μόνον κόκκοι υψηλού φθορισμού, υπολείματα των κατεστραμμένων MI, είναι ορατοί σε όλη την κυτταροπλασματική επιφάνεια. Επώαση όμως των κυττάρων παρουσία κυτοχλασίνης B (10^{-5}M για 3h) δεν προκαλεί αντίστοιχη καταστροφή στα ινίδια της HSP-90, όπως φαίνεται και στην εικόνα (33δ).

Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύθηκαν και με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού. Όπως φαίνεται στις εικόνες (33ε,στ), μετά την επώαση παρουσία κυτοχλασίνης B είναι ξεκάθαρη τόσο η καταστροφή των MI όσο και η διατήρηση της δομής της HSP-90. Το δίκτυο λοιπόν στο οποίο πιθανόν να συνεντοπίζεται η HSP-90 δεν φαίνεται πλέον να είναι αυτό των MI της ακτίνης.

3.6. Μορφολογία δομών HSP-90 και E1 βιμεντίνης μετά από επώαση παρουσία Et_3Pb^+

Το επόμενο κυτταροσκελετικό δίκτυο που θελήσαμε να αντιπαραβάλουμε με την ινιδιακή δομή της HSP-90 ήταν αυτό των E1 της βιμεντίνης. Επειδή η μορφολογική διαφορά των δύο αυτών δομών δεν ήταν ξεκάθαρη σε αρχικά πειράματα ανοσοφθορισμού (εικόνες 34α,β), προσπαθήσαμε να συγκρίνουμε τα

αποτελέσματα που τυχόν επιφέρει στις δύο αυτές δομές η επώαση των κυττάρων Ishikawa παρουσία του αναστολέα των ΜΣ Et_3Pb^+ . Η ουσία αυτή επιλέχθηκε αφενός γιατί δεν υπάρχει ειδικός αναστολέας μόνον των δικτύων των ΕΙ, αφετέρου γιατί έχει ήδη δημοσιευθεί (Zimmermann.1986) ότι ο Et_3Pb^+ σε κυτταρικές καλλιέργειες επιφέρει μεταβολές στη μορφολογία του δικτύου αυτού. Στην προσπάθεια μας να βρούμε τις συνθήκες στις οποίες ο Et_3Pb^+ είναι δραστήσιος στα ΕΙ τις βιμεντίνης του δικού μας κυτταρικού συστήματος, εκτελέσαμε μια σειρά από επώσεις των κυττάρων Ishikawa παρουσία Et_3Pb^+ συγκεντρώσεων 10^{-5}M για 1, 2 και 3h. Όπως φαίνεται στις εικόνες (34γ-ε), η παρουσία Et_3Pb^+ μέχρι και 2h επιφέρει μια μικρή αλλαγή στη μορφολογία της δομής των ΕΙ της βιμεντίνης που εμφανίζεται με τη μορφή "ανάδευσης" του συνόλου των ινιδίων. Σε 3h όμως ο Et_3Pb^+ επιφέρει δραματικές αλλαγές στη μορφολογία που παρουσιάζει το δίκτυο των ΕΙ της βιμεντίνης. Τα ινίδια της βιμεντίνης παρουσιάζουν μίαν επανοργάνωση που χαρακτηρίζεται από έντονο περιπυρηνικό φθορισμό και αραιό ακτινωτό φθορισμό στην περιοχή του κυτταροπλάσματος. Η δομή αυτή των ΕΙ της βιμεντίνης όπως εμφανίζεται παρουσία Et_3Pb^+ 10^{-5}M σε 3h δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα με την υπολειπόμενη δομή της HSP-90 μετά από παρόμοια επώαση (εικόνα 34στ). Οι παρατηρήσεις αυτές μας επέτρεψαν να υποθέσουμε ότι και το δίκτυο των ΕΙ της βιμεντίνης, όπως και αυτό των ΜΙ της ακτίνης, δεν φαίνεται να συνδιοργανώνεται με την HSP-90.

3.7. Μορφολογία δομών HSP-90 και ΕΙ κυτοκερατινών μετά από επώαση παρουσία συνδιασμού κολχικίνης και κυτοχαλασίνης Β

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την πιθανότητα της μορφολογικής συνδιοργάνωσης της HSP-90 με τις δομές των ΕΙ των κυτοκερατινών. Παρατηρήσαμε μορφολογικές ομοιότητες στα δίκτυα των κυτοκερατινών και της HSP-90 (εικόνες 35α,β). Για να αποσαφηνίσουμε λοιπόν την ομοιότητα αυτή έπρεπε να βρεθεί κάποιος παράγοντας που επιφέρει αλλαγές στη δομή του δικτύου των ΕΙ των κυτοκερατινών και να τις συγκρίνουμε με αυτές που τυχόν επιφέρει στη δομή της HSP-90. Αυτό επιτεύχθηκε με τον συνδιασμό ενός αναστολέα των ΜΣ και ενός των ΜΙ. Έχει δημοσιευθεί ότι η συνδιασμένη επώαση κυττάρων παρουσία κολχικίνης και κυτοχαλασίνης Β, σε συγκεντρώσεις ίσες ή και μεγαλύτερες από αυτές που επιφέρουν πλήρη καταστροφή στους ΜΣ και στα ΜΙ, οδηγεί σε χαρακτηριστικές αλλαγές της οργάνωσης του δικτύου των ΕΙ των κυτοκερατινών (Knapp.1983). Πράγματι, μετά από επώαση παρουσία κολχικίνης $2 \times 10^{-5}\text{M}$ και κυτοχαλασίνης Β $2 \times 10^{-5}\text{M}$ για 3h, φαίνεται ότι η οργάνωση του δικτύου των ΕΙ των κυτοκερατινών μετατρέπεται από ομοιόμορφη κυματική, σε αστερωτή με κομβικά κέντρα

διασκορπισμένα στο κυταρόπλασμα (εικόνα **35γ**). Όταν δε εμφανίσαμε τη δομή της HSP-90 μετά από παρόμοια επώαση παρατηρήσαμε παρόμοια εικόνα (**35δ**). Ο συνδιασμός των δύο αυτών αναστολέων φαίνεται ότι επιφέρει τις ίδιες ακριβώς αλλαγές στην οργάνωση της δομής της HSP-90 και του δικτύου των ΕΙ των κυτοκερατινών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι είναι πολύ πιθανόν η HSP-90 να συνδέεται εκτός των ΜΣ και με το δίκτυο των ΕΙ των κυτοκερατινών.

3.8. Μορφολογία δομών HSP-90 και κυταροσκελετικών σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton X-100, μετά από επώαση απουσία και παρουσία κυταροσκελετικών αναστολέων

3.8.1. Μορφολογία δομών HSP-90 και κυταροσκελετικών σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton

Κάνοντας την υπόθεση ότι, εάν όντως η HSP-90 συνδέεται με κυταροσκελετικές δομές, θα είναι παρούσα στο κυταροσκελετικό υπόλειμμα που παραμένει μετά από εκχύλιση των κυτάρων παρουσία του μη ιοντικού απορρυπαντικού Triton X-100, προχωρήσαμε σε πειράματα εκχύλισης, όπως αυτή περιγράφεται (Schliva.1981). Στις εικόνες (**36α-δ**) φαίνονται οι κυταροσκελετικές δομές μετά την εκχύλιση σε Triton X-100. Οι δομές των ΜΙ της ακτίνης, των ΕΙ της βιμεντίνης και των ΕΙ των κυτοκερατινών εμφανίζονται χωρίς μορφολογικές αλλοιώσεις, ενώ οι ΜΣ εμφανίζονται ελαφρώς ασθενέστεροι. Εξίσου όμως διατηρημένη εμφανίζεται και η δομή της HSP-90 (εικόνα **36ε**).

