

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Ο ρόλος της πρωτεΐνης spinophilin στην μεταγωγή
σήματος και στο σχηματισμό σηματοδοτικών
συμπλόκων στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου**

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια : Καμηλέρη Ειρήνη

Υπεύθυνη Καθηγήτρια : Ζαχαρίου Βενετία

Επιβλέπων Καθηγητής: Ηλιόπουλος Αριστείδης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2008

Ευχαριστίες.....

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου Βάνα Ζαχαρίου για την πολύτιμη επιστημονική της καθοδήγησης, τις συμβουλές, την κατανόηση και βοήθειά της σε ότι χρειαζόμουνα όλο τον χρόνο αυτό στο εργαστήριο. Σίγουρα της οφείλω εκτός των άλλων τη διαμόρφωση της όποιας επιστημονικής μου σκέψης και την ευχαριστώ θερμά γι' αυτό.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Αριστείδη Ηλιόπουλο για την επιστημονική του καθοδήγηση ως επιβλέπων καθηγητής της μεταπτυχιακής διατριβής μου

Ιδιαίτερα ευχαριστώ όλα τα παιδιά με τα οποία συνεργάστηκα στο εργαστήριο και μοιράστηκα μαζί τους πολλές ανησυχίες και δυσκολίες, την Κάσση (ή Καζολίνι), τη Δήμητρα (ή καπετάν φασαρία), τη Ζωή, την Ευγενία και τη Νίκη.

Χίλια ευχαριστώ και ιδιαίτερη μνεία οφείλω στα κορίτσια μου Γεωργία και Ρίτσα και στα φιλαράκια μου, Ισμηνάκι, Μεθόδιο, Νίκο (ή τον Μούσια τον Μαλλιά), Ιωάννα, Γιάννη και Παναγιώτη για την αμέριστη συμπαράσταση τους αλλά και για όλες τις ωραίες στιγμές που περάσαμε και περνάμε μαζί.

Πάνω από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που πάντα πίστευε σε μένα και στήριξε και συνεχίζει να στηρίζει τις επιλογές μου, τη μητέρα μου Άννα, τον πατέρα μου Σπύρο και τον αδελφό μου Δημήτρη για τη συμπαράστασή.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τον Νικό για όλους τους λόγους που εκείνος ξέρει...

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Οπιοειδείς αγωνιστές.....	2
1.2 μ οπιοειδείς υποδοχείς, MOR.....	3
1.3 Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors-GPCRs).....	5
1.4 RGS (regulators of G protein signaling) πρωτεΐνες.	7
1.5 Ενδοκύττωση υποδοχέα	9
1.6 Η πρωτεΐνη spinophilin	11
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
2.1 Δημιουργία βακτηρίων μετασχηματισμού (competent cells).....	13
2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH5A της E. coli (transformation).....	13
2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation)	14
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	14
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	14
□ Κυτταρικές σειρές	16
2.6 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	17
2.7 Ανοσοφθορισμός.....	18
2.8 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών	19
2.9 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.....	19
2.10 Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	20
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
3.1 Μελέτη ενδοκύττωσης HA-MOR υποδοχέα σε σύγκριση με Spinophilin-GFP σε κυτταρικές σειρές HEK293T.	23
3.2 Μελέτη επηρεασμού ενδοκύττωσης του υποδοχέα MOR από τις RGS4 και RGSz πρωτεΐνες.....	25
3.3 Παρατήρηση θέσης spinophilin σε ζωντανά κύτταρα κατόπιν διέγερσης υποδοχέων (live imagine).....	27
3.4 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για εύρεση αλληλεπίδρασης spinophilin με RGS πρωτεΐνες.....	29

3.5 Πειράματα ανοσοϊστοχημείας για έλεγχο κυτταρικής θέσης της RGS9-2 πρωτεΐνης παρουσία και απουσία της πρωτεΐνης spinophilin.....	31
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων πάσχει από χρόνιες ασθένειες η θεραπεία των οποίων απαιτεί συνεχή χρήση φαρμάκων προκειμένου να ελαττωθεί η αίσθηση του πόνου. Αυτό όμως οδηγεί στην ανάπτυξη ανοχής του οργανισμού με αποτέλεσμα για την επίτευξη του ίδιου αναλγητικού αποτελέσματος να απαιτούνται υψηλότερες δόσεις φαρμάκου που με τη σειρά τους αυξάνουν τον κίνδυνο παρενεργειών και εθισμού. Τα αναλγητικά φάρμακα όπως η μορφίνη, η φαιντανύλη κ.α., ασκούν τις δράσεις τους καθώς προσδένονται στους μ απιοειδείς υποδοχείς (MOR), οι οποίοι συζεύγονται με τις G πρωτεΐνες. Οι περισσότερες εξαρτησιογόνες ουσίες επιδρούν στο μεσολιμβικό σύστημα ανταμοιβής το οποίο εκτίνεται από VTA (Ventral Tegmental Area) ως τον επικλινή πυρήνα. Οι RGS (Regulators of G protein Signaling) πρωτεΐνες ρυθμίζουν την ένταση και τη δραστηριότητα των G πρωτεϊνών μετά την ενεργοποίηση των μ υποδοχέων, δρώντας ως σημαντικοί ρυθμιστές στο σηματοδοτικό μονοπάτι του κυττάρου. Τρία μέλη της οικογένειας των RGS, RGS9-2, RGS4 και RGSz έχει δειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση των αναλγητικών φαρμάκων. Η spinophilin είναι μια ευρέως εκφραζόμενη δενδριτική πρωτεΐνη που δρα ως σκαλωσιά για πληθώρα άλλων πρωτεϊνών. Η spinophilin έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην μετάδοση της κυτταρικής σηματοδότησης αλλά και της πλαστικότητας των δενδριτικών ακάνθων. Ο ρόλος της spinophilin στην προσαρμοστική διεργασία που χαρακτηρίζει τον εθισμό στα οπιοειδή δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης οι αλληλεπιδράσεις τις spinophilin με συγκεκριμένες RGS πρωτεΐνες, RGS9-2, RGS4 και RGSz στην περιοχή του ραβδωτού και κατά πόσο η ένταση των συμπλόκων αλλάζει κατόπιν διέγερσης του υποδοχέα με διαφορετικούς αγωνιστές, μορφίνη ή φαιντανύλη. Και οι τρεις RSG πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την spinophilin στη βασική κατάσταση. Η ανάλυση παροδικά επιμολυσμένων κυττάρων HEK293 με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας αποκάλυψε ότι στη βασική κατάσταση η spinophilin συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα MOR. Κατόπιν διέγερσης του MOR με μορφίνη ο υποδοχέας ενδοκυττώνεται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα από αυτά που ενδοκυττώνεται η spinophilin. Η κυτταρική θέση της spinophilin παρατηρήθηκε και με πειράματα σε πραγματικό χρόνο (live imagine) που έγιναν σε ινοβλάστες διαμολυσμένους με ένα spinophilin-GFP όχημα. Τέλος, για τον έλεγχο του αν η spinophilin παίζει ρόλο στην σωστή τοποθέτηση RGS πρωτεϊνών στο κύτταρο πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε MEF κυτταρικές σειρές που είτε υπήρχε είτε απουσίαζε το γονίδιο της spinophilin. Παρατηρήσαμε ότι απουσία

spinophilin η RGS9-2 δε τοποθετείτε σωστά στην κυτταρική μεμβράνη. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η spinophilin έχει ένα ουσιώδη ρόλο στην ρύθμιση της απόκρισης των υποδοχέων των μ οπιοειδών (MOR) στη δράση των RGS πρωτεϊνών και στις προσαρμοστικές αλλαγές που σχετίζονται με τον εθισμό σε οπιοειδή.

ABSTRACT

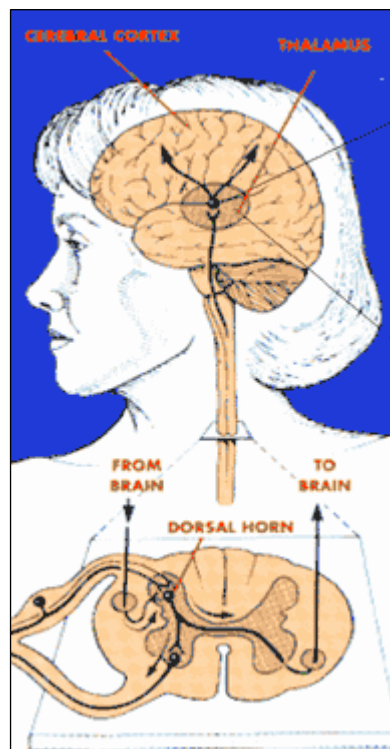
The therapy of patients suffering from chronic diseases demands the repetitive use of drugs in order to alleviate the pain. However, that gradually leads to increasing drug tolerance necessitating larger drug doses to achieve the same effect. The later further increases the risk of side effects and addiction. Opioid analgetic drugs, such as morphine, fentanyl etc, exert their function by binding to μ opioid receptors (MOR) that belong to the GPCR receptor family. Such drugs act on mesoaccumbens dopamine system that projects from the Ventral Tagmented Area (VTA) to the Nucleus Accumbens (NAc). RGS proteins regulate the activity and the effectiveness of μ opioid receptor after its activation, regulating the downstream signaling cascade in cells. Three RGS family members, RGS9-2, RGS4, and RGSz were previously shown to act as essential modulatory regulators of the opiate drug actions. Spinophilin, a dendritic protein is highly expressed in dendric spines and functions as a scaffolding protein for many other proteins as well. Spinophilin has a pivotal role in mediating signaling transduction and the orchestration of plasticity of dendric spines. However, the role of spinophilin in the adaptive process underlying opiate addiction is not fully understood. By using immunoprecipitation approach, the present study examined the interaction of spinophilin with specific RGS proteins, RGS9-2, RGS4, RGSz in NAc and how such interactions are altered following the administration of different drugs, i.e. fentanyl and morphine. Here, we show that all three RGS proteins interact with spinophilin under basal conditions. Moreover, confocal microscopic analysis in transiently transfected HEK293 cells revealed that spinophilin co-localize with MOR receptor. However, after treatment with morphine MOR receptor was internalized in cellular compartments distinct from those found of spinophilin. The cellular position of spinophilin was observed with live imagine experiments in MEF cells transfected with spinophilin::GFP vector. Finally, in order to examine if spinophilin plays a role in correct placement of RGS in plasma membrane, we performed immunochemistry experiments on WT and KO MEF cell lines for spinophilin protein. In the absence of spinophilin, RGS9-2 protein was not correctly placed at the plasma membrane. Together, these data suggest that spinophilin plays an essential role in MOR functional response as well as in the adaptive changes associated with opiate addiction.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πόνος είναι ένας από τους βασικούς τρόπους με τους οποίους το σώμα επικοινωνεί με τον εγκέφαλο. Οι οδυνηροί ερεθισμοί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος μεταφέρονται διαμέσου των νεύρων στο νωτιαίο μυελό και από εκεί στον εγκέφαλο ο οποίος αναγνωρίζει την αίσθηση του πόνου. Η μεταφορά του οδυνηρού σήματος από το σημείο του σώματος ως τον εγκέφαλο γίνεται ταχύτατα με τη βοήθεια ηλεκτρικών μηνυμάτων και των ειδικών νευροδιαβιβαστικών ουσιών. Τα ειδικά φάρμακα που καταπολεμούν τον πόνο ονομάζονται αναλγητικά φάρμακα. Μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες αναλγητικών φαρμάκων είναι τα οπιοειδή αναλγητικά. Τα οπιοειδή αναλγητικά όπως παραδείγματος χάριν, η μορφίνη, η φαιντανύλη, η μεθαδόνη κ.α ασκούν τη δράση τους διεγείροντας τους ειδικούς υποδοχείς στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Τρεις τύποι οπιοειδών υποδοχέων έχουν κλωνοποιηθεί, οι οποίοι ονομάστηκαν μ, κ, δ. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην κατηγορία υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες. Παρόλο που τα αναλγητικά φάρμακα είναι αρκετά αποτελεσματικά στα περισσότερα είδη χρόνιου και οξέος πόνου επιφέρουν στο σύστημα αρκετές παρενέργειες (Hooks et al., 2007).

Η εξάρτηση από φάρμακα (drug addiction) είναι μία χρόνια νόσος που προκαλείται από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε οπιοειδή (και όχι μόνο) και χαρακτηρίζεται από σφοδρή επιθυμία για φάρμακο, εθισμό και από την ανάπτυξη αναλγητικής ανοχής. Τα συμπτώματα αυτά εκδηλώνονται εξαιτίας αλλαγών στα εγκεφαλικά δίκτυα που επιδρούν αυτά τα φάρμακα. Οι περισσότερες εξαρτησιογόνες ουσίες επιδρούν έμμεσα στο μεσολιμβικό σύστημα ανταμοιβής το οποίο εκτείνεται από το VTA ως τον επικλινή πυρήνα (Εικόνα 1).

Η κατανόηση των μονοπατιών δράσης των αναλγητικών αποτελεί κεντρικό άξονα στην δημιουργία νέων πιο αποτελεσματικών αναλγητικών φαρμάκων καθώς και στην μείωση των παρενεργειών (McClung CA, 2006).



Εικόνα 1: Μεσολιμβικό σύστημα ανταμοιβής στον ανθρώπινο εγκέφαλο.

1.1 Οπιοειδείς αγωνιστές

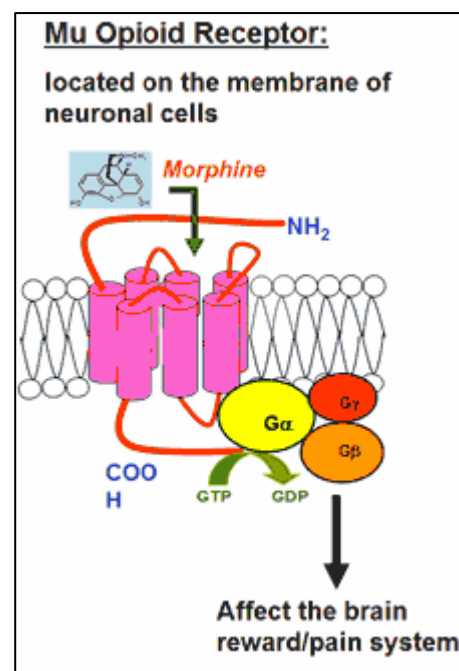
Τα οπιοειδή αναλγητικά είναι φυσικά, ημισυνθετικά ή συνθετικά παράγωγα του οπίου, που σχετίζονται δομικά και έχουν δράση παρόμοια με τη μορφίνη. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται για περισσότερο από δύο χιλιετίες, παραμένουν εκ των ων ουκ άνευ στην αντιμετώπιση του πόνου.

