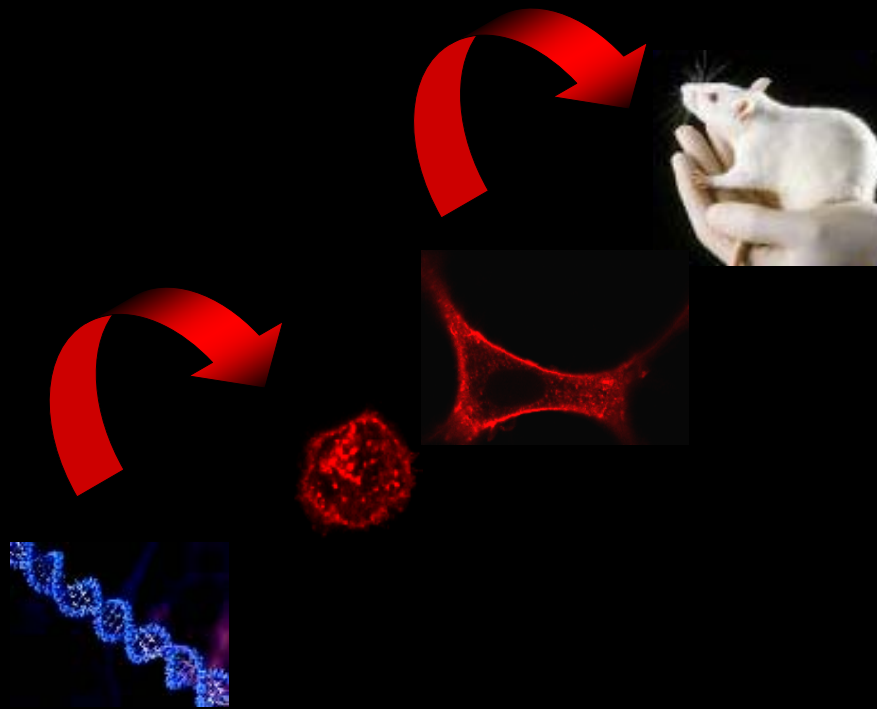


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ
ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ
ΑΠΟ ΤΗΝ RGS9-2**

ΚΑΣΣΗ ΨΗΦΟΓΕΩΡΓΟΥ

Ηράκλειο 2008

Στα 3 Κ

Στους παππούδες μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αντί προλόγου	2
1.2 Οπιοειδείς αγωνιστές	3
1.3 Οπιοειδείς υποδοχείς	7
1.3.α. μ οπιοειδής υποδοχέας	9
1.4 Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors-GPCRs)	11
1.4.α. Γα υπομονάδες των G πρωτεϊνών	13
1.4.β. Gβ/γ υπομονάδες των G πρωτεϊνών	15
1.5. Φωσφορυλίωση και ενδοκύττωση των GPCR	16
1.5.α. GRK (G protein coupled receptor kinases) πρωτεΐνες	17
1.5.β. β-αρρεστίνη	18
1.5.γ. ERK (extracellular signal-regulated kinases) πρωτεΐνες	20
1.5.γ.α. ERK1/2	22
1.5.γ.β. ERK3/5	23
1.5.γ.γ. JNK/SAPK και p38 κινάση	23
1.6. RGS (Regulators of G protein signaling) πρωτεΐνες	24
1.7. R7 υποοικογένεια των RGS πρωτεϊνών	30
1.7.α. DEP (Disheveled, Egl-10 και Pleckstrin ομολογία) τμήμα των RGS	30
1.7.β. G-protein Gamma-subunit Like (GGL) τμήμα των RGS	31
1.8. RGS9 πρωτεΐνη	32
1.9. Διασυνδεδετικές πρωτεΐνες των RGS πρωτεϊνών	35
1.9.α. R7 πρωτεΐνη προσδεσης (R7BP) και R9 διασυνδεδετική πρωτεΐνη (R9AP)	35

1.9.β. Η πρωτεΐνη spinophilin	36
1.10. Ερευνητικός σκοπός	38
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	40
2.1 Μοριακές μέθοδοι	41
2.1.1. Δημιουργία βακτηρίων μετασχηματισμού (competent cells)	41
2.1.2. DNA κατασκευές	41
2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων DH10B της E. coli (transformation)	42
2.1.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-prep procedure)	42
2.1.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation)	44
2.1.6. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	45
2.1.7. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	46
2.2. Κυτταρικές μέθοδοι	48
2.2.1. Κυτταρικές σειρές-πρωτογενείς καλλιέργειες	48
2.2.2. Παροδική διαμόλυση ευκαρυωτικών κυττάρων	49
2.2.3. Ανοσοφθορισμός	50
2.3. Βιοχημικές μέθοδοι	51
2.3.1. Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών	51
2.3.2. Πειράματα ανοσοκατακρίμνησης	52
2.3.3. Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	53
2.3.4. Ανοσοενυμική μέθοδος (ELISA)	56
2.3.5. Βιοτυνυλίωση	57
2.4. Πειραματόζωα	58