3.8.2. Μορφολογία δομών HSP-90 και βιμεντίνης σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton, μετά από επώαση παρουσία Et_3Pb^+

Ακολουθώντας εφαρμόσαμε τη διαδικασία της εκχύλισης σε κύτταρα που είχαν προηγουμένως επωαστεί απουσία και παρουσία Et_3Pb^+ $10^{-5}M$ για 3h. Εμφανίσαμε μετά, με εφαρμογή διπλού ανοσοφθορισμού, το δίκτυο των ΕΙ της βιμεντίνης και της δομής της HSP-90 και φωτογραφίσαμε τις δύο αυτές δομές αλληλέγγυα επάνω στο ίδιο φιλμ. Οι μορφολογικές διαφορές των δύο αυτών δομών, είτε απουσία είτε παρουσία του αναστολέα, γίνονται αντιληπτές από την διαφορετική χρώση των δομών που οφείλεται στη χρήση δεύτερων αντισωμάτων με διαφορετικές χρωμοφόρες ενώσεις (FITC, πράσινο για την βιμεντίνη και Texas-Red, κόκκινο για την HSP-90). Στις εικόνες (**37α,β**) παρουσιάζονται τα ΕΙ της βιμεντίνης με πράσινο χρώμα μαζί με την διαφορετική ινιδιακή δομή της HSP-90 με

κόκκινο χρώμα. Επαληθεύθηκε έτσι η προηγούμενη παρατήρηση μας, ότι δηλαδή δεν υφίσταται συνοργάνωση HSP-90 με τα EI της βιμεντίνης.

3.8.3. Μορφολογία δομών HSP-90 και κυτοκερατινών σε κυτταρικά υπολείμματα εκχύλισης με Triton, μετά από επώαση παρουσία συνδιασμού κολχικίνης και κυτοχλασίνης B

Τέλος, εφαρμόσαμε τη διαδικασία της εκχύλισης και σε κύτταρα που είχαν προηγουμένως επωαστεί απουσία και παρουσία του συνδιασμού της κολχικίνης $2 \times 10^{-5} \text{M}$ και της κυτοχλασίνης B $2 \times 10^{-5} \text{M}$ για 3h. Εμφανίσαμε μετά, με εφαρμογή διπλού ανοσοφθορισμού, το δίκτυο των EI των κυτοκερατινών και τη δομή της HSP-90 και φωτογραφίσαμε τις δύο αυτές δομές αλληπάλλληλα επάνω στην ίδια φωτογραφική πλάκα. Αρχικά, απουσία των αναστολέων, επάνω στο φιλμ εμφανίστηκε μόνον μια δομή (εικόνα **37γ**). Η δομή αυτή, χαρακτηριστική των EI των κυτοκερατινών, εμφανίστηκε μάλιστα και σε χρώμα πορτοκαλί, συνδιασμό δηλαδή του πράσινου της φθορίζουσας ουσίας που αντιστοιχεί στη δομή των EI των κυτοκερατινών (FITC) και του κόκκινου της φθορίζουσας ουσίας που αντιστοιχεί στη δομή της HSP-90 (Texas-Red). Αλλά και παρουσία του συνδιασμού των αναστολέων εμφανίστηκε επίσης μόνον μια δομή (εικόνα **37δ**). Η μορφολογία των δομών αυτών έχει τα χαρακτηριστικά της αναδιάταξης που υφίστανται τα EI των κυτοκερατινών από την παρουσία των αναστολέων αυτών, καθώς επίσης και το πορτοκαλί χρώμα, χαρακτηριστικό του συνδιασμού του πράσινου (FITC) με το κόκκινο (Texas-Red). Τα δεδομένα ήσαν πλέον ικανά να μας επιτρέψουν βάσιμα τον ισχυρισμό της πιθανής συνοργάνωσης της HSP-90 και του δικτύου των EI των κυτοκερατινών.

3.9. Βιοχημικός έλεγχος αλληλεπίδρασης του A1 αντισώματος κατά της HSP-90 με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες

Ο έλεγχος εξειδίκευσης του A1 αντισώματος κατά της HSP-90 έγινε με μια σειρά πειραμάτων western-blot, προκειμένου να αποκλείσουμε πιθανές αλληλεπιδράσεις του A1 αντισώματος με τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Κυτταροσκελετικά παρασκευάσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου εκ παραλλήλου με παρασκευάσματα τουμπουλίνης και βιμεντίνης και μετά υβριδοποιήθηκαν με αντισώματα κατά των HSP-90 (A1), τουμπουλίνης, βιμεντίνης και κυτοκερατινών. Στην εικόνα (**38**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υβριδοποιήσεων αυτών, καθώς επίσης και η χρωματική εμφάνιση του πηκτώματος του πολυακρυλαμίδιου. Το αντίσωμα της τουμπουλίνης αναγνωρίζει δύο περιοχές πολύ κοντά μεταξύ τους

και στην περιοχή των 50kd. Προφανώς πρόκειται για την α - και β - τουμπουλίνη. Το αντίσωμα της βιμεντίνης, αντίστοιχα, αναγνωρίζει μια πρωτεΐνη στην περιοχή των 55kd, στο μέγεθος δηλαδή της βιμεντίνης. Το αντίσωμα των κυτοκερατινών αναγνωρίζει, όπως αναμενόταν, μια ομάδα πρωτεϊνών από την περιοχή των 67kd και κάτω. Το αντίσωμα της HSP-90, τέλος, αναγνωρίζει μόνον μια πρωτεΐνη λίγο κάτω από την περιοχή των 94kd. Η αλληλεπίδραση λοιπόν του A1 αντισώματος κατά της HSP-90 με τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες θα πρέπει να αποκλειστεί.

3.10. Πειράματα ανοσοπροσρόφησης προς επαλήθευση της συνοργάνωσης κυτοκερατινών - HSP-90

Για τη βιοχημική επαλήθευση της αλληλεπίδρασης των κυτοκερατινών με την HSP-90 στο κυτταρόπλασμα, εφαρμόσαμε στη συνέχεια τη μέθοδο της ανοσοκατακράτησης. Αρχικά επώασαμε κυτταρόπλασμα από Ishikawa κύτταρα παρουσία του αντισώματος 8.13 κατά των κυτοκερατινών και ακολούθως επώασαμε το μείγμα αυτό παρουσία του πηκτώματος protein A-sepharose. Ακολούθησαν δύο διαφορετικές συνθήκες έκπλυσης, οι ήπιες παρουσία 50mM NaCl και οι έντονες παρουσία 400mM NaCl, 0.2% Triton X-100. Τα δύο πηκτώματα μετά τις εκπλύσεις ηλεκτροφορήθηκαν και ακολούθησαν δύο πειράματα Western-blot με αντισώματα υβριδοποίησης τα αντισώματα 8.13 κατά των κυτοκερατινών και A1 κατά της HSP-90 αντίστοιχα. Σαν δείκτης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα protein A-sepharose μετά από επώαση παρουσία μόνον κυτταροπλάσματος, απουσία δηλαδή αντισώματος, και έντονες συνθήκες έκπλυσης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στην εικόνα (39): Η υβριδοποίηση παρουσία του 8.13 αντισώματος έδειξε ότι το σύμπλοκο sepharose - πρωτεΐνης A - αντισώματος είχε κατακρατήσει τις κυτοκερατίνες άσχετα με τις συνθήκες έκπλυσης. Αυτό ήταν αναμενόμενο, γιατί ακόμη και οι έντονες συνθήκες έκπλυσης δεν είναι ικανές να διασπάσουν τους ισχυρούς δεσμούς αντιγόνου-αντισώματος. Η υβριδοποίηση παρουσία του A1 αντισώματος όμως έδειξε έμμεση κατακράτηση από το σύμπλοκο αυτό μέρους της HSP-90 μόνον μετά από ήπιες συνθήκες έκπλυσης. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι υφίσταται στο κυτταρόπλασμα σύμπλοκο κυτοκερατινών - HSP-90, αποτέλεσμα το οποίο φαίνεται να επιβεβαιώνει τα μορφολογικά αποτελέσματα απλού και διπλού ανοσοφθορισμού. Το σύμπλοκο αυτό στηρίζεται σε δεσμούς τόσο ασθενείς που ανθίστανται μεν στις ήπιες, αλλά καταστρέφονται στις έντονες συνθήκες έκπλυσης που εφαρμόσαμε.