Οι φαρμακολογικές δράσεις των οπιοειδών προέρχονται από τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις με τους ειδικούς οπιοειδείς υποδοχείς στο ΚΝΣ. Μιμούνται τη δράση των ενδογενών οπιοειδών, ανάλογα με το είδος του υποδοχέα με τον οποίο συνδέονται. Δρουν σε τρεις τουλάχιστον διαφορετικούς υποδοχείς (μ, κ και δ), στους οποίους η δραστηριότητά τους ποικίλλει. Τα περισσότερα από τα οπιοειδή που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη δρουν εκλεκτικά στους μ υποδοχείς, όπου παρεμποδίζουν την προσυναπτική έκλυση νευροδιαβιβαστών του πόνου [Beydoun et al., 1999].

Ωστόσο κατά την επαναλαμβανόμενη έκθεση σε οπιοειδή παρουσιάζονται διάφορες παρενέργειες, όπως καταστολή του αναπνευστικού, γρήγορη ανάπτυξη ανοχής και εξάρτησης, γεγονότα που τα καθιστά λιγότερο αποτελεσματικά κατά την αγωγή. Παρόλο που τρεις υποδοχείς μεσολαβούν για τη δράση των οπιοειδών αγωνιστών, τα περισσότερα οπιοειδή που χρησιμοποιούνται κλινικά για τη διαχείριση του πόνου όπως η μορφίνη, η φαιντανύλη (4-anilidopiperidine) και η μεθαδόνη, παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για το μ οπιοειδή υποδοχέα (Raynor et al., 1994).

Η μορφίνη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα αναλγητικά φάρμακα στην αντιμετώπιση του χρόνιου πόνου. Ασκει τις δράσεις της ως αγωνιστής, έπειτα από σύνδεση της στους μ υποδοχείς των οπιοειδών που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων του νευρικού συστήματος. Αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής είναι η μείωση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης άρα και της παραγόμενης cAMP.

Η φαιντανύλη ((*N*-phenyl-*N*-(1-phenethyl-4-piperidinyl)propanamide) έχει 80 φορές μεγαλύτερη αναλγητική ισχύ από τη μορφίνη αλλά μικρή διάρκεια δράσης. Οι



Εικόνα 2: Ο μ υποδοχέας των οπιοειδών (MOR).

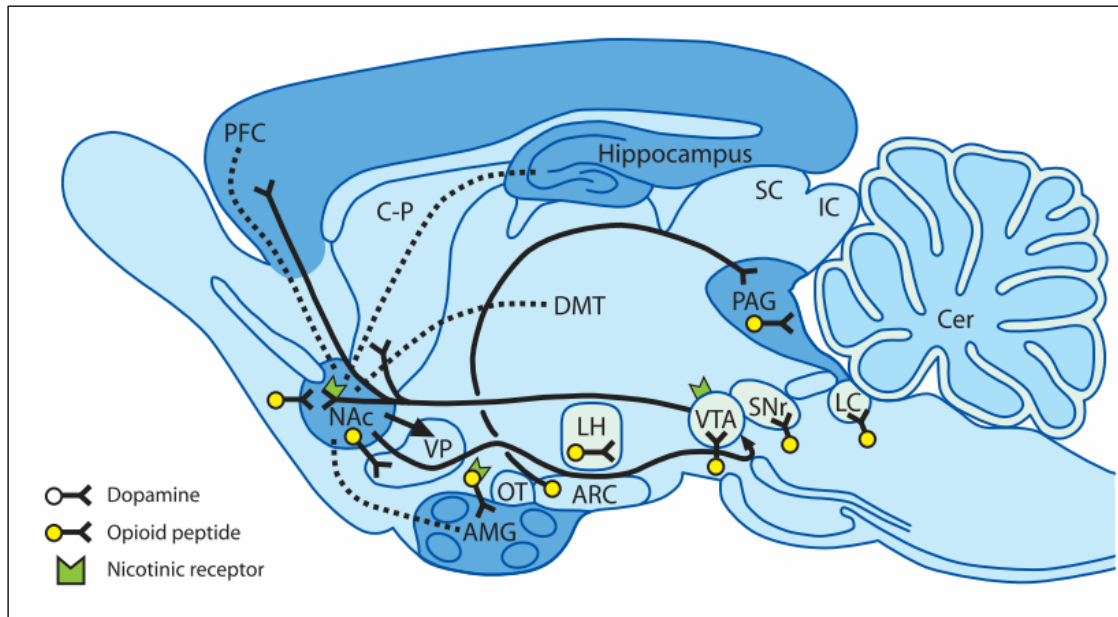
φαρμακολογικές της δράσεις προάγονται μέσω της διέγερσης του MOR. Μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχουν διαφορές στους μηχανισμούς που σχετίζονται με τα αναλγητικά αποτελέσματα των δύο φαρμάκων (Paronis and Holtzman, 1992). Ωστόσο η ανάπτυξη ανοχής και εξάρτησης παρουσιάζεται μετά την χρόνια αγωγή και των δύο.

1.2 μ οπιοειδείς υποδοχείς, MOR

Οι μελέτες της δράσης των οπιούχων αλλά και των οπιοειδών πεπτιδίων οδήγησαν στην ανακάλυψη των οπιοειδών υποδοχέων το 1973. Αργότερα οι διαφορετικές δράσεις των οπιοειδών οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι υποδοχείς αυτοί είναι ετερογενείς [Martin et al., 1976, Smith and Simon, 1980], δηλαδή ότι υπάρχουν περισσότεροι από ένας υποδοχέας με διαφορετική συγγένεια για τα διάφορα οπιοειδή. Στις μέρες μας, οι οπιοειδείς υποδοχείς έχουν ταξινομηθεί σε τρεις καλά χαρακτηρισμένες κατηγορίες, στους μ , δ και κ και παρουσιάζουν ομολογία μεταξύ τους περίπου 60% [Clark et al., 2003]. Ως εκ τούτου η επιλεκτότητα τους οφείλεται στο υπόλοιπο 40% των αλληλουχιών τους [Reisine και Bell, 1993]. Πειράματα απομόνωσης και χαρακτηρισμού των οπιοειδών υποδοχέων αλλά και η κλωνοποίησή τους οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για διαμεμβρανικές (επτά διαμεμβρανικά τμήματα) υδρόφοβες πρωτεΐνες με τρεις εξωκυττάρειες και τρεις ενδοκυττάρειες αγκύλες (loops), οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των διαμεμβρανικών υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτου [Chen et al., 1993, Kong et al 1993] (Εικόνα 2).

Οι μ υποδοχείς πήραν το όνομα τους από τη σύνδεση τους με τη μορφίνη και παίζουν καταλυτικό ρόλο για τα ανταμειβηκά αποτελέσματα της μορφίνης. [Contet et al., 2004].

Ο MOR εκφράζεται ευρέως τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και στο περιφερικό. Η διαφορετική κατανομή του σημαίνει ότι μπορεί έχει διαφορετικές δράσεις ανάλογα με τον τύπο κυττάρων που εντοπίζεται. Η έκφραση του MOR υποδοχέα εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στον επικλινή πυρήνα (Nucleus Accumbens, NAc), η περιοχή του εγκεφάλου που συνδέεται με τον εθισμό. Ο MOR υποδοχέας εντοπίζεται επίσης σε υψηλά επίπεδα και στον ιππόκαμπο, στην περιυδραγωγική φαιά ουσία, στον υπομέλανα τόπο και στον νωτιαίο μυελό [Becker et al., 2004](Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Τοποθεσία οπιοειδών υποδοχέων

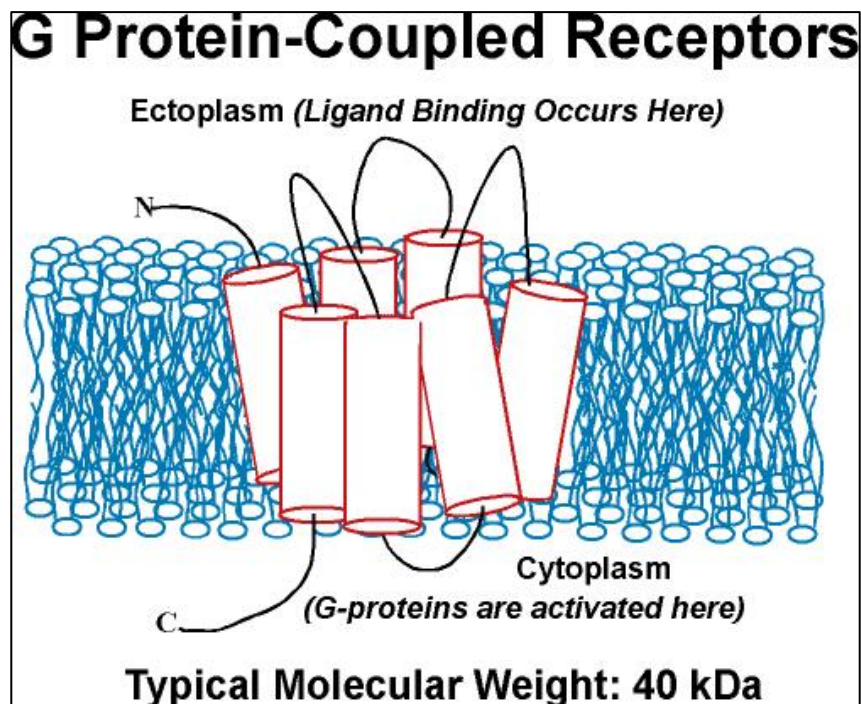
Μελέτες σε ποντικούς όπου έχει απαλειφθεί το γονίδιο που εκφράζει τον μ υποδοχέα, υποστηρίζουν ότι ο MOR ευθύνεται για την αναλγησία και τον εθισμό που προκαλούν τα οπιοειδή.

Η συγγένεια της μορφίνης για τον μ υποδοχέα είναι περίπου 50 μεγαλύτερη από αυτή που έχει για τον δ [Emmerson et al., 1996]. Ασκεί την αναλγητική και ανταμιοβική δράση της μέσω των G_i/o πρωτεϊνών που είναι συζευγμένες με τους μ οπιοειδείς υποδοχείς [Evans, 2004] και σε μικρότερο βαθμό μέσω των δ και κ [Kieffer, 1999]. Οι δ και κ υποδοχείς παρόλο που παίζουν ρόλο στη διαχείριση του πόνου είναι λιγότεροι αποδοτικοί σαν αναλγητικοί στόχοι [Przewlocki και Przewlocka 2001].

1.3 Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors-GPCRs).

Ποιο συγκεκριμένα οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (GPCRs). Οι GPCRs απαντώνται μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων, των φυτών και των ζώων. Οι GPCRs απαρτίζουν μεγάλο τμήμα των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης και κωδικοποιούνται από 1-3% των γονιδίων των θηλαστικών. Ένα κοινό χαρακτηριστικό της σηματοδότησης των GPCR είναι η ταχεία απώλεια της κυτταρικής αισθαντικότητας ακόμα και κατά τη διάρκεια ενός ερεθίσματος [Ferguson, 2001, Luttrell and Lefkowitz, 2002].

Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας οι οπιοειδείς υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούνται από επτά τμήματα με τα οποία διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μορφολογία ενός τυπικού GPCR υποδοχέα.

Στην ανενεργή μορφή της η G πρωτεΐνη υπάρχει σαν ετεροτριμερές στη εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και αποτελείται από τρεις διαφορετικές υπομονάδες: την α , τη β και τη γ . Η πρόσδεση ενός αγωνιστή στον υποδοχέα προκαλεί την αλλαγή της στερεοδομίας του υποδοχέα γεγονός που οδηγεί την πρόσδεση της G πρωτεΐνης σε αυτόν. Ο διεγερμένος υποδοχέας πυροδοτεί την ανταλλαγή GDP που είναι προσδεμένο στην $G\alpha$ με GTP και ακολουθεί η απόσχιση του ενεργού πλέον συμπλόκου α -GTP από τις $G\beta\gamma$ υπομονάδες. Οι ενεργοποιημένες υπομονάδες ξεκινάνε μία ακολουθία σηματοδότησης ενεργοποιώντας κάτωθεν μόρια τελεστές. Μέσω της GTPase δράσης της $G\alpha$, το α -GTP σύμπλοκο

υδρολύεται σε α -GDP, οδηγώντας στην επανένωση της $G\alpha$ με τις $G\beta\gamma$, επαναφέροντας το όλο σύστημα στην αρχική ανενεργή του κατάσταση (Εικόνα 5).

Το γεγονός ότι οι ετεοτριμερείς G πρωτεΐνες μεταδίδουν πληροφορίες ανάμεσα στους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και στα μόρια τελεστές (effector molecules), μεσολαβώντας σε σημαντικές κυτταρικές αποκρίσεις, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις τις καθιστά σημαντικούς στόχους για το θεραπευτικό χειρισμό των σηματοδοτικών μονοπατιών.

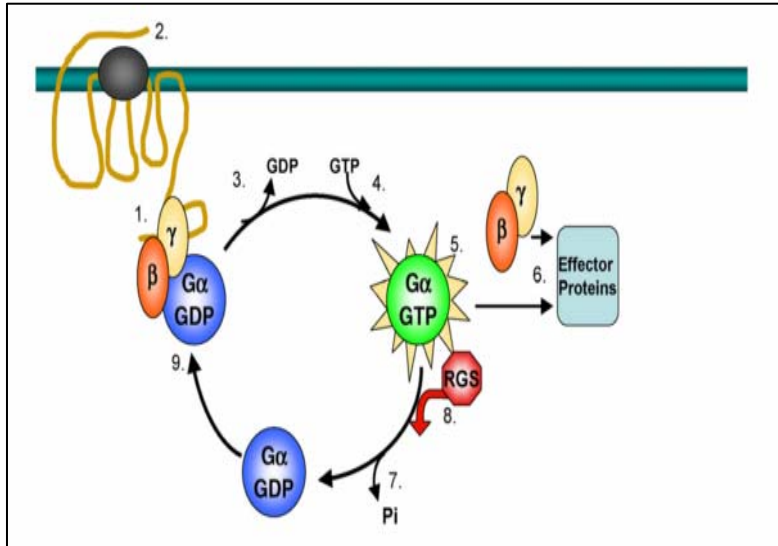
Έχει προταθεί ότι οι οπιοειδείς υποδοχείς μοιράζονται ένα κοινό σημείο πρόσδεσης το οποίο εντοπίζεται σε μια εσωτερική συντηρημένη περιοχή που συμπεριλαμβάνει τους διαμεμβρανικούς έλικες 3, 4, 5, 6, και 7. Η περιοχή αυτή καλύπτεται μερικώς από τους εξωκυτταρικές κοιλότητες διαδραματίζοντας ρόλο στην επιλεκτική πρόσδεση των αγωνιστών στους διαφορετικούς οπιοειδείς υποδοχείς. Τα μεγαλύτερα μόρια (όπως τα πεπτίδια) γεμίζουν σχεδόν όλο τη διαθέσιμη περιοχή πρόσδεσης και αλληλεπιδρούν και με τμήματα από μη συντηρημένες περιοχές. Οι μικρότεροι αγωνιστές αλκαλοειδών (όπως η μορφίνη) αλληλεπιδρούν κυρίως με τα συντηρημένα τμήματα που βρίσκονται στο κατώτερο σημείο της περιοχής πρόσδεσης.