2.4.α	Hot plate assay	59
2.4.β.	Υπερέκφραση της RGS9 με <i>in vivo</i> έγχυση ιού	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		61
3.	Τα RGS9 διαγονιδιακά ζώα, είναι πιο ευαίσθητα στις αναλγητικές ιδιότητες της μορφίνης	62
3.1.	Μελέτες με χρήση <i>in vivo</i> πειραματικών μοντέλων	62
3.1.1.	Η RGS9 ρυθμίζεται στον επικλινή πυρήνα αποκλειστικά από τη μορφίνη	62
3.1.2.	Η υπερέκφραση της RGS9-2 αναστέλλει την ενδοκύττωση του μ υποδοχέα που επάγεται από τη χορήγηση DAMGO	63
3.1.3.	Η διανομή της RGS9-2 στο κύτταρο επηρεάζεται από τη χορήγηση οπιοειδών	63
3.1.4.α & β	Το DEP τμήμα είναι απαραίτητο για την επίδραση της RGS9-2 στην ενδοκύττωση του υποδοχέα	64
3.1.4.γ.1	Χρήση ELISA σε PC12 κύτταρα για ποσοτικοποίηση ενδοκύττωσης μ υποδοχέων	65
3.1.4.γ.2.	Χρήση βιοτυνιλίωσης σε PC12 κύτταρα για ποσοτικοποίηση ενδοκύττωσης μ υποδοχέων	66
3.1.5.α & β	Η RGS9 αναστέλλει την ενδοκύττωση του μ υποδοχέα που επάγεται από τα οπιοειδή, σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλάστων	66
3.1.5.γ.	Χρήση ELISA σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες για ποσοτικοποίηση ενδοκύττωσης μ υποδοχέων	67
3.1.6.	Η RGS9-2 εμποδίζει τη ρύθμιση τη φωσφορυλίωσης της ERK1/ERK2 από τους ενεργοποιημένους μ οπιοειδείς υποδοχείς <i>in vitro</i>	67
3.1.7.	Αλληλεπίδραση της RGS9-2 με τον μ υποδοχέα των οπιοειδών και την β-αρρεστίνη 2	68
3.2. α & β	Επιδράσεις στην φωσφορυλίωση της ERK1/2 και της PLCβ3 από τη χορήγηση μορφίνης ή φαιτανύλης, στον επικλινή πυρήνα και στο ραχιαίο ραβδωτό	69
3.3.1.1.	Μελέτες ανοσοκατακρίμησης κατόπιν οξείας χορήγησης οπιοειδών	70
3.3.1.1.α & β	Αλληλεπιδράσεις του μ υποδοχέα με σημαντικά σηματοδοτικά μόρια.	70
3.3.1.1.γ,δ & ζ	Αλληλεπιδράσεις της RGS9 πρωτεΐνης με σημαντικά μόρια που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι κάτωθεν της διέγερσης του MOR	71
3.3.2.	Η εφάπαξ χορήγηση μεθαδόνης ευνοεί την αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μετά τη διέγερση του υποδοχέα από φαιτανύλη	72
3.4.	Μελέτες ανοσοκατακρίμησης κατόπιν χρόνιας χορήγησης οπιοειδών	72

3.4.1.α & β Αλληλεπιδράσεις της RGS9 και του μ υποδοχέα με σημαντικά σηματοδοτικά μόρια	72
3.5 Συμπεριφερικές μελέτες σε RGS9 ^{+/+} και RGS9 ^{-/-} ζώα	74
3.5.β Η υπερέκφραση της RGS9 και με AAV ιό προκαλεί σημαντική μείωση στο αναλγητικό αποτέλεσμα που προκαλείται από τα οπιοειδή	75
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	104
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	120
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	140