3.11. Συγκριτική μελέτη της ανθεκτικότητας των ΜΣ και των ΜΙ των κυττάρων Ishikawa και των HEC-50 παρουσία των αντίστοιχων αναστολέων

Δεδομένου ότι, όπως έχει περιγραφεί πρόσφατα (Theodoropoulos.1992), η μορφολογία και η σταθερότητα των κυτταροσκελετικών δομών φαίνεται να μεταβάλλεται σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων, θελήσαμε να διερευνήσουμε την ανθεκτικότητα των ΜΣ και των ΜΙ των κυττάρων Ishikawa σε σχέση με την ανθεκτικότητα των αντίστοιχων δικτύων των κυττάρων HEC-50. Οι δύο αυτές κυτταρικές σειρές χαρακτηρίζονται από διαφορετικό βαθμό διαφοροποίησης. Η προσέγγιση του ερωτήματος αυτού έγινε μέσα από μια σειρά πειραμάτων ανοσοφθορισμού των ΜΣ και των ΜΙ των δύο κυτταρικών σειρών Ishikawa και HEC-50 απουσία και παρουσία αντίστοιχων αναστολέων των δύο αυτών δικτύων.

3.11.1. Κυτταρική σειρά HEC-50

Η HEC-50 είναι μια επιθηλιακή κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από ελλιπώς διαφοροποιημένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου (Kuramoto.1976). Η κυτταρική αυτή σειρά διαθέτει οιστρογονικούς υποδοχείς (Gravanis,1986b), αλλά δεν απαντά στην παρουσία οιστρογόνων. Η παρουσία οιστραδιόλης δεν επιφέρει μεταβολές ούτε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού (Suzuki.1980) ούτε στην ενεργότητα της DNA-πολυμεράσης α (Gravanis.1986a) των κυττάρων αυτών, ενώ για την αλκαλική φωσφατάση η ενεργότητα απλώς φτάνει στη μέγιστη τιμή της νωρίτερα παρουσία της ορμόνης (Suzuki.1980), όπως φαίνεται και από τις εικόνες (40-42) αντίστοιχα.

3.11.2.1. Μορφολογία δομών ΜΣ μετά από επώαση κυττάρων Ishikawa και HEC-50 απουσία και παρουσία Et_3Pb^+

Στις εικόνες (43α,β) φαίνεται το πλέγμα των ΜΣ στις δύο κυτταρικές σειρές. Είναι κοινή η χαρακτηριστική ακτινική οργάνωση των ΜΣ σε ολόκληρη την κυτταροπλασματική επιφάνεια. Στις εικόνες (43γ-στ) φαίνονται τα αποτελέσματα της επώασης των κυτταρικών αυτών σειρών παρουσία του αναστολέα των ΜΣ Et_3Pb^+ σε συγκεντρώσεις $10^{-6}M$ και $3 \times 10^{-6}M$ για 3h. Και στις δύο σειρές τα δίκτυα των ΜΣ φαίνεται να έχουν την ίδια ευαισθησία στον αναστολέα. Παρουσία Et_3Pb^+ $10^{-6}M$ είναι αισθητή η εκτροπή της ισορροπίας της οργάνωσης και των δύο δικτύων, ενώ παρουσία Et_3Pb^+ $3 \times 10^{-6}M$ η καταστροφή και των δύο δικτύων είναι πλήρης. Το δίκτυο λοιπόν των ΜΣ των δύο αυτών κυτταρικών σειρών δεν φαίνεται

να παρουσιάζει διαφορές ούτε όσον αφορά στην μορφολογία ούτε όσον αφορά στην ανθεκτικότητα στην παρουσία του Et_3Pb^+ .

3.11.2.2. Μορφολογία δομών MI μετά από επώαση κυτάρων *Ishikawa* και *HEC-50* απουσία και παρουσία κυτοχλασίνης B

Στις εικόνες (**44α,β**) παρουσιάζεται αντίστοιχα το πλέγμα των MI στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές. Η οργάνωση και αυτών των δύο δικτύων με τη μορφή των σχεδόν παράλληλων ινών σε όλη την επιφάνεια του κυτταροπλάσματος είναι επίσης κοινή. Τα αποτελέσματα όμως της επώασης των σειρών αυτών παρουσία του αναστολέα των MI κυτοχλασίνη B σε συγκέντρωση 10^{-6}M , $3 \times 10^{-6}\text{M}$ και $6 \times 10^{-6}\text{M}$ για 3h ήσαν σαφώς διαφορετικά. Στα κύτταρα *Ishikawa* η παρουσία κυτοχλασίνης B σε συγκέντρωση ακόμη και $6 \times 10^{-6}\text{M}$ δεν έχει οδηγήσει σε πλήρη καταστροφή το δίκτυο των MI (εικόνες **45α-γ**), ενώ αντίθετα στα κύτταρα *HEC-50* η καταστροφή του δικτύου των MI είναι πλήρης, ήδη σε συγκέντρωση κυτοχλασίνης B μόλις $3 \times 10^{-6}\text{M}$ (εικόνες **45δ-στ**). Η διαφορετική ανθεκτικότητα των MI των δύο αυτών κυτταρικών σειρών στην παρουσία της κυτοχλασίνης B και η πιθανή συσχέτιση της με το βαθμό διαφοροποίησης, ο οποίος αποτελεί χαρακτηριστική διαφορά μεταξύ των σειρών αυτών, εξακολουθεί να αποτελεί ερώτημα της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση του ΚΣ με τα οιστρογόνα και τη δράση τους. Η συσχέτιση αυτή αφορούσε στο εάν ο ΚΣ είναι ένας αποδέκτης της δράσης των οιστρογόνων ή εάν συμμετέχει στη διαδικασία της δράσης αυτής.

Στο πρώτο σκέλος της εργασίας εξετάστηκε εάν τα πλέον ευμετάβλητα δίκτυα του ΚΣ, οι ΜΣ δηλαδή της τουμπουλίνης και τα ΜΙ της ακτίνης, επιδέχονται αλλαγές κατά την οιστρογονική παρουσία. Τα δίκτυα αυτά βρίσκονται μόνιμα σε δυναμική ισορροπία πολυμερισμού-αποπολυμερισμού έχοντας την ικανότητα να αλλάζουν γενικά την οργάνωση και λειτουργικότητα τους μέσα στο κύτταρο ανάλογα με τις περιστάσεις. Η πιθανή παρέμβαση λοιπόν στην διαδικασία αυτή, των οιστρογόνων εξετάστηκε αρχικά. Για το λόγο αυτό απομονώθηκε τουμπουλίνη από εγκεφάλους χοίρων και μετά παρατηρήθηκε νεφελομετρικά ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης απουσία και παρουσία οιστραδιόλης συγκέντρωσης 10^{-8}M , 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης συγκέντρωσης 10^{-6}M και του συνδιασμού αυτών. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν μέσα στις περιοχές των φυσιολογικών τιμών της οιστραδιόλης και της αντιοιστρογονικής δράσης της 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία των παραγόντων αυτών δεν επιφέρει αλλαγές στη διαδικασία πολυμερισμού της τουμπουλίνης. Ομοίως, η ιξωδομετρική παρατήρηση του πολυμερισμού της ακτίνης, η οποία είχε απομονωθεί από μύες ποντικών, απουσία και παρουσία των ίδιων παραγόντων οδήγησε στα ίδια αρνητικά συμπεράσματα.