Υπάρχουν τέσσερις μεγάλες κλάσεις των $G\alpha$ υπομονάδων των G πρωτεϊνών, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$. Οι διαφορές που παρουσιάζουν εντοπίζονται στα διαφορετικά αποτελέσματα που επιφέρουν ως εκτελεστές [Zachariou et al., 2007].

1.4 RGS (regulators of G protein signaling) πρωτεΐνες.

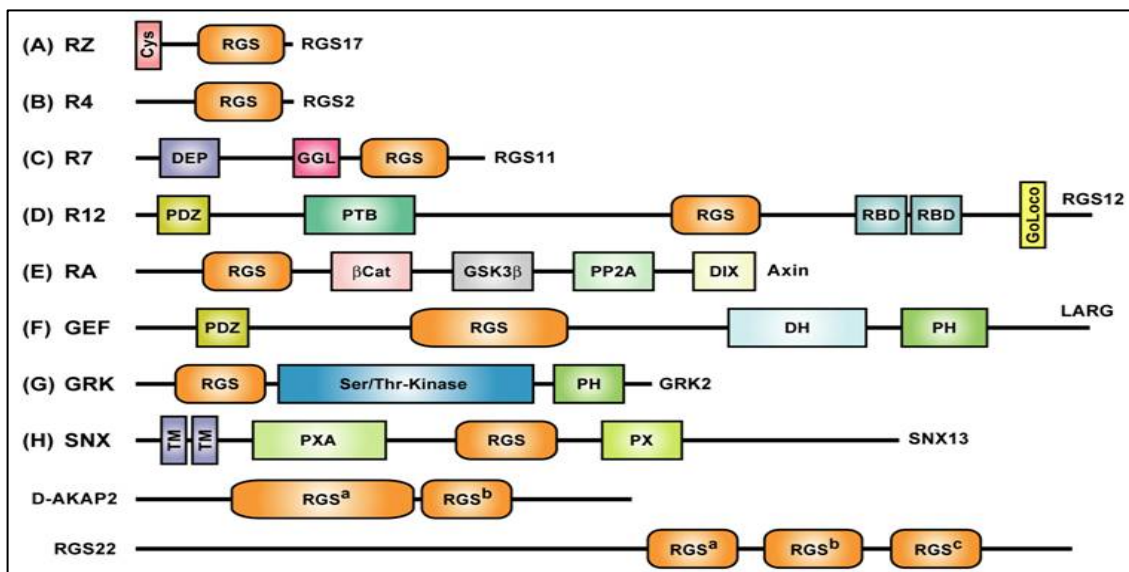
Οι RGS πρωτεΐνες ανακαλύφθηκαν τα τελευταία χρόνια ως πιθανοί μεσολαβητές των αλλαγών που συμβαίνουν εξαιτίας διαδικασιών εθισμού. Οι RGS πρωτεΐνες ρυθμίζουν αρνητικά την ένταση και τη

δραστικότητα των G πρωτεϊνών μετά την ενεργοποίηση των μ (και όχι μόνο) υποδοχέων, δρώντας ως σημαντικοί ρυθμιστές στο σηματοδοτικό μονοπάτι του κυττάρου. Κατά αυτόν τον τρόπο τροποποιούν τη δράση των οπιοειδών όχι μόνο παρεμβαίνοντας στη διάρκεια της σήμανσης αλλά επεμβαίνοντας και στην αλληλεπίδραση του μ υποδοχέα με άλλες πρωτεΐνες, εξίσου σημαντικές κατά τη σηματοδότηση (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Η δράση των RGS πρωτεϊνών σε έναν GPCR υποδοχέα.

Η ουσία των RGS πρωτεϊνών εντοπίζεται στο ότι έχουν ρόλο GTP-ase (GAPs) για όλες τις



Εικόνα 6: Οι οικογένειες των RGS πρωτεϊνών.

α υπομονάδες των G πρωτεϊνών.

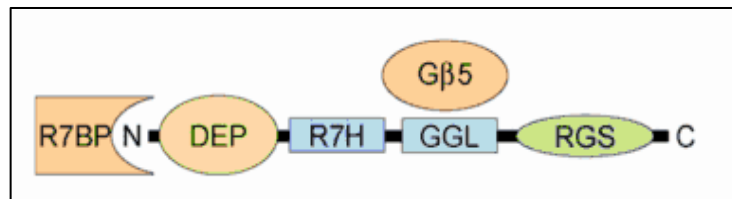
Προσδένονται απευθείας με τη μεταβατική δομή της Gα υπομονάδας [Burchet, 2003] και επιταχύνοντας την υδρόλυση του GTP [Berman και Gilman, 1998, Ross και Wilkie, 2000] επαναφέρουν τους GPCRs στην ανενεργή τους κατάσταση. Κατά αυτόν τον τρόπο αλλάζουν σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από τις G πρωτεΐνες, όπως είναι κατασταλτικές ή εξασθενητικές αντιδράσεις. Σήμερα 37 RGS πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί σε ιστούς θηλαστικών [Siderovski et al., 2005] οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τμήματα που τους προσδίδουν συμπληρωματικές συνδετικές ή δομικές ιδιότητες. Όλες οι RGS παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στο αποκαλούμενο RGS τμήμα τους. Το τμήμα αυτό αποτελείται από περίπου 125 αμινοξέα [Koelle and Horvitz, 1996] που σχηματίζουν δομή α-έλικας. Το RGS τμήμα ασκεί τη δράση του μέσω της πρόσδεσής του στη προσδεμένη GTP μορφή της Gα υπομονάδας και επιταχύνει τον τερματισμό της διέγερσης των μορίων τελεστών. Οι RGS έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 5 μεγάλες υπο-οικογένειες (Εικόνα 6). Στις R4, R7, R12, RZ, και RA (axin) [Ross και Wilkie, 2000]. Τα μέλη της RZ και της R4 υποοικογένειας είναι μικρές πρωτεΐνες μεγέθους 20-30kDa με μικρό αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο, δεξιά και αριστερά του RGS τμήματος τους. Αντιθέτως τα μέλη των R7, R12, RA υποοικογενειών είναι μεγάλες πρωτεΐνες με μεγέθη που φτάνουν και τα 160kDa. Οι πιο μικρές RGS δρουν σαν ρυθμιστές της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών, ενώ οι μεγαλύτερες είναι πολύ-λειτουργικές πρωτεΐνες με την ικανότητα να προσδένονται τόσο σε G πρωτεΐνες, όσο και σε σηματοδοτικά μόρια. Ποιο συγκεκριμένα:

Η **RGS4**, μια πρωτεΐνη 28KDa εκφράζεται σε πολλές περιοχές του ΚΝΣ που σχετίζονται με εθισμό και εξάρτηση από αναλγητικά φάρμακα συμπεριλαμβανομένου του ραβδωτού, του προμετωπιαίου φλοιού (prefrontal cortex) και του υπομέλανα τόπου (locus coeruleus) και του οπίσθιου κέρασ του νωτιαίου μυελού. Η RGS4 ανήκει στην R2 υποοικογένεια των RGS πρωτεϊνών και εκτός από τα κύρια 120 αμινοξέα της RGS περιοχής φέρει στο αμινοξυτελικό της άκρο περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες η οποία γίνεται στόχος παλμιτοϋλίωσης παίζοντας ρόλο στην πρόσδεση στην μεμβράνη. Επίσης το N-τελικό άκρο είναι στόχος αργυνυλίωσης και ουβικιτυνυλίωσης στόχος δηλαδή πρωτεοσωμικής αποδόμησης [Zeng W et al., 1998, Davydov et al., 2000, Lee MJ et al., 2005].

Η **RGSz**, μια πρωτεΐνη 22KDa εκτός από το συντηρημένο RGS τμήμα περιέχουν στο αμινοτελικό άκρο τους μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες (cysteine string motif). Αυτή η

περιοχή είναι στόχος παλμιτουϊλίωσης και πιθανόν να εμπλέκεται τόσο στην πρόσδεση τους στη μεμβράνη όσο και στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες [Jones, 2004].

Η **RGS9-2**, είναι μια πρωτεΐνη 75KDa. Το mRNA της RGS9 βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα σε περιοχές του εγκεφάλου που παίζουν ρόλο στην αναλγησία



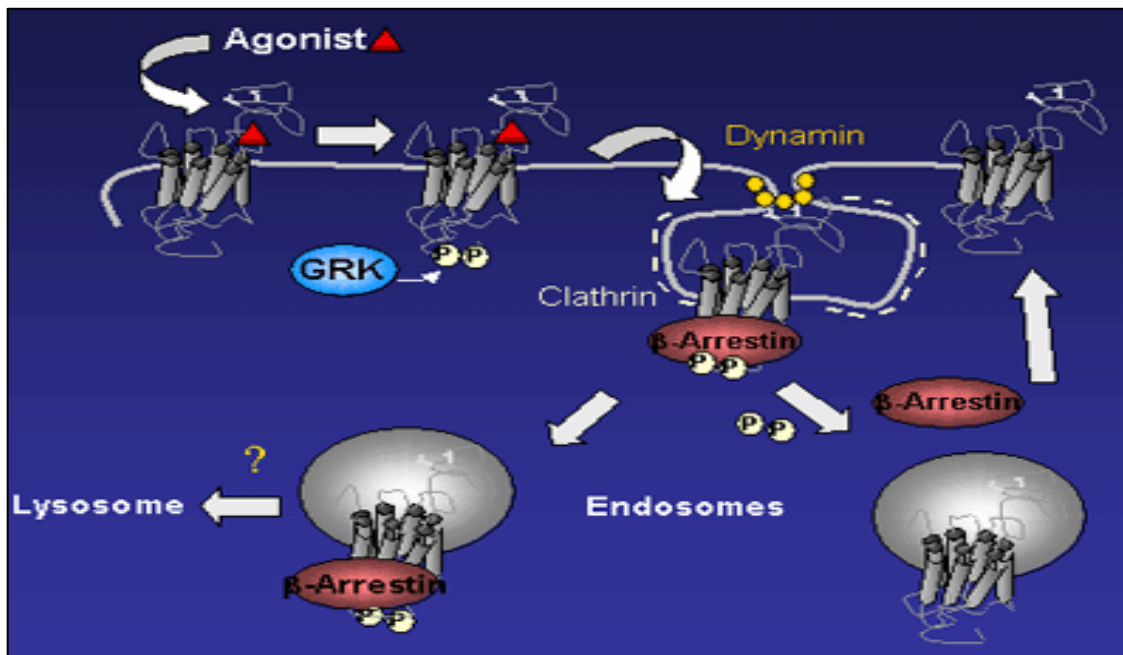
Εικόνα 7: Η δομή της RGS9-2 πρωτεΐνης

και τον εθισμό από οπιοειδή, όπως το ραβδωτό, συμπεριλαμβανομένου του επικλινή πυρήνα, με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται σε όλο τον υπόλοιπο εγκέφαλο [Rahman et al., 1999]. Εκτός από το συντηρημένο RGS τμήμα στο N-άκρο φέρει DEP (Disheveled, Egl-10 και Pleckstrin) τμήμα που ακολουθείται από ένα GGL (G-protein Gamma-subunit Like) τμήμα. Το DEP τμήμα είναι υπεύθυνο για πρόσδεση της RGS9-2 στην κυτταρική μεμβράνη. Ενώ το GGL τμήμα αντιπροσωπεύει ένα σημείο πρόσδεσης της Gβ5 υπομονάδας. Η ισχυρή αλληλεπίδραση της Gβ5 με το GGL είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα και των δύο μελών του συμπλόκου [Martemyanov et al., 2003](Εικόνα 7).

Προηγούμενες εργαστηριακές μελέτες [Zachariou *et al.*, 2003] απέδειξαν ότι ζώα στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο της RGS9, παρουσιάζουν αυξημένη κατά 10 φορές περίπου την ανταμειβτική δράση της μορφίνης συγκριτικά με τα ζώα αγρίου τύπου. Επιπλέον εμφανίζουν ενισχυμένη αναλγητική απόκριση από τη μορφίνη και καθυστέρηση ανάπτυξης ανοχής καθώς και πολύ έντονη εξάρτηση από τη μορφίνη.

1.5 Ενδοκύττωση υποδοχέα

Κατόπιν διέγερσης με αγωνιστή πολλοί GPCR υποδοχείς ενδοκυττώνονται άμεσα από την κυτταρική μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ενδοκύττωση GPCR υποδοχέων είναι μια σημαντική ρυθμιστική λειτουργία και για την απευαισθητοποίηση τους. Φαίνεται ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά μονοπάτια που επάγουν ενδοκύττωση κατόπιν διέγερσης με αγωνιστή. Το πρώτο μονοπάτι είναι μέσω κυστιδίων κλαθρίνης [Lefkowitz et al., 1998, Roth et al., 1981], ενώ το δεύτερο μονοπάτι συμβαίνει μέσω caveolae [Anderson 1998, Okamoto et al., 1998]. Ο μοριακός μηχανισμός της ενδοκύττωσης μέσω κλαθρίνης έχει μελετηθεί εκτενώς για τον β2-αδρενεργικό υποδοχέα (β2AR) [Lefkowitz et al., 1998].