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Ζαχαρίου Βενετία, η οποία μου πρόσφερε την ευκαιρία να εργασθώ στο εργαστήριο της και να ασχοληθώ με το πεδίο των Νευροεπιστημών. Η καθοδήγηση της ήταν σημαντική όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους κυρίους Καρδάση και Πλαϊτάκη, για τις εύστοχες συμβουλές τους πάνω στη διατριβή μου, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τη παρουσία τους και τις παρατηρήσεις τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους όσους δουλεύουν στην πτέρυγα τη φαρμακολογίας και όχι μόνο, τον Κώστα, τη Φωτεινή, τη Βέρα, τη Βέτα, τον Κώστα Θεοδωράκη και τον Κουμπανάκη για τη βοήθεια τους και την υποστήριξη τους. Πολύ σημαντικοί στάθηκαν για μένα και τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια, και έκαναν τη διάρκεια τη ημέρας ενδιαφέρουσα και πιο διασκεδαστική. Ευχαριστώ λοιπόν τη Δήμητρα, την Ειρήνη, τη Ζωή, τον Κωνσταντίνο και τη Μαρία-Μάρθα, τη Σάσα, την Νίκη, τη Joanna και τον Γιάννη και όλους τους υπόλοιπους που ίσως παρέλειψα αλλά σίγουρα δεν ξέχασα.

Καθοριστικό ρόλο για τη διαμονή μου στην Κρήτη έπαιξαν οι «Κρητικοί» φίλοι μου και θεωρώ ότι η σχέση που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια είναι για μένα σχέση ζωής. Με χρονολογική σειρά γνωριμίας, θέλω να αναφέρω ότι ο Μανόλης, ο Νικόλας, η Μαρία, ο Λάμπρος, η Έφη, ο Βασίλης, η Νίκη και ο Κώστας, ο Λάζαρος, η Ελένη και ο Κώστας, ο καθένας ξεχωριστά αλλά και όλοι μαζί μου έδειξαν τις ομορφιές του νησιού αλλά πάνω από όλα μου έδωσαν τη φιλία τους. I won't forget!

Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον Αλέξανδρο Τζημουράκα που η κοινή μας πορεία ξεκίνησε από την Αγγλία και την απόκτηση του πρώτου μεταπτυχιακού και συνέχισε να είναι

δίπλα μου, να με βοηθά και να με εμπνυχώνει, τόσο στη δουλειά μου, όσο και στη ζωή μου γενικότερα. Αλέξανδρε σε ευχαριστώ πολύ!!

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το κράτησα στο τέλος για την οικογένεια μου. Ευχαριστώ τον πατέρα μου Κώστα, τη μητέρα μου Καίτη και την αδερφή μου Κορίνα για την ανιδιοτελή αγάπη τους και στήριξη τους, τόσο συναισθηματική όσο και οικονομική, από την πρώτη μέρα που θυμάμαι τον εαυτό μου. Οι συμβουλές τους και η συμβολή τους στάθηκαν καθοριστικές και τους χρωστάω όλες τις εμπειρίες ζωής που έχω «συλλέξει» μέχρι τώρα. Όσα χρόνια κι αν περάσουν, εσείς θα είστε το πρότυπο μου. Ευχαριστώ για όλα!!!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι RGS πρωτεΐνες (Regulators of G protein signaling), ρυθμίζουν το εύρος της σηματοδότησης των υποδοχέων που είναι προσδεδεμένοι με τις G πρωτεΐνες μέσω της GTPase δράσης τους. Επιταχύνουν τη λήξη της σηματοδότησης μέσω της πρόσδεσης του RGS τμήματος τους στην ενεργοποιημένη Gα υπομονάδα των G πρωτεϊνών. Η συγκεκριμένη διατριβή ασχολείται με την RGS9-2 πρωτεΐνη, μέλος των RGS πρωτεϊνών, που εκφράζεται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση στο ραβδωτό, αλλά και σε άλλες περιοχές που μεσολαβούν στη ρύθμιση του εθισμού και της αναλγησίας. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα RGS9^{-/-}(KO) ζώα παρουσίασαν αυξημένη αναλγησία ως προς τη μορφίνη και καθυστέρηση ανάπτυξη ανοχής (Zachariou *et al.*,2003). Στην προσπάθεια να κατανοηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η RGS9-2 ρυθμίζει τις δράσεις των οπιοειδών, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην εξακρίβωση του ρόλου της RGS9-2 στις λειτουργικές αποκρίσεις του μ υποδοχέα των οπιοειδών (MOR).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η RGS9-2 καθυστερεί την ενδοκύττωση του μ υποδοχέα, σε PC12 και σε MEF κύτταρα, μετά τη χορήγηση μορφίνης ή DAMGO. Για να ασκήσει τη δράση της αυτή, κρίνεται απαραίτητη η παρουσία της στην πλασματική μεμβράνη που επιτυγχάνεται χάρη στη πρόσδεση του DEP τμήματος της σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Η υπερέκφραση της RGS9-2 σε PC12 κύτταρα, οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης της ERK, που ξεκινά κατόπιν ενεργοποίησης του MOR από μορφίνη ή DAMGO. Στο ραβδωτό τα επίπεδα της ρυθμίζονται αποκλειστικά από τη μορφίνη και η έκφραση της οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της ERK που γίνεται ακόμα πιο αισθητή κατά την απουσία της (RGS9^{-/-} ιστοί). Ωστόσο η συμμετοχή της RGS9 στα σηματοδοτικά σύμπλοκα που σχηματίζονται μετά την εφάπαξ ή χρόνια διέγερση του μ υποδοχέα από οπιοειδή, της προσδίδουν πρόσθετες λειτουργίες από την γνωστή έως τώρα GTPase δράση της. Ανάλογα με τον αγωνιστή που χορηγείται και με τις

πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που διαμορφώνονται με τις Gβ5 και Gα υπομονάδες, αλλά και με την β-αρρεστίνη2, η RGS9 μπορεί να επιφέρει θετική ή αρνητική ρύθμιση στο αναλγητικό αποτέλεσμα.

ABSTRACT

Regulators of G protein signaling (RGS) proteins, modulate G protein coupled receptor responsiveness through their GTPase activity. RGS exert signaling termination by binding to activated G α subunit of G proteins via their RGS domain. We are particularly interested in RGS9-2 a multifunctional protein and a member of RGS family which is highly concentrated in striatum but also localized in regions that mediate addiction and analgesia. We have previously shown that RGS9^{-/-} (KO) mice show enhanced morphine analgesia and delayed development of tolerance (Zachariou *et al.*,2003). In our effort to comprehend the mechanism via which RGS9-2 modulates opioid actions we investigated the role of RGS9-2 in mu opioid receptor functional responses. According to our data, in PC12 and MEF cells RGS9-2 delays morphine or DAMGO-mediated MOR endocytosis. To exert this action, RGS9-2 is located to the cell membrane through the binding of its DEP domain to transmembrane proteins. The overexpression of RGS9-2 in PC12 cells leads to inhibition of ERK phosphorylation in an agonist dependent manner, a system that is affected by MOR activation. In striatum the levels of RGS9 are exclusively regulated by morphine and its expression leads to inhibition of ERK stimulation which is enhanced when RGS9 is not expressed (RGS9-2^{-/-} tissues). The participation of RGS9 in the signaling complexes that are formed after acute or chronic stimulation of MOR by opioids, gives an additive role to RGS9. Depending on the agonist stimulation and protein interactions with G β 5 and G α subunits, as well as β -arrestin2, RGS9 can act as a positive or as a negative regulator of the analgesic effect.

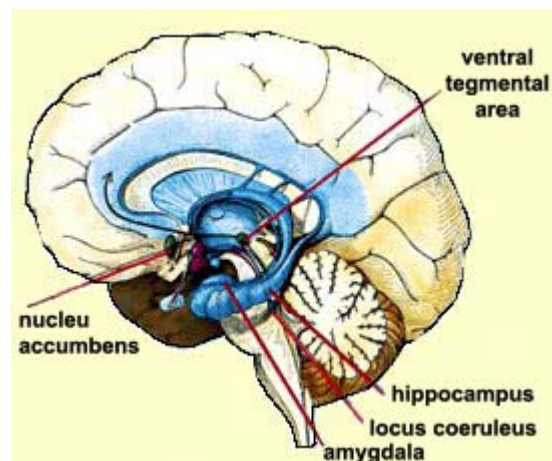
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αντι-προλόγου

Ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων πάσχει από χρόνιες ασθένειες των οποίων η θεραπεία απαιτεί συνεχή χρήση οπιοειδών αναλγητικών φαρμάκων προκειμένου να ελαττωθεί η αίσθηση του πόνου. Καθώς όμως συνεχίζουν την θεραπεία, σταδιακά απαιτούνται υψηλότερες δόσεις για να επιτύχουν την ίδια αίσθηση καταπράυνσης, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο παρενεργειών και τις πιθανότητες εθισμού. Παρόλο που οι υποδοχείς μέσω των οποίων δρουν τα οπιοειδή έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί, παρουσιάζεται μικρή πρόοδος προς την πρόληψη του εθισμού και την ανάπτυξη αναλγητικής ανοχής. Τα ισχυρά οπιοειδή αναλγητικά είναι ιδιαίτερα εθιστικά και προκαλούν αναλγητική ανοχή πολύ γρηγορότερα από τα λιγότερο αποτελεσματικά οπιοειδή. Ασκούν τις δράσεις τους μέσω της ενεργοποίησης των μ οπιοειδών υποδοχέων (MOR), οι οποίοι συζευγνύονται με τις G πρωτεΐνες. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες επιδρούν έμμεσα ή άμεσα στο μεταιχμιακό σύστημα όπου εντοπίζονται σε μεγάλη συγκέντρωση οι οπιοειδείς υποδοχείς (Mansour *et al.*, 1995), το οποίο εκτείνεται από την κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας (VTA-ventral tegmental area) ως τον επικλινή πυρήνα.

Η κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας (VTA) αποτελείται από νευρώνες που απελευθερώνουν ντοπαμίνη, γάμα-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και γλουταμικό οξύ. Εκτός από το μεταιχμιακό σύστημα, συμμετέχει και στο μεσοκορτικό σύστημα που τη συνδέει με τις φλοιώδης περιοχές του πρόσθιου λοβού. Το VTA συμμετέχει στο αίσθημα ανταμοιβής και ευχαρίστησης (Wise, 2004), και επιπλέον θεωρείται ότι

εμπλέκεται στον εθισμό. Ο επικλινής πυρήνας (NAcc) εντοπίζεται στο ραβδωτό και αποτελείται από μία συλλογή νευρώνων (medium spiny neurons) που έχουν κυρίως ανασταλτική δράση και παράγουν επίσης γάμα-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Παίζει σημαντικό ρόλο στο αίσθημα της ανταμοιβής και του εθισμού (Schwienbacher *et al.*, 2004). Μαζί με τον οσφρητικό βολβό (olfactory tubercle), ο επικλινής πυρήνας σχηματίζει το κοιλιακό ραβδωτό σώμα (ventral striatum), μέρος των βασικών γαγγλίων, ενώ το ραχιαίο τμήμα του ραβδωτού (dorsal striatum) συμπεριλαμβάνει τον κερκοφόρο πυρήνα (caudate nucleus) και το κέλυφος φακοειδούς πυρήνα (putamen).



Εικόνα 1.1 Ο ρόλος του επικλινή πυρήνα στο σύστημα ανταμοιβής.

"The Brain From Top to Bottom." thebrain.mcgill.ca

1.2. Οπιοειδείς αγωνιστές

Τα οπιοειδή αναλγητικά σύμφωνα με τη χημική τους δομή περιλαμβάνουν τα φυσικά αλκαλοειδή του οπίου (μορφίνη) και τα ημισυνθετικά παράγωγα και είναι οι πιο

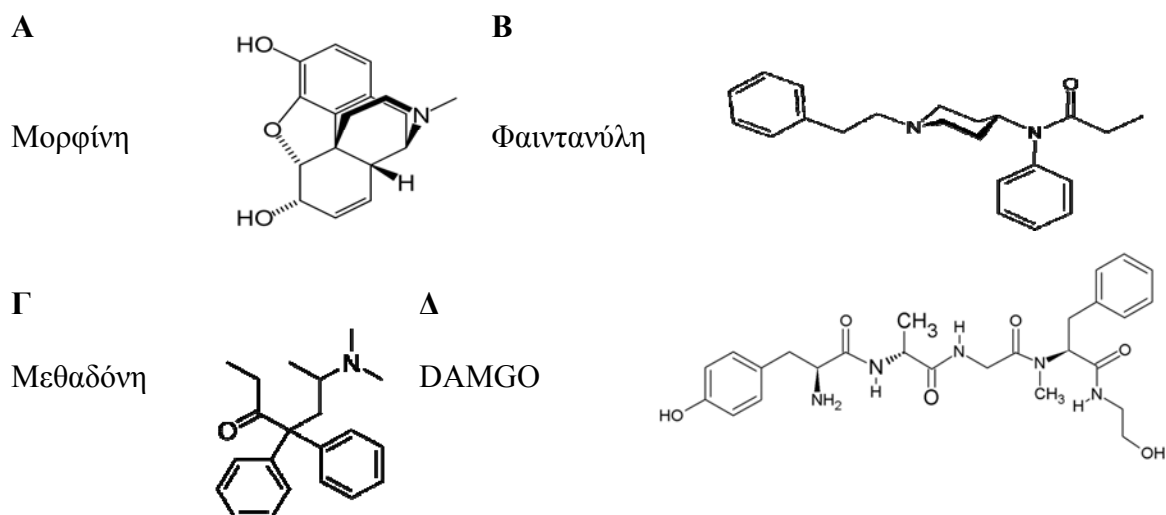
αποτελεσματικοί αγωνιστές για τη θεραπεία του χρόνιου πόνου. Ωστόσο κατά την επαναλαμβανόμενη χρήση τους παρουσιάζονται διάφορες παρενέργειες, όπως καταστολή του αναπνευστικού και γρήγορη ανάπτυξη ανοχής και εξάρτησης, γεγονότα που τα καθιστούν λιγότερο αποτελεσματικά κατά την αγωγή. Ανοχή ορίζεται η ανάγκη για διαρκώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αγωνιστή κατά τη περίοδο της χρόνιας θεραπείας, ώστε να διατηρηθεί το αναλγητικό αποτέλεσμα (Koob και Bloom, 1988), ενώ η εξάρτηση σχετίζεται με το σύνδρομο στέρησης που αναπτύσσεται μετά την απομάκρυνση του αγωνιστή (Nestler και Aghajanian, 1997).