Μετά το στάδιο της *in vitro* οργάνωσης της ακτίνης και της τουμπουλίνης, όπου η οιστρογονική παρουσία δεν φάνηκε να επιφέρει αλλαγές, εξετάστηκε το στάδιο της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, σε σχέση πάντα με την παρουσία των οιστρογόνων, στο κυτταρικό μας μοντέλο. Το μοντέλο αυτό ήταν η κυτταρική σειρά Ishikawa (Nishida.1985), σειρά επιθηλιακή από καλώς διαφοροποιημένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, η οποία διαθέτει υποδοχείς οιστρογόνων και απαντά σε οιστρογονική διέγερση. Επώασθησαν λοιπόν τα κύτταρα αυτά απουσία και παρουσία οιστραδιόλης συγκέντρωσης 10^{-8}M , 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης συγκέντρωσης 10^{-6}M και του συνδιασμού αυτών για 8h, και μετά απομονώθηκε από τις καλλιέργειες αυτές το συνολικό RNA. Μετά από ηλεκτροφόρηση των RNAs αυτών, και χρησιμοποιώντας την μέθοδο Northern blot, υβριδοποιήθηκαν τα mRNAs της τουμπουλίνης και της ακτίνης με τους κατάλληλους ιχνηθέτες (cDNAs των α-τουμπουλίνης, β-τουμπουλίνης και ακτίνης). Οι αυτοραδιογραφίες των υβριδοποιήσεων αυτών έδειξαν ότι, στις συγκεκριμένες

συνθήκες επώασης, καμμία αλλαγή, ποσοτική ή ποιοτική, δεν υφίσταται στην έκφραση των mRNAs της τουμπουλίνης και της ακτίνης.

Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας δείξαμε ότι υπάρχει ένας συνεντοπισμός της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (αλλά και υπομονάδας του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών) HSP-90 με κυτταροσκελετικές δομές, συνεντοπισμός ο οποίος πιθανόν να συσχετίζει τον ΚΣ με την οιστρογονική δράση έμμεσα, και συγκεκριμένα με το στάδιο μετακίνησης και ενεργοποίησης του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών.

Αρχικά επιβεβαιώθηκαν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού στο δικό μας κυτταρικό μοντέλο αποτελέσματα σειράς δημοσιεύσεων (Bresnick.1988, Sanchez.1988, Redmond.1989) όπου είχε υποστηριχθεί ότι υπάρχει συνεντοπισμός της HSP-90 με τους ΜΣ. Διαθέτοντας δύο αντισώματα έναντι της HSP-90, το AC88 και το A1, εφαρμόστηκε αρχικά η μέθοδος μονιμοποίησης που αναφερόταν στις δημοσιεύσεις αυτές (επώαση παρουσία φορμαλδεΰδης 12h) και παρατηρήθηκε η δομή της HSP-90. Το αντίσωμα AC88 εμφάνιζε μια δομή πολύ αχνή, η οποία όντως προσομοίαζε με αυτήν των ΜΣ, αλλά το A1 αντίσωμα έδινε έναν ασαφή φθορισμό. Όταν όμως εφαρμόστηκε η μέθοδος της μονιμοποίησης παρουσία φορμαλδεΰδης και για την εμφάνιση των δικτύων του ΚΣ, παρατηρήθηκε μια μείωση του φθορισμού και μια ελάττωση της ευκρίνειας σε σχέση με αντίστοιχα αποτελέσματα μετά από εφαρμογή της ήπιας μεθόδου μονιμοποίησης που εμείς ήδη χρησιμοποιούσαμε (επώαση παρουσία ακετόνης-μεθανόλης 9:1 για 20min), η οποία μάλιστα αυξανόταν με την αύξηση του χρόνου της μονιμοποίησης. Τα αποτελέσματα αυτά βρισκότουσαν σε συμφωνία και με δημοσιευμένες παρατηρήσεις (Leong.1989) ότι η μέθοδος μονιμοποίησης παρουσία φορμαλδεΰδης παρεμποδίζει την ανοσοβαφή των κυτταροσκελετικών δομών και γενικά δεν ενδείκνυται για την ανοσοβαφή του ΚΣ. Μετά από εφαρμογή, εξάλλου, της αρχικής μεθόδου μονιμοποίησης (επώαση παρουσία ακετόνης-μεθανόλης 9:1 για 20min) και ανοσοβαφή και με τα δύο αντισώματα κατά της HSP-90, το A1 αντίσωμα εμφάνισε μια πολύ πιο καθαρή και σαφή δομή της HSP-90 η οποία επίσης προσομοίαζε με αυτήν των ΜΣ, ενώ το AC88 αυτή τη φορά έδινε έναν ασαφή φθορισμό. Είναι δε αξιοσημείωτο ότι παρόμοιες διαφορές του AC88 με άλλα αντισώματα κατά της HSP-90 έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά: Πειράματα ανοσοκατακράτησης όπου χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα 8D3 και 3G3 κατά της HSP-90, τα οποία αναγνωρίζουν την HSP-90 είτε ελεύθερη είτε συμπλεγμένη με άλλες πρωτεΐνες, δεν επαλήθευσαν τον συνεντοπισμό της HSP-90 με την τουμπουλίνη ο οποίος είχε παρουσιαστεί σε αντίστοιχα πειράματα με το AC88 μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της HSP-90 το οποίο αναγνωρίζει μόνον την ελεύθερη HSP-90 (Perdew.1991). Όλα αυτά τα στοιχεία μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η εκλογή της μεθόδου μονιμοποίησης

(επώαση παρουσία ακετόνης-μεθανόλης 9:1 για 20min) είναι καθοριστικής σημασίας για την ορθή αξιολόγηση των πειραμάτων της εργασίας αυτής.

Μετά από την επιλογή της μεθόδου μονιμοποίησης (επώαση παρουσία ακετόνης-μεθανόλης 9:1 για 20min) και του αντισώματος κατά της HSP-90 (A1), επώασθηκαν τα Ishikawa κύτταρα παρουσία 10^{-5} M κολχικίνης ή Et_3Pb^+ , γνωστών αναστολέων των ΜΣ και παρατηρήθηκαν τα αποτελέσματα των επωάσεων αυτών στους ΜΣ. Η καταστροφή του δικτύου των ΜΣ μετά από 3h επώασης ήταν πλήρης και στις δύο περιπτώσεις. Όταν όμως θελήσαμε να παρατηρήσουμε τη δομή της HSP-90 μετά από τις ίδιες επωάσεις βρεθήκαμε προ εκπλήξεως! Παρόλο που οι συνθήκες ήταν καταστρεπτικές για το δίκτυο των ΜΣ, υπήρχαν και στις δύο περιπτώσεις σημαντικά υπολείματα της ινιδιακής δομής της HSP-90. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι η HSP-90, εκτός από τους ΜΣ, εμφανίζεται συνεντοπισμένη και σε άλλη ή άλλες δομές που είναι ανθεκτικές στους αναστολείς αυτούς των ΜΣ. Αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι σε δημοσιευμένα παρόμοια πειράματα (Redmond.1989), μετά από επώαση κυττάρων παρουσία του αναστολέα των ΜΣ κολσεμίδιου, συγγενούς της κολχικίνης, και ακόλουθη μονιμοποίηση με τη μέθοδο της φορμαλδεΰδης, η ανοσοβαφή της HSP-90 παρουσίαζε εικόνα εξαφάνισης των ινιδίων, εικόνα παρόμοια με αυτήν της ανοσοβαφής των ΜΣ. Πιστεύουμε ότι η μη απεικόνιση υπομένουσας ινιδιακής δομής της HSP-90 σχετίζεται με τη μέθοδο μονιμοποίησης των κυττάρων, όπως συζητήθηκε παραπάνω. Έχει εξάλλου ήδη δείχθει ότι η μέθοδος αυτή, σε αντίθεση με την πολύ πιο ήπια μέθοδο μονιμοποίησης παρουσία ακετόνης-μεθανόλης για 20min, οδηγεί σε ασθενή και λιγότερο ευκρινή φθορισμό ακόμη και σε ανοσοβαφές χωρίς προηγούμενη απώαση παρουσία αναστολέων.