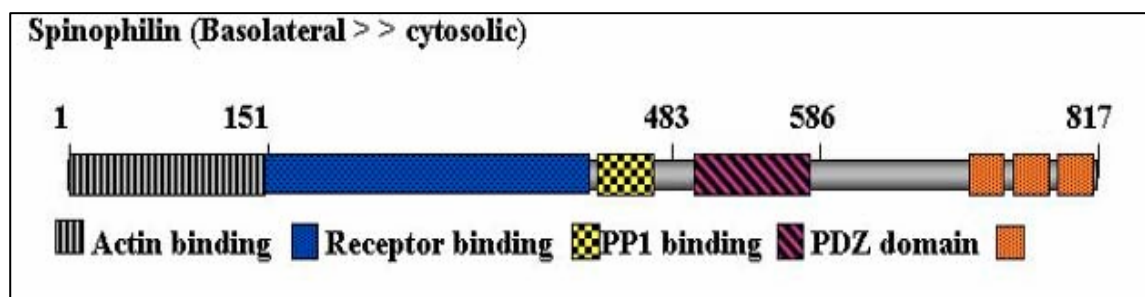


Εικόνα 8: Μονοπάτι ενδοκύττωσης GPCR υποδοχέων κατόπιν πρόσδεσης αγωνιστή

Στο μοντέλο ενδοκύττωσης μέσω κλαθρίνης κατόπιν πρόσδεσης του αγωνιστή στον υποδοχέα, ο υποδοχέας φωσφορυλιώνεται από τις GRK (G-protein coupled receptor kinase) πρωτεΐνες [Ferguson et al., 1998, Leftowitz 1993]. Η φωσφορυλίωση από τις GRK οδηγεί σε ομόλογη απευαισθητοποίηση του υποδοχέα, δηλαδή στο να χαθεί η λειτουργική απόκριση που παρουσιάζει μετά τη συνεχή χορήγηση ενός αγωνιστή. Επίσης η φωσφορυλίωση του υποδοχέα επάγει την πρόσδεση κυτταροπλασματικών βοηθητικών πρωτεϊνών γνωστές ως β-αρρεστίνες στην ενδοκυττάρια αγκύλη στο καρβοξυτελικό άκρο του φωσφορυλιωμένου υποδοχέα. του άκρο, οδηγώντας τελικά στην απελευθέρωση του από τις G πρωτεΐνες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκύττωση του υποδοχέα, η μεταφορά του οποίου γίνεται μέσα σε κυστίδια κλαθρίνης. Μόλις φτάσει στο εσωτερικό του κυττάρου διαγράφονται δύο πιθανές πορείες. Η πρώτη αφορά τη μεταφορά του υποδοχέα στα ενδοσώματα, από όπου και οδηγείται στην επιφάνεια του κυττάρου, ενεργοποιείται ξανά και μπορεί να προσδεθεί σε ένα καινούριο σηματοδοτικό μόριο, ενώ η δεύτερη την κατεύθυνση του υποδοχέα στα λυσοσώματα όπου και αποδομείται (Εικόνα 8).

1.6 Η πρωτεΐνη spinophilin

Η spinophilin και η Neurabin είναι δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών μεμβρανικών και κυτταροσκελετικών λειτουργιών [Sarrouilhe et al., 2006]. Η spinophilin είναι μια ευρέως εκφραζόμενη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 140kDa αποτελούμενη από 817 αμινοξέα. Ανακαλύφθηκε σαν μια από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την Πρωτεϊνική Φωσφατάση 1, (protein phosphates 1, PP1) η οποία ρυθμίζει τη δραστηριότητα διαφόρων καναλιών όπως και τους γλουταμικούς υποδοχείς [Greengard et al., 1999]. Κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1997 [Allen PB et al, 1997]. Αν και εντοπίζεται παντού στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, η spinophilin εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις δενδριτικές άκανθες [Feng et al, 2000], στην περιοχή του excitatory transmission γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην μετάδοση κυτταρικής σηματοδότησης. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Westerns) σε εγκεφαλικά εκχυλίσματα φανέρωσαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης spinophilin στον ιπόκαμπο, στο ραβδωτό, στο θάλαμο και στον υποθάλαμο. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν στο φλοιό και στην παρεγκεφαλίδα [Allen et al., 1997].



Εικόνα 9: Η δομή της πρωτεΐνης spinophilin

Όντας μια ευρέως διανεμημένη πρωτεΐνη η spinophilin, αποτελείται από ποικίλα τμήματα πρόσδεσης όπως αυτό της φωσφατάσης 1(PP1), της F-actin και του PDZ [Wang et al., 2004] (Εικόνα 9). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η spinophilin προσδένεται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένου της ομόλογης της neurabin [Allen PB et al, 1997], κινάσες, RGS πρωτεΐνες [Wang et al., 2004], GPCR [Allen PB et al, 1997, Yan et al., 1999, Feng et al., 2000, Smith et al., 1999], κυτταροσκελετό ακτίνης [Satoh et al., 1998]. Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι η spinophilin αλλά όχι η neurabin προσδένεται στην τρίτη ενδοκυττάρια κοιλότητα (3i loop) των α_2 αδρενεργικών και D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων, ρυθμίζοντας την έκφραση τους, τη λειτουργία και τη σηματοδότηση τους [Wang et al., 2005]. Η spinophilin ανταγωνίζεται τις λειτουργίες της αρρεστίνης

μπλοκάροντας την αλληλεπίδραση της GRK2 με το Gβγ σύμπλοκο [Wang et al., 2005]. Τέλος, επειδή μ οπιοειδείς υποδοχείς μοιράζονται πολλά από τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια με αυτά των α2-υποδοχέων (και οι δύο είναι G_i συνδεδεμένοι) είναι πολύ πιθανό η spinophilin να παίζει ρόλο σε μεταβίβαση σήματος από MOR και στην απευαισθητοποίηση του και εν κατακλείδι σε εθισμό από οπιοειδή [Charlton J et al., 2008].

Απαλοιφή του γονιδίου της spinophilin προκαλεί μειωμένα αναλγητικά αποτελέσματα σε οξεία χορήγηση μορφίνης αλλά ενισχυμένες προσαρμογές σε επαναλαμβανόμενη έκθεση στη μορφίνη συμπεριλαμβανομένου της αυξημένης εξάρτησης από μορφίνη, place condition, locomotor sensitization και αναλγητική ανοχή. Παρατηρήθηκε ότι ποντίκια που απουσίαζε το γονίδιο της spinophilin γίνονται ανθεκτικά στη μορφίνη από την πρώτη δόση. Σε κυτταρικό επίπεδο η spinophilin αλληλεπιδρά με το μ υποδοχέα των οπιοειδών στο ραβδωτό και ρυθμίζει τη σηματοδότησή του καθώς και την ενδοκύττωσή του [Charlton et al., 2008].

Η ανάπτυξη εξάρτησης και ανθεκτικότητας στα αναλγητικά φάρμακα όπως προείπαμε είναι ο μεγαλύτερος περιοριστικός παράγοντας στην θεραπεία του χρόνιου άλγους με οπιοειδή. Φαίνεται ότι η spinophilin έχει έναν ουσιώδη ρόλο στην ρύθμιση της απόκρισης μ οπιοειδών (MOR) και είναι πιθανό να ευθύνεται για τις προσαρμοστικές αλλαγές που σχετίζονται με τον εθισμό σε οπιοειδή. Συνεπώς, ίσως η spinophilin να εξυπηρετεί ένα νέο στόχο για θεραπεία της εξάρτησης από τα οπιοειδή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

❖ Βακτηριακές Μέθοδοι

2.1 Δημιουργία βακτηρίων μετασχηματισμού (competent cells)

Υλικά:

Tryptone (Sigma), Yeast extract (Scharlau), NaCL (Sigma)

Διαλύματα:

i) Διάλυμα 2XYT: 10gr bacto-tryptone, 5gr bacto-yeast extract, 2gr NaCl για 1lt θρεπτικού

ii) Διάλυμα LB Broth (1L): 10gr Tryptone, 5gr yeast extract, 10gr NaCl, απεσταγμένο

iii) LB-PEG διάλυμα: 36ml γλυκερόλης, 12 gr PEG 8000, 1.2ml 1M MgSO₄, 60ml LB

Μεμονωμένα κύτταρα ελήφθησαν από απόθεμα βακτηριακών κυττάρων DH5a και επώστηκαν σε 3ml θρεπτικό 2XYT, υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για ~16 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια των 3 ml μεταφέρθηκε φιάσκα που περιείχε 100ml θρεπτικού 2XYT και επώστηκε υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C. Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν στη mid log phase (O.D.600 = 0.5). Έπειτα η φιάσκα τοποθετήθηκε σε πάγο για 10 λεπτά. Η καλλιέργεια αφού χωρίστηκε σε δύο σωληνάρια, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για δεκαπέντε λεπτά στους τέσσερις βαθμούς Κελσίου. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε προσεχτικά σε μισό ml κρύου LB. Τέλος προστέθηκαν 2.5 ml LB-PEG διαλύματος. Τα βακτήρια χωρίστηκαν σε ποσότητες των 200μl και φυλάχθηκαν στους -80 βαθμούς Κελσίου.

2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH5A της E. coli (transformation)

Υλικά:

Tryptone, NaCL, Agar, Αμπικιλίνη (Sigma),

Yeast extract (Scharlau)

Διαλύματα:

Διάλυμα 2XYT: 10gr bacto-tryptone, 5gr bacto-yeast extract, 2gr NaCl για 1lt θρεπτικού

2XYT-άγαρ:

Σε σωληνάριο erpendorf χωρητικότητας 1.5ml αναμείχθηκαν 100μl βακτηρίων με 5 ή 10μl πλασμιδίου. Το μείγμα αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια τα βακτήρια υπέστησαν θερμικό σοκ στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου 2XYT και επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Για τη ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών, μέρος της καλλιέργειας (100μl) απλώθηκε σε τριβλίο 2XYT-άγαρ με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation)

Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφία σε στήλη Qiagen-tip 500 χρησιμοποιώντας το σύστημα Qiagen Plasmid Maxi Kit με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm ενώ η ποιότητά του εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιήθηκε για τα πλασμίδια RGS9-2-GFP, Gβ5, HA-MOR, RGS4 και RGSz.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Διαλύματα:

50X TAE: 2M Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1X TAE.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Η PCR εφαρμόστηκε για την εξακρίβωση των spinorphilin +/- και +/- ζώων. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε αντιπαρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

ddH2O	11.25 μ l
Betaine	5 μ l
10x Buffer (w/o MgCl)	2.5 μ l
25mM MgCl	1.25 μ l
2mM dNTPs	2.5 μ l
P1 (SPBF)	0.5 μ l
P2 (SPBR)	0.5 μ l
P3 (Neo3)	0.5 μ l
Taq	0.5 μ l
DNA	0.5 μ l

Πίνακας 1: Υλικά PCR προγράμματος για ταυτοποίηση spinorphilin ζώων.

PCR PROGRAM:		
Step 1	94oC	5min
Step 2	94oC	30sec
Step 3	62oC	30sec
Step4	72oC	1min
Step5	Go to step 2	30x
Step6	72oC	7min
Step7	4oC	for ever

Πίνακας 2: Πρόγραμμα PCR για ταυτοποίηση spinorphilin ζώων.

❖ Κυτταρικές σειρές

Υλικά:

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

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

Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (P/S): (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Τρυψίνης-EDTA: (Gibco)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή (Neubauer)

Κλίβανος επώασης Forma (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

DMSO (Sigma, USA)

Trypan Blue χρωστική (Seromed Biochrom, Germany).

α) **HEK 293** (human embryonic kidney cells) είναι η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό του υποδοχέα στο κύτταρο κατόπιν ενεργοποίησής του. Κρίθηκε κατάλληλη γιατί προσδίδει μεγάλο ποσοστό διαμόλυνσης και επειδή η παρακολούθηση του HA-Mu υποδοχέα που εισήχθη ήταν ακριβής καθώς δεν επηρεαζόταν από ενδογενή έκφραση. Το θρεπτικό στο οποίο καλλιεργήθηκαν τα HEK 293 αποτελείται από: DMEM, 20% FBS, 1% P/S.

β) **MEFs** (mouse embryonic fibroblasts) είναι οι πρωτογενείς σειρές που απομονώθηκαν, εξετάστηκαν και συνεισέφεραν στην in vivo σημασία της εργασίας. Τα κύτταρα απομονώθηκαν από έμβρυα 14 ημερών από spinophilin αγρίου τύπου ζώα, είτε από ζώα τα οποία δεν εκφράζουν την spinophilin. Το θρεπτικό στο οποίο καλλιεργήθηκαν τα MEFs αποτελείται από: DMEM, 20% FBS, 1% P/S.

Προκειμένου να μεταφερθούν τα κύτταρα σε κατάλληλες πλάκες για το σκοπό κάθε μελέτης, αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες (75cm²) οποίες καλλιεργούνται μετά από επώαση με διάλυμα τρυψίνης-EDTA για 3 λεπτά στους 37°C. Η τρυψίνη αδρανοποιήθηκε με ίσο όγκο θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.6 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Υλικά:

DMEM, Optimem (Gibco)

Λιποφεκταμίνη 2000, Λιποφεκταμίνη (Invitrogen), transPEI

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή DNA κατασκευών σε καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων, αφορά τη χρήση λιποφεκταμίνης, λιποφεκταμίνης 2000 και το αντιδραστήριο TransPEI.

Η λιποφεκταμίνη δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA, απορροφάται άμεσα από την κυτταρική μεμβράνη. Η χρήση της εγγυάται μεγάλο ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων με μειωμένα ποσοστά τοξικότητας. Η λιποφεκταμίνη χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των HEK κυττάρων, ενώ η λιποφεκταμίνη 2000 για τη διαμόλυνση των MEF. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε και στις δύο περιπτώσεις είναι ίδια με μοναδική διαφορά το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή των δειγμάτων. Στη πρώτη περίπτωση είναι DMEM, ενώ στη δεύτερη είναι Optimem. Τουλάχιστον μισή ώρα πριν την εισαγωγή των DNA κατασκευών, αντικαθίσταται το θρεπτικό των κυττάρων που έχουν ήδη τοποθετηθεί πριν από 16 ώρες σε συγκέντρωση 10.000/ml σε πλάκες των 12 οπών. Και στις δύο περιπτώσεις από το θρεπτικό απουσιάζει ο ορός και τα αντιβιοτικά. Συνολικά 2μg πλασμιδιακού DNA τοποθετείται σε 100μl θρεπτικού σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Σε αντίστοιχο αριθμό σωληνάρων τοποθετούνται από 4μl λιποφεκταμίνης σε 100μl θρεπτικού. Πέντε λεπτά αφότου έχει εναποτεθεί η λιποφεκταμίνη, μεταφέρεται το θρεπτικό στο οποίο έχει προστεθεί, στο αντίστοιχο erpendorf που περιέχει την κατασκευή DNA. Ακολουθεί ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια από την κάθε κυψελίδα της πλάκας αφαιρούνται 200μl θρεπτικού, τα οποία και συμπληρώνονται με τα 200μl μίγματος DNA-λιποφεκταμίνης.