Η αμέσως επόμενη ινιδιακή δομή η οποία εξετάστηκε για πιθανό συνεντοπισμό με την HSP-90 ήταν αυτή των ΜΙ της ακτίνης. Η αρχική παρατήρηση ήταν ότι οι δύο αυτές δομές δεν παρουσίαζαν μορφολογικές ομοιότητες. Συνεχίζοντας την προσπάθεια συσχέτισης των δύο αυτών δομών, επώασθηκαν τα κύτταρα παρουσία 10^{-5} M κυτοχλασίνης Β, κλασικού αναστολέα των ΜΙ, για 3h, σε συνθήκες δηλαδή όπου η καταστροφή των ΜΙ είναι περισσότερο από πλήρης. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι τα ινίδια της HSP-90 παρέμεναν σχεδόν άθικτα, γεγονός που επέτρεψε την απόρριψη τυχόν συσχέτισης των δύο αυτών δομών. Η απόρριψη αυτή της συσχέτισης των ΜΙ με την HSP-90 συμφωνεί και με δημοσιεύματα (Sanchez.1988) που υποστηρίζουν ότι η HSP-90 μπορεί να δεσμεύεται *in vitro* με καθαρή ακτίνη αλλά μόνον όταν και οι δύο πρωτεΐνες είναι σε μεγάλη συγκέντρωση, ενώ τέτοια συσχέτιση δεν παρατηρείται ούτε σε κυτταροπλασματικά παρασκευάσματα ούτε σε άθικτα κύτταρα.

Αφού αποκλείσθηκε η συνοργάνωση των MI με την HSP-90, το επόμενο δίκτυο που μας απασχόλησε ήταν αυτό των EI, όσον αφορά πάντα στον συνεντοπισμό αυτών με την HSP-90. Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, τα κύτταρα Ishikawa διαθέτουν EI της βιμεντίνης και EI των κυτοκερατινών. Αρχικά λοιπόν εξετάσθηκε η συσχέτιση των EI της βιμεντίνης με την HSP-90. Μορφολογικά οι δύο αυτές δομές δεν παρουσίαζαν κάποια ξεκάθαρη διαφορά ή ομοιότητα. Επειδή δεν υπάρχει ειδικός αναστολέας των EI της βιμεντίνης, χρησιμοποιήθηκε εν συνεχεία ο αναστολέας των ΜΣ Et_3Pb^+ ο οποίος είναι γνωστό ότι επιφέρει χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία του δικτύου των EI της βιμεντίνης (Zimmermann.1986). Μετά από επώαση λοιπόν παρουσία 10^{-5}M Et_3Pb^+ για 3h, η αλλαγμένη πλέον δομή των EI της βιμεντίνης δεν παρουσίαζε ομοιότητα με την υπολειπόμενη δομή της HSP-90, ένδειξη ότι μάλλον δεν υφίσταται συνοργάνωση μεταξύ EI της βιμεντίνης και HSP-90.

Αμέσως μετά θελήσαμε να αντιπαραβάλλουμε τις δομές των EI των κυτοκερατινών και της HSP-90. Από αρχικές παρατηρήσεις οι δύο αυτές δομές παρουσίαζαν κάποια ομοιότητα, αλλά αυτή δεν ήταν αρκετή για συμπεράσματα. Έτσι θεωρήθηκε αναγκαία πάλι η χρήση κάποιου αναστολέα των EI των κυτοκερατινών. Επειδή, όπως και στην περίπτωση των EI της βιμεντίνης, δεν υπάρχει ειδικός αναστολέας των EI των κυτοκερατινών, χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός κολχικίνης και κυτοχαλασίνης Β, γνωστών αναστολέων των ΜΣ και των MI, συνδυασμός ο οποίος έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι αλλάζει δραματικά την οργάνωση του δικτύου των EI των κυτοκερατινών (Knapp.1983). Μετά από επώαση λοιπόν των κυττάρων παρουσία $2 \times 10^{-5}\text{M}$ κολχικίνης και $2 \times 10^{-5}\text{M}$ κυτοχαλασίνης Β για 3h, παρατηρήθηκε ότι οι αλλαγμένες δομές των EI των κυτοκερατινών και της HSP-90 ήσαν πανομοιότυπες! Η παρατήρηση αυτή αποκτά μεγαλύτερη ισχύ εάν ληφθεί υπόψη ότι οι συνθήκες απώασης ήσαν πολύ εντονότερες από αυτές στις οποίες η καταστροφή των ΜΣ και των MI είναι ολοκληρωτική.

Προς επαλήθευση του σημαντικού αυτού ευρήματος εφαρμόσθηκε καταρχήν εκχύλιση σε Ishikawa κύτταρα παρουσία Triton X-100, εκχύλιση όπου μόνον οι κυτταροσκελετικές δομές θεωρούντο ανθεκτικές (Schliva.1981). Όπως αναμενόταν, στις συνθήκες αυτές εξίσου ανθεκτική παρουσιάστηκε και η δομή της HSP-90. Ακολούθως εφαρμόσθηκε η εκχύλιση αυτή και σε κύτταρα μετά από επώαση απουσία και παρουσία $2 \times 10^{-5}\text{M}$ κολχικίνης και $2 \times 10^{-5}\text{M}$ κυτοχαλασίνης Β, και στα προϊόντα της εκχύλισης επιτεύχθηκε διπλή ανοσοβαφή του δικτύου των EI των κυτοκερατινών και της HSP-90 και εμφάνιση αλληπάλληλη επάνω στο ίδιο φιλμ, όπως περιγράφεται. Πρόκειται για μια τροποποίηση, που εμείς εφαρμόσαμε, της μεθόδου του ανοσοφθορισμού, η οποία ενδείκνυται για μελέτες αλληλοσύνδεσης δομικών πρωτεϊνών. Πράγματι, η δυνατότητα εμφάνισης αλληπάλληλα επάνω στην

ίδια φωτογραφική πλάκα δύο διαφορετικών δομών με διαφορετικό χρώμα, χρώμα που οφείλεται στις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες που προσημαίνουν τα δεύτερα αντισώματα της μεθόδου, επιτρέπει την εκ παραλλήλου παρατήρηση των δομών στο ίδιο κύτταρο, και τελικά την άντληση περαιτέρω μορφολογικών πληροφοριών για τη συσχέτιση ή και τη συνοργάνωση των δομών αυτών. Συνεχίζοντας, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν μια εντυπωσιακή ταύτιση των δύο δομών, γεγονός που επέτρεψε πλέον βάσιμα την υπόθεση ενός συνεντοπισμού της HSP-90, εκτός από τους ΜΣ, και με τα ΕΙ των κυτοκερατινών. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε περαιτέρω και με σειρά πειραμάτων ανοσοκατακράτησης, όπου και βιοχημικά πλέον υπάρχει ένδειξη ότι υφίσταται το σύμπλοκο κυτοκερατινών - HSP-90.