Το TransPEI είναι ένα γραμμικό πολυεθελενιμινικό (polyethelenimine) παράγωγο. Δένεται σφικτά στο DNA σχηματίζοντας μικρά σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά εσωτερικοποιούνται μέσα στα κύτταρα μέσω ενδοκύττωσης και μπορεί να τοποθετηθεί και στον πυρήνα ως ξεχωριστή δομή. Κάθε τρίτο άτομο του μορίου είναι ένα πρωτονιομένο αμινοξύ αζώτου, που μετατρέπει το TransPEI έναν αποτελεσματικό συλλέκτη πρωτονίων. Ως συλλέκτης πρωτονίων, το TransPEI επιδρά με το όξινο pH του ενδοσώματος. Αυτό διευκολύνει τη διάρρηξη των ενδοσωμάτων και την απελευθέρωση του TransPEI/DNA συμπλόκου στο κυτταρόπλασμα πριν συμβεί λυσοσωμική αποδιάταξη του DNA. Συνολικά 2μg

πλασμιδιακού DNA τοποθετείται σε 50μl 150mM NaCl σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Σε αντίστοιχο αριθμό σωληνάρων τοποθετούνται από 4μl λιποφεκταμίνης σε 50μl 150mM NaCl. Ανακατεύουμε μαλακά. Προσθέτουμε τα 50μl του TransPEI διαλύματος στα 50μl από το διάλυμα που περιέχει το DNA. Ανακατεύουμε μαλακά. Αφήνουμε τα δείγματα για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέσα στον επωαστήρα για 30min. Προσθέτουμε τα 100μl TransPEI/DNA μείγματος σταγόνα-σταγόνα στο θρεπτικό που βρίσκονται τα κύτταρα και ανακινούμε ελαφρά το πιάτο.

Τα κύτταρα επώάζονται σε κλίβανο σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂ για 18 ώρες. Τέλος το θρεπτικό τους αντικαθίσταται από DMEM με 10% FBS στην περίπτωση των HEK κυτταρικών σειρών ή με 20% FBS στην περίπτωση των MEF.

2.7 Ανοσοφθορισμός

Υλικά

Αντι-HA mouse μονοκλωνικό αντίσωμα (1:1000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

Cy3 conjugated donkey anti-mouse δεύτερο αντίσωμα (1:500, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA)

Aquamount (Lerner Laboratories)

cold water fish gelatin (Sigma)

saponin (Fluca)

Na Azide (Sigma)

Διαλύματα

Διάλυμα IMF/saponin σε PBS: 0.25% cold water fish gelatin, 0.04% saponin, 0.01% Na Azide

HEK-293T κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες σε DMEM με 10% FBS πάνω σε καλυπτρίδες καλυμμένες με πολυλυσίνη σε πλάκες των 12 οπών. Ακολούθησε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη χρήση λιποφεκταμίνης και επώαση για 18 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε η χορήγηση 5μmol/L DAMGO, 10μmol/L μορφίνη και φυσιολογικού ορού (ομάδα ελέγχου) σε χρονικά διαστήματα τα οποία είχαν προαποφασισθεί σύμφωνα με τη δράση του κάθε οπιοειδούς. Επακολούθησε μονιμοποίηση

των κυττάρων κατά την επώαση τους με 10% φορμαλδεΐδης αραιωμένης σε 1X PBS. Έπειτα τα δείγματα επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα IMF/saroinin προκειμένου να διανοιχτούν οπές στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να γίνει δυνατή η είσοδος του αντισώματος, αλλά και να αποφευχθεί η δέσμευση του σε μη ειδικές θέσεις. Ακολούθησε πλύση με 1X PBS. 60μl αραιωμένου πρώτου αντισώματος σε διάλυμα IMF/saroinin τοποθετήθηκαν σε κάθε καλυπτρίδα και ακολούθησε επώαση για 45 λεπτά. Τα δείγματα πλύθηκαν 3 φορές με 1X PBS και επώαστηκαν δεύτερο αντίσωμα για 20 λεπτά. Μετά από 3 ακόμη πλύσεις με 1X PBS, οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού πρωτίστως προστέθηκαν 5μl Aquamount. Τα δείγματα εκτιμήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (TCS-NT Laser Scanning microscope, Leica) με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού HCX PL APO 60x/1.25.

❖ Βιοχημικές μέθοδοι

2.8 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική μέθοδος Lowry (Lowry *et al.*, 1951) σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια της εταιρίας BioRad.

2.9 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης

Υλικά:

Κόκκοι πρωτεΐνης agarose G (Roche, Mannheim, Germany)

Aprotinin A 1153 10mg/ml (Sigma)

Sodium orthovanate Na₃VO₄ (Sigma)

Coctail inhibitors P8340 (Sigma)

Διάλυμα λύσης:

50mmol/L Tris pH 7.5, 15mmol/L NaCl, 0.1%Triton X-100, 1mmol/L EDTA pH 8, 1 μg/mL Aprotinin, 1 μg/mL leupeptin, 1 μg/mL pepstatin, 0.1mmol/L Sodium orthovanate

Τα δείγματα που προέρχονται από κυτταρικές σειρές θηλαστικών σε καλλιέργεια είτε από περιοχές του εγκεφάλου επίμυων, επώαστηκαν με 20 μl κόκκους πρωτεΐνης agarose G σε περιστρεφόμενη βάση στους 4°C για 1 ώρα. Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4°C με το επιθυμητό αντίσωμα σε περιστρεφόμενη βάση και επώαση με πρωτεΐνη agarose G. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με το διάλυμα λύσης και αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις. Τέλος μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, ακολουθεί ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western.

2.10 Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Υλικά:

lawry sulfate (SDS), Tris, Ammonium persulfate, Γλυκερόλη, bromophenol blue (Sigma) bis acrylamide, kaleidoscope marker, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, wattman paper (Biorad) beta-mercaptoethanol (Fluka), Methanol (Scahrlau), Tween (Sigma), Σύστημα χημειοφωταύγιας ECL (Pierce), 10X PBS (Gibco), Ξηρό γάλα (Regilait).

Διαλύματα:

1. Αποδιατακτικό διάλυμα μετουσίωσης 3x (Sample buffer 3x) 50ml:

3gr SDS, 15ml γλυκερόλης, 15ml 0.5M Tris, 0.15gr κυανού της βρωμοφανόλης(pH 6,8)

Working concentration: 450μl 3x αποδιατακτικού διαλύματος, 50μl β-μερκαπτοαιθανόλης

2. Διάλυμα διαχωρισμού 500 ml (pH 8.9):

Tris 90gr, SDS 2gr

3. Διάλυμα επιστοίβαξης 500 ml (pH 6.8):

Tris 15,15gr, SDS 1gr

4. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x 500ml (pH 8.3):

Tris 15gr, Γλυκίνη 71gr, SDS 5gr

Working concentration: 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης, 900ml απεσταγμένου νερού

5. Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών 10x 500ml (pH 8.3):

Tris 15gr, Γλυκίνη 71gr, SDS 0.5gr

Working concentration: 100ml διαλύματος μεταφοράς πρωτεϊνών, 200ml μεθανόλης, 700ml απεσταγμένου νερού.

7. Διάλυμα PBS-T 1X 500ml (pH 7.6)

50ml 10X PBS, 500μl Tween

8. Διάλυμα γάλακτος 3% σε 1X PBS-Tween

50ml 1X PBS-T, 1.5 gr γάλακτος

Αντισώματα:

i) HRP-conjugated anti-rabbit antibody (Sigma, Germany), HRP-conjugated anti-mouse antibody (Sigma, Germany)

ii) Rabbit protein A-purified anti-RGS9-antibody (1:10,000) δημιουργήθηκε από τον Stephen Gold (UT Southwestern Medical center, Dallas, TX)

iii) Rabbit anti-spinophilin (1:1.000 dilution) Allen et al., 1997

iv) Rabbit anti-RGS4 antibody (1:1.000 dilution) S.Mumby, UT Southwestern Medical Center

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αφού ποσοτικοποιηθούν με αντιδραστήριο Lowry ,αναμειγνύονται με 3x SDS loading buffer και αφήνονται για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 100ο C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα SDS – ακρυλαμίδης. Το πήκτωμα μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ίσου μεγέθους μεταφέρεται σε ειδική συσκευή μεταφοράς με την ηλεκτροφόρηση της οποίας επιτυγχάνεται η μεταφορά και υβριδοποίηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Η μεμβράνη μετά την ηλεκτροφόρηση αφήνεται σε διάλυμα TBST με 3% γάλα για 1 ώρα για να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα της μεμβράνης με διάλυμα TBST και η επώαση με το πρώτο αντίσωμα για όλο το βράδυ σε διάλυμα 1.5% γάλα /TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με διάλυμα TBST και επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε 1.5% γάλα /TBST. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με διάλυμα TBST και η μεμβράνη επωάζεται για 2 λεπτά με αντιδραστήριο ECL. Τέλος η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ. Η ένταση της

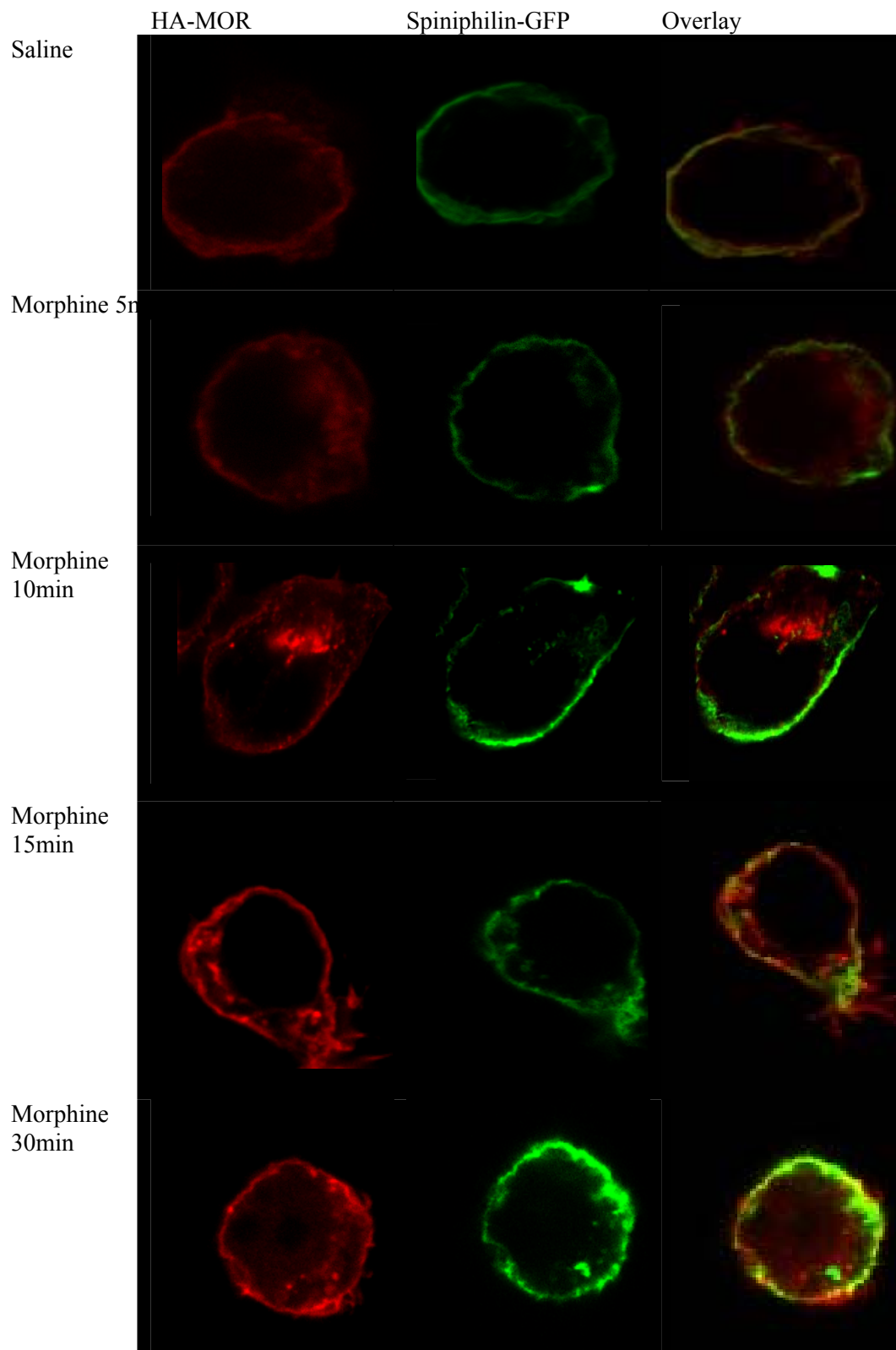
κάθε ζώνης είναι ανάλογη της ποσότητας της συγκεκριμένης κάθε φορά πρωτεΐνης και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος Molecular Analyst Software (BioRad, Palo Alto, CA, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη ενδοκύττωσης HA-MOR υποδοχέα σε σύγκριση με Spinophilin-GFP σε κυτταρικές σειρές HEK293T.

Για την κατανόηση της ενδοκύττωσης του υποδοχέα σε σύγκριση με την κίνηση της πρωτεΐνης spinophilin κατόπιν διέγερσης του υποδοχέα των οπιοειδών (MOR) με μορφίνη πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού. Καλυπτρίδες που είχαν αρχικά επωαστεί με poly-L-lysine επιστρώθηκαν HEK293T κύτταρα πυκνότητας 90%. Τα κύτταρα μετά από 12 ώρες επιμολύνθηκαν με 1μg spinophilin GFP και με 1μg HA-MOR. Την επόμενη μέρα οι αντίστοιχοι υποδοχείς των κυττάρων διεγέρθηκαν είτε με saline, είτε με μορφίνη (100μM), σε χρονικές στιγμές από 5min-30min. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανοσοφθορισμός ως προς τον HA επίτοπο. Ο συνεντοπισμός του υποδοχέα MOR (κόκκινο χρώμα) με την spinophilin (πράσινο χρώμα) παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο σε βθάρη φακό.

Συμπεραίνουμε ότι, στην βασική κατάσταση (saline) η spinophilin συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Μετά από 10min χορήγησης μορφίνης ο υποδοχέας αρχίζει και ενδοκυττώνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου με μέγιστη κορύφωση τα 30min. Στα 30min ο υποδοχέας παραμένει ενδοκυττωμένος. Η spinophilin φεύγει και αυτή από την κυτταρική μεμβράνη μετά από τα 10min χορήγησης μορφίνης και οδεύει προς το εσωτερικό του αλλά δεν συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν πάνω από τρεις φορές και κάθε φορά είχαμε το ίδιο αποτέλεσμα(Πίνακας 3).

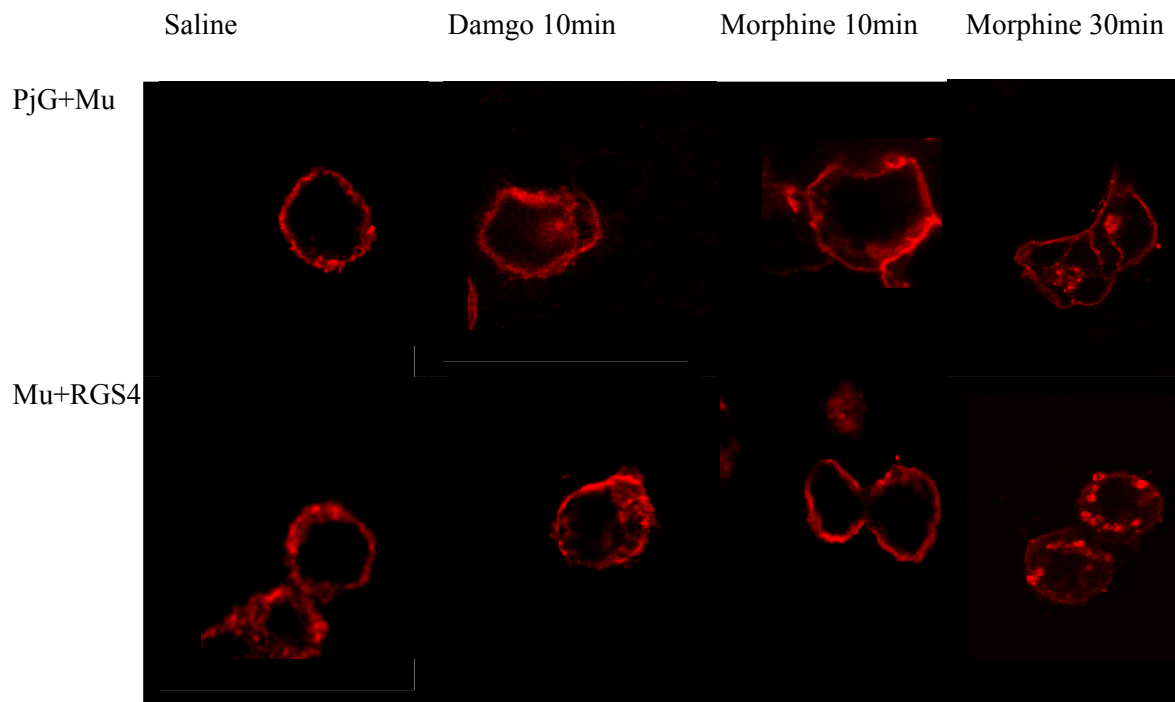


Πίνακας 3: Μελέτη ενδοκύττωσης HA-MOR υποδοχέα σε σύγκριση με Spinophilin-GFP σε κυτταρικές σειρές HEK293T κατόπιν διέγερσης υποδοχέα με Μορφίνη σε διάφορες χρονικές στιγμές.

3.2 Μελέτη επηρεασμού ενδοκύττωσης του υποδοχέα MOR από τις RGS4 και RGSz πρωτεΐνες.

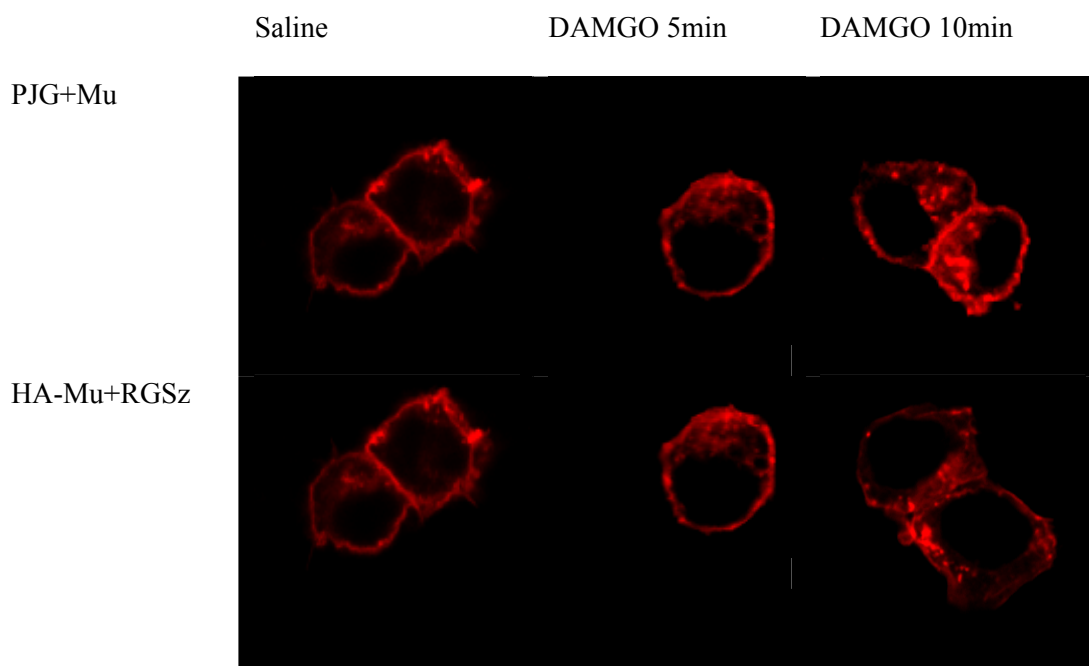
Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη RGS9-2 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στη δράση του MOR υποδοχέα [Psifogeorgou et al., 2007]. Αντίστοιχα θέλουμε να μελετήσουμε αν και οι πρωτεΐνες RGS4 και RGSz παίζουν κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της ενδοκύττωσης του υποδοχέα. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές σειρές HEK293T.

HEK293T πυκνότητας 90% επιμολύνθηκαν με 1μg HA-MOR και 1μg RGS4. Ως αρνητικό control κύτταρα επιμολύνθηκαν με PJG φορέα χωρίς ένθεμα και με HA-MOR. Η επιμόλυνση έγινε με τη βοήθεια της λιποφεκταμίνης. Την επόμενη μέρα ο υποδοχέας των οπιοειδών διεγέρθηκε είτε με saline είτε με μορφίνη (100μM) για χρονικές στιγμές 10min και 30min είτε με το πεπτίδιο DAMGO (5μM) για 10min. Το Damgo είναι ένα φυσικό παράγωγο της εγκεφαλίνης η οποία επάγει την ενδοκύττωση του MOR (Li H et al., 2002). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε 10% φορμαλδεύδη και ακολούθησε ανοσοφθορισμός για τον HA επίτοπο. Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε Cy3. Η ενδοκύττωση του υποδοχέα παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Στη βασική κατάσταση (saline), ο υποδοχέας είναι τοποθετημένος την μεμβράνη τόσο παρουσία όσο και απουσία της RGS4 πρωτεΐνης. Μετά από χορήγηση DAMGO για 10min ο υποδοχέας ενδοκυττώνεται με τον ίδιο ρυθμό τόσο παρουσία όσο και απουσία RGS4 πρωτεΐνης. Ίδια συμπεριφορά παρατηρείτε κατόπιν χορήγησης μορφίνης για 10min και 30min. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η ενδοκύττωση του υποδοχέα MOR δεν επηρεάζεται από την RGS4 πρωτεΐνη (Πίνακας 4).



Πίνακας 4: Μελέτη επηρεασμού ρυθμού ενδοκύττωσης MOR από την RGS4 πρωτεΐνη.

Με αντίστοιχο τρόπο μελετήθηκε και η δράση της RGSz πρωτεΐνης στον υποδοχέα. Ο υποδοχέας διεγέρθηκε μόνο με DAMGO για 5min και 10min. Ο ρυθμός ενδοκύττωσης του υποδοχέα MOR δεν επηρεάζεται παρουσία ή απουσία της RGSz πρωτεΐνης. Συνεπώς ούτε η RGS4 ούτε η RGSz φαίνεται να επηρεάζουν την ενδοκύττωση του MOR υποδοχέα κατόπιν χορήγησης αγωνιστών (Πίνακας 5).

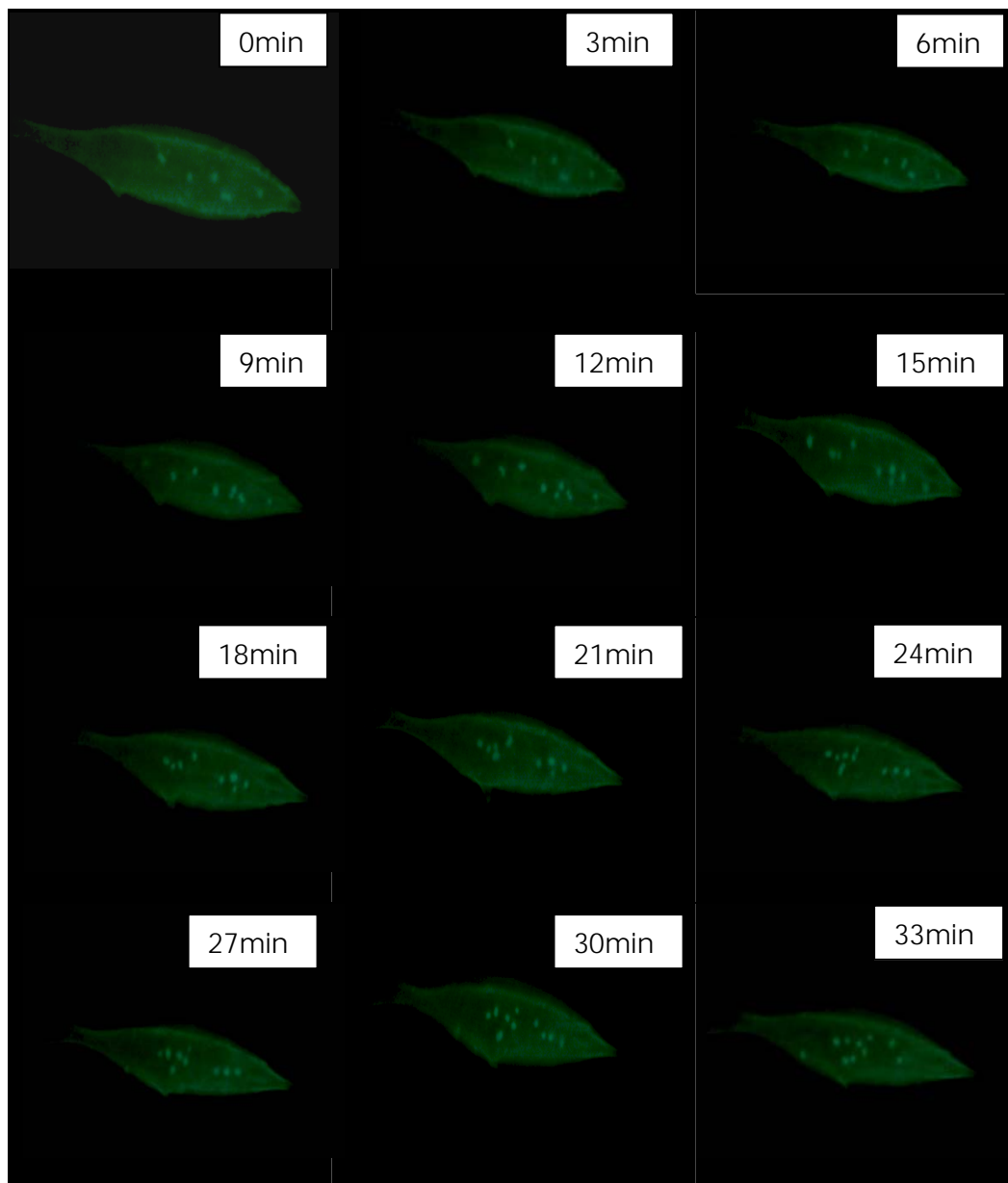


Πίνακας 5: Μελέτη επηρεασμού ρυθμού ενδοκύττωσης MOR από την RGSz πρωτεΐνη.

3.3 Παρατήρηση θέσης spinophilin σε ζωντανά κύτταρα κατόπιν διέγερσης υποδοχέων (live imagine).

Σύμφωνα με τα πειράματα συνεντοπισμού spinophilin-MOR καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι και η spinophilin ενδοκυττώνεται στο εσωτερικό του κυττάρου ανεξάρτητα από τον υποδοχέα κατόπιν διέγερσης με μορφίνη. Ενδιαφέρον λοιπόν παρουσιάζει η παρακολούθηση της κίνησης της πρωτεΐνης spinophilin σε πραγματικό χρόνο σε ζωντανά κύτταρα. Αυτό θα βοηθήσει τόσο στην πιστοποίηση του χρόνου έναρξης της ενδοκύττωσής της όσο και της καλύτερης κατανόησης του μηχανισμού δράσης.

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) που απομονώθηκαν από spinophilin ζώα αγρίου τύπου (wilt type, wt) την εμβρυϊκή ημέρα 16 (E16). Τα MEF spinophilin wt κύτταρα στρώθηκαν σε ειδικό πιατάκι σε περιεκτικότητα 55-60%. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με 2μg spinophilin-GFP πλασμίδιο. Η επιμόλυνση έγινε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου TransPEI. Την επόμενη μέρα προστέθηκε μορφίνη (100μM) και ανά 3min καταγραφόταν η κίνηση της spinophilin σε ανάστροφο μικροσκόπιο (inverted microscope). Συμπεραίνουμε ότι η έναρξη της κίνησης της spinophilin ξεκινάει 12min μετά τη χορήγηση της μορφίνης. Η spinophilin μετακινείται προς το κυτταρόπλασμα. Όταν η spinophilin βρίσκεται στην κανονική της θέση , κοντά στη μεμβράνη του κυττάρου, και μέχρι τα 12min μετά τη χορήγηση της μορφίνης, η πλασματική μεμβράνη φαίνεται λεία και ευθύγραμμη. Με την έναρξη της ενδοκύττωσης παρατηρείται μια μικρή ανακατανομή στην περιοχή αυτή με αποτέλεσμα η πλασματική μεμβράνη να χάνει την λεία επιφάνεια της και να γίνεται αδρή. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αδρές επιφάνειες παρατηρούνται σε συγκεκριμένες περιοχές και όχι κατά μήκος όλου του κυττάρου (Πίνακας 6).



Πίνακας 6: Παρατήρηση ενδοκύττωσης spinophilin-GFP σε πραγματικό χρόνο (live imagine).

3.4 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για εύρεση αλληλεπίδρασης spinophilin με RGS πρωτεΐνες.