Τα δίκτυα που συνθέτουν τον ΚΣ, όπως είναι ήδη γνωστό, αφενός μεν συνδέονται και μεταξύ τους οδηγώντας σε μια λειτουργική συνοργάνωση (Griffith.1978, Geiger.1980, Schliva.1981), αφετέρου δε συμμετέχουν στη διαδικασία μετατόπισης διάφορων κυτταρικών στοιχείων (Heggeness.1978, Matteoni.1987, Stebbings.1987). Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP-90, εξάλλου, έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στην μετακίνηση και ενσωμάτωση της πρωτεΐνης $pp60^{src}$, αμέσως μετά τη σύνθεση της, στην πλασματική μεμβράνη (Brugge.1981, Oppermann.1981). Σαν λειτουργική άλλωστε υπομονάδα του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών, κατά τη μετακίνηση του υποδοχέα από την κυτταροπλασματική περιοχή σύνθεσης στην πυρηνική περιοχή ενεργοποίησης του, δρα προστατευτικά στον υποδοχέα καλύπτοντας του την περιοχή που αναγνωρίζει το DNA και διατηρώντας τον ανενεργό (Baulieu.1987, Groyer.1987). Όπως έχει ήδη υποστηριχθεί (Redmond.1989) η HSP-90 θα μπορούσε να συμμετέχει επίσης και στη διαδικασία μετακίνησης του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών. Μία συνεργασία της λοιπόν με τον ΚΣ, ο οποίος αξίζει εδώ να θυμίσουμε ότι διαθέτει συνδέσμους μέχρι και μέσα στον πυρήνα (Fey.1984, Georgatos.1987a, Georgatos.1987b), μας επιτρέπει να υποθέσουμε έναν κοινό ρόλο ΚΣ - HSP-90 και τελικά ένα μοντέλο για τη διαδικασία μετακίνησης του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών. Ο συνδιασμός ΚΣ - HSP-90 έχει τη δυνατότητα να υποστηρίξει την μετακίνηση του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών επάνω σε συγκεκριμένη διαδρομή ταυτόχρονα με την προστασία του: Χρησιμοποιώντας ο υποδοχέας το συνεχές δίκτυο του ΚΣ και εναλλάσσοντας την HSP-90 - υπομονάδα του με τα σταθερά μόρια HSP-90 που συναντά κατά μήκος του ΚΣ, οδηγείται χρησιμοποιώντας σαν "ράγες" το συνδιασμένο αυτό δίκτυο, ανενεργός και προφυλαγμένος, από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα. Αναφερόμαστε λοιπόν σε μια περίπτωση υποδοχέα, ο οποίος είναι ο άμεσος και τελικός εκφραστής της στεροειδικής δράσης, και ο οποίος υποθέτουμε ότι μετακινείται, μέσω του ΚΣ, με

συγκεκριμένα βήματα μέσα στο κύτταρο και, γιατί όχι, ότι ίσως παραμένει συνδεδεμένος επάνω στον ΚΣ σε συγκεκριμένες περιοχές μέσα στον πυρήνα μέχρι η ορμόνη να τον απελευθερώσει από την HSP-90, υπομονάδα μέσω της οποίας είναι δεσμευμένος στον ΚΣ, και τελικά να τον ενεργοποιήσει. Εάν σκεφθεί κανείς ότι στα πλαίσια της δράσης μιας εξωκυττάριας ουσίας, όπως είναι οι στεροειδείς ορμόνες, η ουσία αυτή απλώς ενεργοποιεί τον ενδοκυττάριο υποδοχέα της, ο οποίος δρα τελικά εκ μέρους της, ο μηχανισμός που επιτρέπει στον υποδοχέα να βρίσκεται εκεί που θα δράσει, ειδικά εάν αυτός ο μηχανισμός παρουσιάζει συγκεκριμένα και χαρακτηριστικά βήματα, αποκτά μεγάλη βιολογική σημασία. Η επαλήθευση ενός τέτοιου μοντέλου μηχανισμού θα έθετε άλλες βάσεις στην προσπάθεια πλήρους διερεύνησης της διαδικασίας μεταφοράς και ενεργοποίησης του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών και της δράσης των στεροειδών ορμονών γενικότερα.

Παράλληλα με τα ανωτέρω ερωτήματα που ήδη αναφέρθηκαν, διερευνήθηκαν και πιθανές διαφορές της κυτταρικής σειράς Ishikawa, που αποτέλεσε το βασικό μας μοντέλο, και της κυτταρικής σειράς HEC-50, όσον αφορά στη μορφολογία των δικτύων των ΜΣ και των ΜΙ απουσία και παρουσία των αντίστοιχων αναστολέων των δικτύων αυτών. Η επιθηλιακή σειρά HEC-50 (Kuramoto.1976) η οποία προέρχεται από ελλειπώς διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, διαθέτει όπως και η Ishikawa υποδοχείς οιστρογόνων αλλά δεν απαντά στην οιστρογονική παρουσία, διαφέρει δε σαφώς από τη σειρά Ishikawa στο βαθμό διαφοροποίησης της. Η μορφολογία των ΜΣ και των ΜΙ ήταν πανομοιότυπη και στις δύο κυτταρικές σειρές. Εξίσου πανομοιότυπη ήταν και η ανθεκτικότητα των ΜΣ στις δύο αυτές σειρές απέναντι στον αναστολέα των ΜΣ Et_3Pb^+ , ο οποίος έκανε αισθητή την παρουσία του και στις δύο περιπτώσεις στη συγκέντρωση των 10^{-6}M , ενώ στη συγκέντρωση των $3 \times 10^{-6}\text{M}$ οδηγούσε σε πλήρη καταστροφή τα δίκτυα των ΜΣ και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ομως παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην ανθεκτικότητα των ΜΙ παρουσία του αναστολέα κυτοχλασίνη Β. Το δίκτυο των ΜΙ των κυττάρων Ishikawa αποδείχθηκε πολύ ανθεκτικότερο από το αντίστοιχο των κυττάρων HEC-50. Ενώ το δίκτυο των ΜΙ των HEC-50 κυττάρων έδειχνε πλήρη καταστροφή από τη παρουσία της κυτοχλασίνης Β σε συγκέντρωση ακόμη και $3 \times 10^{-6}\text{M}$, το αντίστοιχο των Ishikawa έδειχνε να καταστρέφεται σε συγκέντρωση κυτοχλασίνης Β τουλάχιστον $6 \times 10^{-6}\text{M}$. Η παρατήρηση της διαφορετικής αυτής ανθεκτικότητας των ΜΙ απέναντι στην κυτοχλασίνη Β είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί μπορεί να συσχετίζει την διαφορετική σταθερότητα των ΜΙ με μεταβολές στη ρύθμιση της δυναμικής ισορροπίας πολυμερισμού της ακτίνης ή/και μειωμένων επιπέδων πολυμερούς ακτίνης στα ελλειπώς διαφοροποιημένα κύτταρα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι γνωστό ότι το πολύπλοκο σύμπλεγμα δικτύων που αποτελεί τον ΚΣ, εκτός από τη στηρικτική και μηχανική του προσφορά στο κύτταρο, αποτελεί τον αποδέκτη της δράσης εξωγενών παραγόντων ή συμμετέχει και σε ρυθμιστικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η εσωτερική μετακίνηση πρωτεϊνών. Αυτό που μας απασχόλησε στην ερευνητική αυτή εργασία ήταν εάν ο ΚΣ εμπλέκεται στην διαδικασία της δράσης στεροειδών ορμονών είτε άμεσα, αποτελώντας τον αποδέκτη της δράσης αυτής, είτε έμμεσα.

A. Αρχικά εξετάσαμε εάν τα οιστρογόνα επιφέρουν αλλαγές στην *in vitro* οργάνωση των ΜΣ της τουμπουλίνης και των ΜΙ της ακτίνης. Παρατηρήσαμε την κινητική του πολυμερισμού της τουμπουλίνης και της ακτίνης απουσία και παρουσία της οιστρογόνου ουσίας οιστραδιόλης, της αντιοιστρογόνου ουσίας 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης και του συνδιασμού αυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι καμμία αλλαγή στο ρυθμό ή την έκταση του πολυμερισμού της τουμπουλίνης ή της ακτίνης δεν επήλθε παρουσία των παραγόντων αυτών.

B. Ακολούθως θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η παρουσία οιστρογόνων μεταβάλλει την έκφραση της τουμπουλίνης και της ακτίνης στο κυτταρικό μας μοντέλο, που ήταν μια καλώς διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά επιθηλιακής προέλευσης από ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα επιθήλιου (Ishikawa κύτταρα), η οποία διαθέτει υποδοχείς οιστρογόνων και απαντά στην οιστρογονική διέγερση. Πειράματα επώασης των κυττάρων απουσία και παρουσία οιστραδιόλης, 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνης και του συνδιασμού αυτών, απομόνωσης των RNAs από τις καλλιέργειες αυτές και υβριδοποίησης τους με probes της τουμπουλίνης και τις ακτίνης έδειξαν ότι δεν υπάρχουν μεταβολές ποιοτικές ή ποσοτικές στην έκφραση των mRNAs των δύο αυτών πρωτεϊνών.

Γ. Είναι γνωστό ότι η HSP-90, πρωτεΐνη θερμικού σοκ, συμμετέχει σε διαδικασίες μετακίνησης πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο και εκτός αυτού αποτελεί και λειτουργική υπομονάδα του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών. Θέλοντας λοιπόν να ερευνήσουμε τον εντοπισμό της HSP-90 στο κύτταρο και την αλληλεπίδραση της με τον ΚΣ γενικότερα, εφαρμόσαμε μια σειρά πειραμάτων ανοσοφθορισμού, απουσία και παρουσία γνωστών κυτταροσκελετικών αναστολέων, στο κυτταρικό μας μοντέλο. Επιβεβαιώσαμε τον συνεντοπισμό της HSP-90 με τους ΜΣ, τόσο κατά τη μεσόφαση όσο και κατά τη μίτωση. Επώαση των κυττάρων παρουσία των αναστολέων των ΜΣ κολχικίνη ή Et_3Pb^+ έδειξε την ύπαρξη μιας υπομένουσας ινιδιακής δομής της HSP-90 αντίθετα με την πλήρη καταστροφή των ΜΣ. Εκτός αυτών, η δομή της HSP-90 ήταν παρούσα και στα αδιάλυτα σε Triton X-100 κυτταροσκελετικά παρασκευάσματα. Παρασκευάσματα

εκχύλισης κυττάρων μετά από επώαση απουσία και παρουσία του συνδιασμού των αναστολέων κολχικίνη και κυτοχλασίνη Β κατέδειξαν μορφολογικά πανομοιότυπες ινιδιακές δομές των ΕΙ των κυτοκερατινών και της HSP-90. Πειράματα ανοσοκατακράτησης, εξάλλου, έδειξαν και βιοχημικά την ύπαρξη του συμπλόκου κυτοκερατινών - HSP-90. Όλα αυτά τα στοιχεία μας επέτρεψαν τελικά να υποθέσουμε έναν συνεντοπισμό της HSP-90, όχι μόνο με τους ΜΣ, αλλά και με τα ΕΙ των κυτοκερατινών.

Δ. Τα δίκτυα του κυτταροσκελετού αλληλοσυνδέονται, ως γνωστόν, δημιουργώντας ένα λειτουργικό πλέγμα το οποίο απλώνεται σε όλη την κυτταροπλασματική επιφάνεια, ενώ φθάνει μέχρι και μέσα στον πυρήνα. Ο πιθανός συνεντοπισμός λοιπόν της HSP-90, λειτουργικής υπομονάδας του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών με προστατευτικές ιδιότητες, με το πλέγμα του ΚΣ, μας ώθησε στην περαιτέρω υπόθεση ενός μοντέλου χρήσης του ΚΣ στην μεταφορά του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών από την κυτταροπλασματική περιοχή σύνθεσης στην πυρηνική περιοχή ενεργοποίησης του. Στο μοντέλο αυτό το κυτταροπλασματικό πλέγμα χρησιμοποιείται από τον υποδοχέα των στεροειδών ορμονών σαν ένα σύστημα από "ράγες" πάνω στο οποίο βρίσκεται "αγκυροβολημένη" η HSP-90. Κινούμενος ο υποδοχέας επάνω σε αυτές τις ράγες, ανενεργός και προφυλαγμένος συνεχώς, οδηγείται από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα. Η επιβεβαίωση ενός τέτοιου μοντέλου θα αποτελούσε σημαντικό βήμα στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των στεροειδών ορμονών.

Ε. Τέλος διερευνήσαμε τις πιθανές διαφορές στη σταθερότητα των δικτύων των ΜΣ και των ΜΙ των κυτταρικών σειρών Ishikawa και HEC-50 παρουσία των αντίστοιχων αναστολέων. Η επιθηλιακή σειρά HEC-50, αντίθετα με την σειρά Ishikawa, προέρχεται από ελλιπώς διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου και δεν απαντά στην οιστρογονική παρουσία, αν και διαθέτει υποδοχείς οιστρογόνων. Οι ΜΣ έδειξαν να έχουν την ίδια ανθεκτικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές στην παρουσία του Et_3Pb^+ . Αντίθετα όμως, τα ΜΙ των κυττάρων Ishikawa φαίνεται να είναι σταθερότερα από τα ΜΙ των κυττάρων HEC-50 στην παρουσία της κυτοχλασίνης Β. Οι παρατηρήσεις αυτές υπονοούν μια πιθανή συσχέτιση της σταθερότητας των ΜΙ με τον βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων μέσω μετατόπισης της δυναμικής ισορροπίας πολυμερισμού της ακτίνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βασική Βιβλιογραφία

- Schliva, M. (1986) "The Cytoskeleton. An Introductory Survey"
- Ben-Ze'ev, A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 780 : 197-212
- Lindquist, S., Craig, E.A. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22 : 631-677
- Catelli, M.G., Binart, N., Vourc'h, C., Devin, J., Baulieu, E.E. (1990) "Activation of Hormone and Growth Factor Receptors" (Alexis, M.N., Sekeris, C.E., eds.) pp. 239-256

Λοιπή Βιβλιογραφία

- Adkins, B., Hunter, T., Sefton, B.M. (1982) *J. Virol.* 43 : 448-455
- Adler, S., Waterman, M.L., Xi, He., Rosenfeld, M.G. (1988) *Cell* 52 : 685-695
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1983) "Molecular Biology of the Cell" pp. 646-668
- Auffray, C., Rougeon, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107 : 303
- Baulieu, E.E. (1987) *J. Cell Biol.* 35 : 161-174
- Berg, J.M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85 : 99-102
- Bishop, J.M. (1985) *Cell* 42 : 23-30
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72 : 248-254
- Bresnick, E.H., Redmond, T., Sanchez, E.R., Pratt, W.B., Welch, M.J. (1988) *J. Cell Biochem. Suppl.* 12D p. 283
- Brugge, J.S., Erikson, E., Erikson, R.L. (1981) *Cell* 25 : 363-372
- Brugge, J.S., Yonemoto, W., Darrow, D. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 4 : 2697-2704
- Burnette, W.N. (1981) *Anal. Biochem.* 112 : 195-203
- Burrige, K., Feramisco, J.R. (1980) *Cell* 19 : 587-595
- Burrige, K., Connell, L. (1983) *J. Cell Biol.* 97 : 359-367
- Catelli, M.G., Radanyi, C., Renoir, J.M., Binart, N., Baulieu, E.E. (1988) *J. Cell Biochem. Suppl.* 12D p. 276
- Church, G.M., Gilbert, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81 : 1991-1995
- Courtneidge, S.A., Bishop, J.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79 : 7117-7121
- Davis, L.G., Dibner, M.D., Battey, J.F. (1986) "Basic Methods in Molecular Biology" Elsevier Science Publishing Co., N.Y.
- Faulstich, H., Merkler, I., Blackholm, H., Stournaras, C. (1984a) *Biochemistry* 23 : 1608-1612