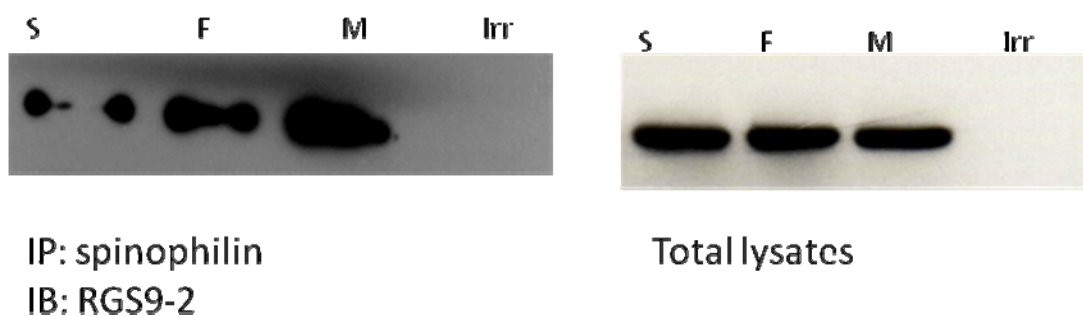
Σημαντικός στόχος είναι ανίχνευση των σηματοδοτικών μονοπατιών και συμπλόκων που σχηματίζονται κατόπιν διέγερσης υποδοχείς οπιοειδών. Όπως προαναφέραμε η δενδριτική πρωτεΐνη spinophilin παίζει και αυτή ουσιαστικό ρόλο στο έλεγχο της σηματοδότησης των οπιοειδών (και όχι μόνο) υποδοχέων. Πρόσφατες μελέτες φανέρωσαν ότι σε κυτταρικό επίπεδο η spinophilin αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των οπιοειδών, MOR, στο ραβδωτό (Charlton et al., 2008). Επίσης γνωρίζουμε ότι οι RGS πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάρκεια σηματοδότησης του υποδοχέα MOR και συγκεκριμένα η RGS9-2 είναι αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του υποδοχέα MOR [Psifogeorgou et al., 2007]. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης προσπαθήσαμε να εξετάσουμε ποιες RGS πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την spinophilin και κατά πόσο η χορήγηση διαφορετικών αναλγητικών φαρμάκων, μορφίνης και φαιντανύλης επηρεάζει το σχηματισμό αυτού του συμπλόκου.

Οι περισσότερες εξαρτησιογόνες ουσίες επιδρούν είτε έμμεσα είτε άμεσα σε ένα σηματοδοτικό μονοπάτι στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Το μονοπάτι αυτό είναι το μεσολιμβικό σύστημα ανταμοιβής το οποίο εκτείνεται από το VTA ως τον επικλινή πυρήνα. Επομένως η μελέτη μας θα επικεντρωθεί στην περιοχή του ραβδωτού (πρόσθιο και κοιλιακό ραβδωτό ή επικλινή πυρήνας). Όλοι δηλαδή οι εγκεφαλικοί ιστοί που θα απομονωθούν από ποντίκια θα προέρχονται από την περιοχή του ραβδωτού. Οι RGS που εξετάστηκαν είναι οι RGS9-2, RGS4, RGSz, γιατί σε αυτές η έκφραση είναι πλούσια στην περιοχή του ραβδωτού.

Σε ζώα αγρίου τύπου χορηγείτο είτε φυσιολογικός ορός (saline) για τη μέτρηση φυσιολογικής κατάστασης ή φαιντανύλη ή μορφίνη για 30min. Από τα ζώα αυτά απομονωνόταν η περιοχή του ραβδωτού. Για την πιστοποίηση ότι η μπάντα που θα βλέπουμε θα οφείλεται στην ειδικότητα του spinophilin αντισώματος να αλληλεπιδρά με κάποιες RGS πρωτεΐνες, παράλληλα θα χρησιμοποιείτο ένα μη ειδικό αντίσωμα (π.χ. anti-flag). Συνεπώς, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίζονταν με πρώτο αντίσωμα για spinophilin.

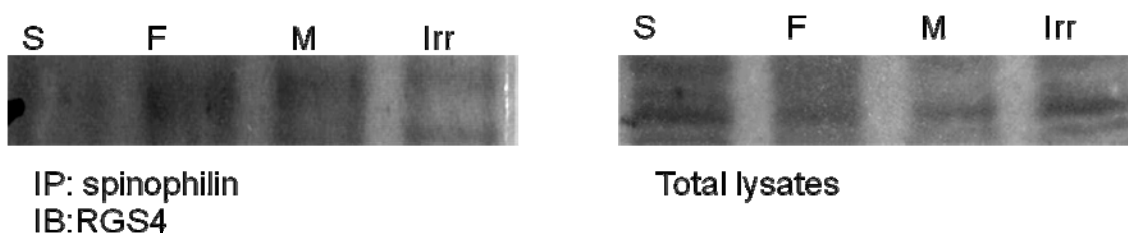
Συμπεραίνουμε ότι η RGS9-2 αλληλεπιδρά με την spinophilin στη βασική κατάσταση. Διέγερση του υποδοχέα των οπιοειδών με φαιντανύλη για 30min δεν επηρεάζει σημαντικά την ένταση του συμπλόκου spinophilin-RGS9-2. Κατόπιν όμως διέγερσης του υποδοχέα με μορφίνη παρατηρείται αύξηση στην ποσότητα της RGS9-2 που στρατολογείται από την

spinophilin. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι η μορφίνη παίζει ρόλο στην ενίσχυση του συμπλόκου spinophilin/RGS9 (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης για ανίχνευση αλληλεπίδρασης spinophilin με την RGS9-2 πρωτεΐνη στο ραβδωτό. Τα δείγματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα για spinophilin και με αντίσωμα για RGS9-2 ανιχνεύτηκε η αλληλεπίδραση τους. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και πήραμε το ίδιο αποτέλεσμα.

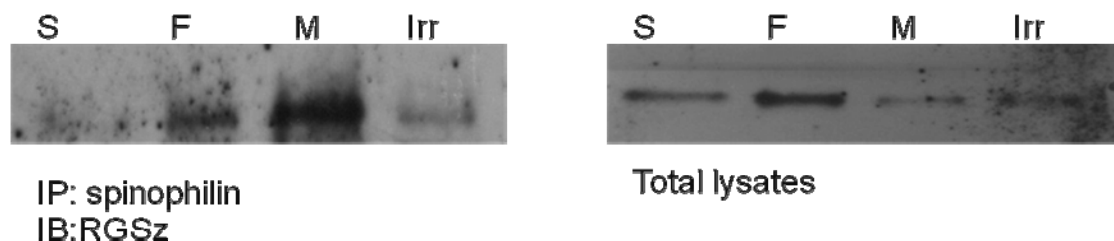
Επιπροσθέτως, η RGS4 φαίνεται ότι αλληλεπιδρά σε ελάχιστο βαθμό με την spinophilin στη βασική κατάσταση, saline. Διέγερση του υποδοχέα των οπιοειδών είτε με φαιτανύλη είτε με μορφίνη δεν εμφανίζει κάποια σημαντική αύξηση στα επίπεδα του συμπλόκου spinophilin/RGS4. Από τα παραπάνω ενισχύετε η υπόθεση ότι όταν η μορφίνη και η φαιτανύλη ασκούν τα αναλγητικά τους αποτελέσματα δεν στρατολογείται περισσότερη RGS4 πρωτεΐνη κοντά στον υποδοχέα. (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης για ανίχνευση αλληλεπίδρασης spinophilin με την RGS4 πρωτεΐνη στο ραβδωτό. Τα δείγματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα για spinophilin και με αντίσωμα για RGS4 ανιχνεύτηκε η αλληλεπίδραση τους. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και πήραμε το ίδιο αποτέλεσμα.

Τέλος, τα επίπεδα του συμπλόκου spinophilin/RGSz είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα στη βασική κατάσταση, saline. Διέγερση του υποδοχέα των οπιοειδών με φαιτανύλη και μορφίνη έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση περισσότερης RGSz πρωτεΐνης στην spinophilin. Πιθανώς η μορφίνη σε σύγκριση με τη φαιτανύλη να ενισχύει περισσότερο το

σχηματισμό συμπλόκου spinophilin-RGSz. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η RGSz δε αλληλεπιδρά με την spinophilin στην βασική κατάσταση γιατί πολύ πιθανόν να μη βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη. Διέγερση όμως του υποδοχέα με μορφίνη ή και φαιντανύλη ενισχύει τη δημιουργία συμπλόκου spinophilin-RGSz (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης για ανίχνευση αλληλεπίδρασης spinophilin με την RGSz πρωτεΐνη στο ραβδωτό. Τα δείγματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα για spinophilin και με αντίσωμα για RGS4 ανιχνεύτηκε η αλληλεπίδραση τους.

3.5 Πειράματα ανοσοϊστοχημείας για έλεγχο κυτταρικής θέσης της RGS9-2 πρωτεΐνης παρουσία και απουσία της πρωτεΐνης spinophilin.

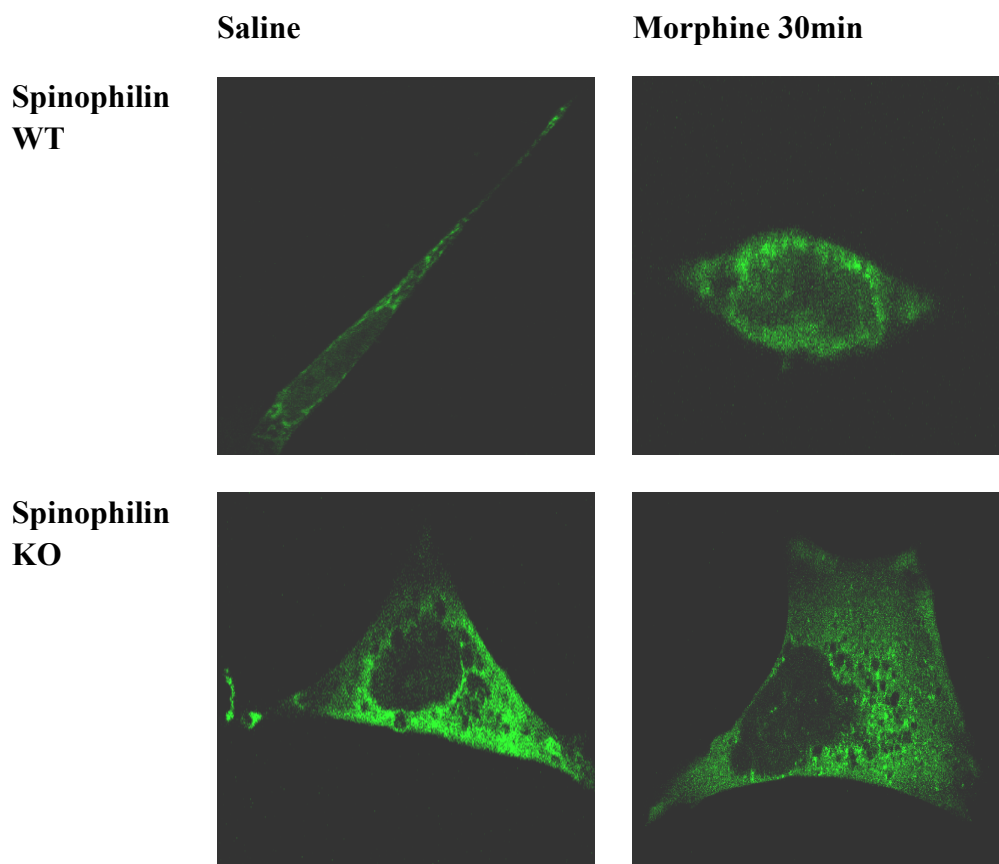
Προηγούμενες μελέτες φανέρωσαν ότι η RGS9-2 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από τον υποδοχέα καθώς και ότι η ποσότητα της RGS9-2 αυξάνεται στην κυτταρική μεμβράνη κατόπιν χορήγησης μορφίνης [Psifogeorgou et al., 2007]. Επίσης από τα δεδομένα ότι η spinophilin αλληλεπιδρά με τον MOR [Charlton et al., 2008] αλλά και με την RGS9-2 στη βασική κατάσταση (εικόνα 10) θελήσαμε να παρατηρήσουμε πιθανές αλλαγές που παρατηρούνται στην κυτταρική τοποθέτηση της RGS9-2 απουσία spinophilin τόσο στη βασική κατάσταση όσο και κατόπιν διέγερσης του υποδοχέα με μορφίνη.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν MEF κύτταρα από spinophilin ζώα αγρίου τύπου (spinophilin WT) και από ζώα που απουσίαζε το γονίδιο της spinophilin (spinophilin KO). Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε 12άρια πιάτα και οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με poly-L-lysine. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με πλασμίδια RGS9-2 –GFP και Gβ5. Η Gβ5 είναι απαραίτητη γιατί προσδίδει σταθερότητα στην RGS9-2 πρωτεΐνη. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σε 60άρη φακό.

Παρουσία spinophilin η RGS9-2 τοποθετείται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη στην βασική κατάσταση. Απουσία spinophilin παρατηρούμε ότι η RGS9-2 είναι διάχυτη στο

κυτταρόπλασμα και δε βρίσκεται συγκεντρωμένη κοντά στην κυτταρική μεμβράνη στη βασική κατάσταση. Κατόπιν διέγερσης του υποδοχέα με μορφίνη για 30min σε spinophilin WT κύτταρα παρατηρείτε αυξημένη συγκέντρωση της RGS9-2 κοντά στην κυτταρική μεμβράνη. Αντιθέτως, απουσία spinophilin, spinophilin KO κύτταρα και κατόπιν διέγερσης του υποδοχέα με μορφίνη η RGS9-2 παραμένει διάχυτη στο κυτταρόπλασμα.

Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η spinophilin όντας ως πρωτεΐνη σκαλωσιά εξυπηρετεί στην σωστή τοποθέτηση της RGS9-2 στην μεμβράνη (Πίνακας 7).



Πίνακας 7: έλεγχος κυτταρικής θέσης spinophilin σε MEF κυτταρικές σειρές παρουσία και απουσία του γονιδίου της spinophilin.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύεται η άποψη ότι η πρωτεΐνη spinophilin από μόνη της αλλά και σε συνεργασία με τις RGS πρωτεΐνες έχει καταλυτικό ρόλο στην ρύθμιση της απόκρισης των υποδοχέων των μ οπιοειδών (MOR). Με αυτή τη μελέτη δείξαμε ότι spinophilin έχει ρόλο σκαλωσίας στην κυτταρική μεμβράνη καθώς αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες και τις τοποθετεί στη σωστή κυτταρική τους θέση. Τέλος, η spinophilin είναι ένας επιπλέον ρυθμιστής των λειτουργιών του υποδοχέα MOR, ρυθμίζει άμεσα την απευαισθητοποίηση του και επηρεάζει τη δράση διαφόρων αναλγητικών φαρμάκων.

Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης φανέρωσαν ότι στη βασική κατάσταση στην περιοχή του ραβδωτού η spinophilin αλληλεπιδρά με τις RGS9-2 και λιγότερο με τις RGS4 και RGSz. Χορήγηση μορφίνης για 30min έχει ως αποτέλεσμα ενίσχυση των συμπλόκων spinophilin-RGS9-2 και spinophilin-RGSz. Προφανώς λοιπόν η spinophilin βρίσκεται εξ αρχής κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και ρόλος της είναι να φέρνει κοντά στον υποδοχέα πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ένταση της δράσης του κατόπιν διέγερσης.

Όσον αφορά την RGS9-2 αυτό ενισχύεται και από προηγούμενες μελέτες που φανερώνουν ότι η RGS9-2 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των αποτελεσμάτων της μορφίνης [Zachariou et al., 2003] και η RGS9-2 κατόπιν διέγερσης του υποδοχέα με μορφίνη ρυθμίζει αρνητικά τις λειτουργίες του υποδοχέα MOR (Psifogeorgou et al., 2007).

Επιπλέον, με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε MEF κυτταρικές σειρές που είτε έφεραν το γονίδιο της spinophilin είτε το γονίδιο είχε απαλείφει φανέρωσαν ότι η RGS9-2 απουσία spinophilin χάνει τη σωστή κυτταρική της τοποθέτηση. Σε κύτταρα αγρίου τύπου για το γονίδιο της spinophilin στη βασική κατάσταση η RGS9-2 βρίσκεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη. Διέγερση του υποδοχέα με μορφίνη για 30min παρατηρείται αύξηση της RGS9-2 στην κυτταρική μεμβράνη. Σε κύτταρα όμως που το γονίδιο της spinophilin απουσιάζει στη βασική κατάσταση η RGS9-2 δεν εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη αλλά είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Η χορήγηση μορφίνης για 30min σε spinophilin KO MEF κύτταρα δε σημειώνει κάποια αξιόλογη μεταβολή στα επίπεδα της RGS9-2 η οποία παραμένει διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Αυτό αποδίδει στην spinophilin έναν καίριο ρόλο στην μεσολάβηση και στην ενορχήστρωση της απαραίτητης πλαστικότητας για την σηματοδοτική μεταβίβασης.

Η χρήση μορφίνης για θεραπεία του χρόνιου πόνου εμποδίζεται από την γρήγορη ανάπτυξη ανοχής στον πόνο. Αρχικά θεωρείτο ότι η ανοχή είναι αποτέλεσμα του ρυθμού ενδοκύττωσης του υποδοχέα. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρυθμός ενδοκύττωσης του MOR είναι κρίσιμος παράγοντας ελέγχου της ανάπτυξης της αναλγητικής ανοχής [Keith et al., 1988, Histler et al., 1988, 1999] με μειωμένη ενδοκύττωση να σχετίζεται με αυξημένη ανοχή. Όμως η δουλειά των He L. και των συνεργατών του φανέρωσαν ότι διευκολύνοντας την ενδοκύττωση του MOR η ανάπτυξη ανοχής μειώνεται [He et al., 2002]. Οι πιο πρόσφατες όμως μελέτες αποδεικνύουν ότι η ανοχή που αναπτύσσεται μετά τη χρόνια χορήγηση μορφίνης έχει αποδοθεί είτε στη μη επαρκή απευαισθητοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων, είτε στην ικανότητα της μορφίνης να ακινητοποιεί έναν ενεργό υποδοχέα αποφεύγοντας την ενδοκύττωσή του.

Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε HEK293 κυτταρικές σειρές παρατηρήσαμε ότι στη βασική κατάσταση η spinophilin συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα MOR. Διέγερση του με μορφίνη προκαλείτε ενδοκύττωση η οποία ξεκινάει 10min περίπου μετά τη χορήγηση του αγωνιστή. Με την ενδοκύττωση του υποδοχέα ξεκινάει και η ενδοκύττωση της spinophilin η οποία όμως δεν συνεντοπίζεται μαζί με τον MOR στο εσωτερικό του κυττάρου. Μετά από 30min χορήγησης μορφίνης ο υποδοχέας MOR παραμένει ενδοκυττωμένος. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν την σημασία της spinophilin στην εσωτερικοποίηση του υποδοχέα. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η spinophilin διευκολύνει την ενδοκύττωση του ενεργοποιημένου από μορφίνη υποδοχέα παραμένει άλυτο θέμα. Παρόλα αυτά η εσωτερικοποίηση του MOR παρουσία spinophilin συνάδει με τα αποτελέσματα από παλαιότερα συμπεριφορικά πειράματα [Charlton et al., 2008]: η spinophilin είναι απαραίτητη για την πρόληψη της ανοχής μέσω ανακύκλωσης του MOR και ξεκάθαρα η spinophilin παίζει ρόλο στο trafficking.

Το γεγονός ότι κατόπιν διέγερσης και ο υποδοχέας και η spinophilin καταλήγουν σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα μένει να διερευνηθεί ακόμα. Ίσως η spinophilin στο κυτταρόπλασμα να ενεργοποιεί άλλες πρωτεΐνες και να ενισχύει κατά αυτόν τον τρόπο το σηματοδοτικό μονοπάτι του MOR υποδοχέα. Πιθανή είναι και η δράση της spinophilin και στον πυρήνα του κυττάρου.

Με πειράματα ζωντανής παρατήρησης της ενδοκύττωσης της spinophilin πιστοποιήθηκε ότι όντως αυτή εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου μετά από διέγερση με μορφίνη κοντά σε σχηματισμούς που μοιάζουν με κυστίδια κλαθρίνης.

Η πρωτεΐνη spinophilin σε συνεργασία με τις RGS πρωτεΐνες φανερά παίζουν ρόλο στην ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που διεγείρονται από υποδοχείς οπιοειδών. Αυτά τα ποικίλα αποτελέσματα της spinophilin μπορεί να προκύψουν όχι μόνο από τη μεγάλη κατανομή της στον εγκέφαλο αλλά και από τις πολλαπλές τις δράσεις σε κυτταρικό επίπεδο. Στόχος των παραπάνω πειραμάτων ήταν η κατανόηση αυτών των μονοπατιών και πως αυτά τα μονοπάτια τροποποιούνται ύστερα από χορήγηση αναλγητικών φαρμάκων. Κατά αυτόν τον τρόπο θα μπορέσουμε να συνθέσουμε νέα αναλγητικά φάρμακα με μέγιστο αποτέλεσμα και ελάχιστες παρενέργειες. Θεωρούμε ότι τα νέα πιθανά αναλγητικά φάρμακα θα στοχεύουν κυρίως το σύμπλοκο RGS spinophilin αλλάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη διάρκεια και την ένταση της σηματοδότησης από τον υποδοχέα. Το μεγαλύτερο όμως επίτευγμα που μπορεί να επιφέρει αυτή η ανίχνευση είναι η αποτελεσματικότερη συγχορήγηση των ήδη υπάρχοντων φαρμάκων για την εξασφάλιση μεγαλύτερου αναλγητικού αποτελέσματος με μικρότερες παρενέργειες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen P. B. et al. (1997) Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized in dendritic spines. *Neurobio* Vol. 94 pp: 9956-9961.
- Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, 67, 199-225.
- Ashley E. Brady, Qin Wang, Roger J. Colbran, Patrick B. Allen, Paul Greengard and Lee E. Limbird (2003). Spinophilin Stabilizes Cell Surface Expression of α 2B-Adrenergic Receptors. *JBC* Vol.287
- Becker J, Schmidt P, Musshoff F, Fitzenreiter M, Madea B.(2004) MOR1 receptor mRNA expression in human brains of drug-related fatalities-a real-time PCR quantification. *Forensic Sci Int.* Feb 10;140(1):13-20.
- Berman DM, Gilman AG (1998) Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem* Jan 16;273(3):1269-72
- Beydoun A: New pharmacological options for the management of neuropathic pain: a practical treatment guide. Dannemiller Memorial Educational Foundation, 1999.
- Boyer C., Schikorski T., Stevens CF (1998) Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci.* Jul 15;18(14):5294-300.
- Burchett SA (2003) In through the outdoor: nuclear localization of the regulators of G protein signaling. *J Neurochem.* Nov;87(3):551-9.
- Chen Y., Mestek A., Lui J., Hurley and Yu L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from brain. *Mol Pharmacol* 44(1):8-12
- Contet C, Kieffer BL, Befort K (2004) Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;14(3):370-8
- Davydov IV, Varshavsky A (2000) RGS4 is arginylated and degraded by the N-end rule pathway in vitro. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28;275(30):22931-41.
- Emmerson PJ, Clark MJ, Mansour A, Akil H, Woods JH, Medzihradsky F. (1996) Characterization of opioid agonist efficacy in a C6 glioma cell line expressing the mu opioid receptor *J Pharmacol Exp Ther.* Sep;278(3):1121-7.
- Feng J. et al. (2000) Spinophilin regulated the formation and function of dendritic spines. *PNAS.* Vol 97. no. 16 pp 9287-9292.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* Mar;53(1):1-24.
- Greengard P. et al. (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/PP1 cascade. *Neuron* Vol 23: 435-447
- Joanna J. Charlton, Patrick B. Allen, Kassi Psifogeorgou, Sumana Chakravarty, Ivone Gomes, Rachael L. Neve, Lakshmi A. Devi, Paul Greengard, Eric J. Nestler and Venetia Zachariou (2008). Multiple Actions of Spinophilin Regulate Mu Opioid Receptor Function. *Neuron* 58, 238-247

- Jones TL (2004) Role of palmitoylation in RGS protein function. *Methods Enzymol.* 389:33-55
- Koelle MR, Horvitz HR (1996) EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins *Cell.* Jan 12;84(1):115-25.
- Kong H., Raynor K., Yasuda K., Moe S., Portoghese P., Bell G., Reisine (1993) A single residue, aspartic acid 95, in the delta opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding *J Biol Chem* 268(31) 23055-8
- Korzh A, Keren O, Gafni M, Bar-Josef H, Sarne Y. (2008) Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by opioid and cannabinoid receptors that are expressed in the same cell. *Brain Res.* Jan 16;1189:23-32.
- Lee MJ, Tasaki T, Moroi K, An JY, Kimura S, Davydov IV, Kwon YT (2005) RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 18;102(42):15030-5. Epub 2005 Oct 10.
- Lefkowitz, R.J. (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell*, 74, 409-412.
- Lefkowitz, R.J., Pitcher, J., Krueger, K. and Daaka, Y. (1998) Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol*, 42, 416-420.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* Feb 1;115(Pt 3):455-65.
- Martemyanov KA, Lishko PV, Calero N, Keresztes G, Sokolov M, Strissel KJ, et al. (2003) The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neurosci*;23:10175–81.
- Martin W, Bell J, Gilbert P, Sloan J, Thompson J (1976) The effects of naltrexone in the chronic spinal dog and acute spinal cat; possible interaction with naturally-occurring morphine-like agonists. *NIDA Res Monogr.* 1976 Sep;(9):27-30.
- McClung CA. (2006).The molecular mechanisms of morphine addiction. *Rev Neurosci.*;17(4):393-402.
- McKinney RA, Capogna M, Dürr R, Gähwiler BH, Thompson SM (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci.* Jan;2(1):44-9
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 273, 5419-5422.
- Przewłocki R, Przewłocka B (2001) Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* Oct 19;429(1-3):79-91
- Rahman Z, Gold SJ, Potenza MN, Cowan CW, Ni YG, He W, Wensel TG, Nestler EJ (1999) Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene. *J Neurosci.* Mar 15;19(6):2016-26

- Rahman Z, Gold SJ, Potenza MN, Cowan CW, Ni YG, He W, Wensel TG, Nestler EJ. (1999) Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene. *J Neurosci.* Mar 15;19(6):2016-26.
- Raynor K, Kong H, Hines J, Kong G, Benovic J, Yasuda K, Bell GI, Reisine T (1994) Molecular mechanisms of agonist-induced desensitization of the cloned mouse kappa opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* Sep;270(3):1381-6.
- Reisine T, Bell GI (1993) Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci.* Dec;16(12):506-10.
- Ross EM, Wilkie TM (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem.* 69:795-827
- Ross EM, Wilkie TM (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem.*;69:795-827.
- Roth, B.L., Laskowski, M.B. and Coscia, C.J. (1981) Evidence for distinct subcellular sites of opiate receptors. Demonstration of opiate receptors in smooth microsomal fractions isolated from rat brain. *J Biol Chem*, 256, 10017-10023.
- Sarrouilhe D, A. di Tommaso, T. Métafé and V. Ladeveze. (2006) Spinophilin: from partners to functions *Biochimie* 88 1099-1113
- Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirao K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A, Takai Y (1998) Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Biol Chem.* Feb 6;273(6):3470-5.
- Shelley B. Hooks, Kirill Martemyanov, Venetia Zachariou (2007). A role of RGS proteins in drug addiction. *Biochem Pharmacol*
- Siderovski DP, Willard FS (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci.* 1(2):51-66. Epub 2005 Apr 1.
- Smith FD, Oxford JS, Milgram SL (1999) Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a PP1-interacting protein. *J.Bio.Chem.* Vol 274, no.28,pp:19894-19900
- Smith J. and Simon J. (1980) Selective protection of stereospecific enkephalin and opiate binding against inactivation by N-ethylmaleimide: evidence for two classes of opiate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(1):281-4
- Wang Q, Zhao J, Brady AE, Feng J, Allen PB, Lefkowitz RJ, Greengard P, Limbird LE. (2004) Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science* Jun 25;304(5679):1940-4.
- Wang X, Zeng W, Soyombo AA, Tang W, Ross EM, Barnes AP, Milgram SL, Penninger JM, Allen PB, Greengard P, Muallem S. (2005) Spinophilin regulates Ca²⁺ signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. *Nat Cell Biol.* Apr;7(4):405-11.

- Yan Z. et al. (1999) Protein Phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nature-neuroscience* Vol 2, no 1, pp 13-17.
- Zachariou V, Georgescu D, Sanchez N, Rahman Z, DiLeone R, Berton O, Neve RL, Sim-Selley LJ, Selley DE, Gold SJ, Nestler EJ. (2003) Essential role for RGS9 in opiate action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 11;100(23):13656-61. Epub 2003 Oct 31.
- Zastrow and Alexander Sorkin (2007). Signaling on the endocytic pathway *Current Opinion in Cell Biology* 19:436-445
- Zeng W, Xu X, Popov S, Mukhopadhyay S, Chidiac P, Swistok J, Danho W, Yagaloff KA, Fisher SL, Ross EM, Muallem S, Wilkie TM (1998) The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling. *J Biol Chem*. 1998 Dec 25;273(52):34687-90