- Faulstich, H., Stournaras, C., Doenges, K.H., Zimmermann, H-P. (1984b) FEBS 174 : 128-131
- Fey, E.G., Wan, K.M., Penman, S. (1984) J. Cell Biol. 98 : 1973-1984
- Fleming, H., Gurpide, E. (1980) J. Steroid Biochem. 3 : 3-11
- Geiger, B. (1979) Cell 18 : 193-205
- Geiger, B., Singer, S.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77 : 4769-4773
- Georgatos, S.D., Blobel, G. (1987a) J. Cell Biol. 105 : 105-115
- Georgatos, S.D., Blobel, G. (1987b) J. Cell Biol. 105 : 117-125
- Gravanis, A., Gurpide, E. (1986a) J. Clin. Endocrin. Metab. 63 : 356-359
- Gravanis, A., Gurpide, E. (1986b) J. Steroid Biochem. 24 : 469-474
- Green, S., Chambon, P. (1986) Nature 324 : 615-617
- Griffith, L.M., Pollard, T.D. (1978) J. Cell Biol. 78 : 958-965
- Groyer, A., Schweizer-Groyer, G., Cadepond, F., Mariller, M., Baulieu, E.E. (1987) Nature 328 : 624-626
- Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166 : 557-580
- Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H., Hatano, S. (1980) Biochemistry 19 : 2679-2683
- Heggeness, M.H., Simon, M., Singer, S.J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75 : 3863-3866
- Holinka, C.F., Finch, C.E. (1977a) Biol. Reprod. 16 : 385-393
- Holinka, C.F., Gurpide, E. (1979) Biol. Reprod. 20 : 242-246
- Holinka, C.F., Hata, H., Gravanis, A., Kuramoto, H., Gurpide, E. (1986a) J. Steroid Biochem. 25 : 781-786
- Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H., Gurpide, E. (1986b) Cancer Res. 46 : 2771-2774
- Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H., Gurpide, E. (1986c) J. Steroid Biochem. 24 : 85-89
- Holinka, C.F., Hetland, M.D., Finch, C.E. (1977b) Biol. Reprod. 17 : 262-264
- Hsu, C-Y.J., Frankel, F.R. (1987) J. Biol. Chem. 262 : 9564-9600
- Jensen, E.V., Mohla, S., Gorell, T., Tanaka, S., Desombre, E.R. (1972) J. Steroid Biochem. 3 : 445-458
- Kaufmann, S.H.E. (1990) Immunology Today 11 : 129-136
- Knapp, L.W., O'Guin, W.M., Sawyer, R.H. (1983) J. Cell Biol. 97 : 1788-1794
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83 : 8054-8058
- Kuramoto, H., Hamano, M., Nishida, M., Taguchi, A., Jobo, T., Suzuki, M., Osanai, K. (1976) Acta Obstet. Gynecol. Jpn 28 : 1405-1406
- Laemmli, U.K. (1970) Nature 227 : 680-685

- Lazarides, E. (1975a) *J. Cell Biol.* 65 : 549-561
- Lazarides, E., Burrige, K. (1975b) *Cell* 6 : 289-298
- Leong, A.S., Gilham, P.N. (1989) *Pathology* 21 : 266-268
- Lipsich, L.A., Cutt, J.R., Brugge, J.S. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2 : 875-880
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989) "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Publications, N.Y.
- Matteoni, R., Kreis, T.E. (1987) *J. Cell Biol.* 105 : 1253-1265
- Miller, J., McLachlan, A.B., Klug, A. (1985) *EMBO J.* 4 : 1609-1614
- Mose Larsen, P., Bravo, R., Fey, S.J., Small, S.V., Celis, J.E. (1982) *Cell* 31 : 681-692
- Nishida, E., Sakai, H. (1977) *J. Biochem.* 82 : 303-306
- Nishida, E., Koyasu, S., Sakai, H., Yahara, I. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 16033-16036
- Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H. (1985) *Acta Obstet. Gynaecol. Jap.* 37 : 1103-1111
- Oppermann, H., Levinson, W., Bishop, J.M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78 : 1067-1071
- Perdew, G.H., Whitelaw, M.L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 : 6708-6713
- Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C., Baulieu, E.E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 : 6969-6975
- Redmond, T., Sanchez, E.R., Bresnick, E.H., Schlesinger, M.J., Toft, D.O., Pratt, W.B., Welch, M.J. (1989) *Eur. J. Cell Biol.* 50 : 66-75
- Renoir, J-M., Buchou, T., Baulieu, E.E. (1986) *Biochemistry* 25 : 6405-6413
- Ringold, G.M. (1985) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25 : 529-566
- Sanchez, E.R., Housley, P.R., Pratt, W.B. (1986) *J. Steroid Biochem.* 24 : 9-18
- Sanchez, E.R., Meshinchi, M., Tienrungoj, W., Schlesinger, M.J., Toft, D.O., Pratt, W.B. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 : 6986-6991
- Sanchez, E.R., Redmond, T., Scherrer, C., Bresnick, E.H., Welch, M.J., Pratt, W.B. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2 : 756-760
- Schlesinger, M.J. (1986) *J. Cell Biol.* 103 : 321-32
- Schliva, M., Van Blerkom, J. (1981) *J. Cell Biol.* 90 : 222-235
- Shelanski, M.L., Gaskin, F., Cantor, C.R. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 70 : 765-768
- Smith, G.E., Summers, M.D. (1980) *Anal. Biochem.* 109 : 123-129
- Stebbing, H., Hunt, C. (1987) *J. Cell Sci.* 88 : 641-648
- Stournaras, C., Saridakis, I., Fostinis, Y., Georgoulas, V. (1991) *Cell Biochem. Funct.* 9 : 23-28

- Suzuki, M., Kuramoto, H., Hamano, M., Shirane, H., Watanabe, K. (1980) *Acta Endocr.* 93 : 108-113
- Theodoropoulos. P.A., Gravanis, A., Saridakis, I., Stournaras, C. (1992) *Cell. Biochem. Funct.* 10 : 281-288
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, R., Gaub, M.P., Chambon, P. (1988) *Nature* 333 : 185-188
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76 : 4350-4354
- Weber, K., Groschel-Stewart, U. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 71 : 4561-4564
- Weber, K., Glenney, J.P. (1981) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46 : 541-552
- Webster, N.J.G., Green, S., Jin, J.R., Chambon, P. (1988) *Cell* 54 : 199-207
- Welshons, V., Lieberman, M.E., Gorski, J. (1984) *Nature* 307 : 747-749
- Wieland, T. (1977) *Naturwiss.* 64 : 303-309
- Yamamoto, K.R. (1985) *Ann. Rev. Genet.* 19 : 209-252
- Yin, H.L., Stossel, T.P. (1979) *Nature* 281 : 583-586
- Ziemiecki, A. (1986a) *Virology* 151 : 265-273
- Ziemiecki, A., Catelli, M.G., Joab, I., Moncharmont, B. (1986b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138 : 1298-1307
- Zieve, G.W., Heidemann, S.R., McIntosh, J.R. (1980) *J. Cell Biol.* 87 : 160-169
- Zimmermann, H-P., Plagens, U., Vorgias, C.E., Traub, P. (1986) *Exp. Cell Res.* 167 : 360-368
- Zumbe, A., Stahli, C., Trachsel, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79 : 2927-2931