Όλα τα οπιοειδή επιφέρουν αναλγησία δρώντας στους μ , κ ή δ υποδοχείς προσυναπτικά και μετασυναπτικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αναστέλλοντας τη μετάδοση του αλγογόνου ερεθίσματος από την περιφέρεια σε ανώτερα κέντρα. 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 και η μεθαδόνη, παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για το μ οπιοειδή υποδοχέα (Raynor *et al.*, 1994).

Η μορφίνη (5(6, κ)-7,8 didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol) είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα αναλγητικά φάρμακα για την αντιμετώπιση του χρόνιου πόνου. Ασκεί τις δράσεις της ως αγωνιστής, έπειτα από σύνδεση της στους μ υποδοχείς των οπιοειδών που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του νευρικού συστήματος (Evans *et al.*, 1992, Kieffer *et al.*, 1992). Αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής είναι η μείωση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης άρα και της παραγόμενης κυκλικής αδενοσινικής μονοφωσφατάσης (cyclic AMP ή 3'-5'-cyclic

adenosine monophosphate) (Childers, 1991), η οποία είναι δεύτερος αγγελιοφόρος και μεσολαβεί σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες. Η διάρκεια δράσης της μορφίνης διαρκεί 4-6 ώρες. Στο ήπαρ μεταβολίζεται στο 6 και 3 γλυκουρονίδιο (Sakurada *et al.*, 2005). Παρά τη μεγάλη συχνότητα ναυτίας και εμετού που προκαλεί, εξακολουθεί να παραμένει το πιο εύχρηστο οπιοειδές για την αντιμετώπιση του έντονου πόνου. Αποτελεί την πρότυπη ουσία με την οποία συγκρίνεται η αναλγητική ισχύς των άλλων οπιοειδών.

Η φαιντανύλη ((*N*-phenyl-*N*-(1-phenethyl-4-piperidinyl) propanamide) έχει 80 φορές μεγαλύτερη αναλγητική ισχύ από τη μορφίνη, παρουσιάζει ταχεία έναρξη (2-5 λεπτά) και μικρή διάρκεια δραστηριότητας (15-30 λεπτά) (Harvey και Champe, 1997). Οι φαρμακολογικές της δράσεις προάγονται μέσω της διέγερσης του μ υποδοχέα των οπιοειδών (MOR). Μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχουν διαφορές στους μηχανισμούς που σχετίζονται με τα αναλγητικά αποτελέσματα των δύο φαρμάκων (Paronis and Holtzman, 1992), γεγονός που προξενεί ξεχωριστές αποκρίσεις (Bohn *et al.*, 1998). Ωστόσο η ανάπτυξη ανοχής και εξάρτησης παρουσιάζεται μετά την χρόνια αγωγή και των δύο. Η μεθαδόνη (6-(Dimethylamino)-4,4-diphenylheptan-3-one) είναι επίσης συνθετικό οπιοειδές το οποίο προκαλεί μικρότερη ευφορία από τη μορφίνη, έχει αργό μεταβολισμό και μεγαλύτερη διάρκεια δράσης, έως και 48 ώρες (Harvey και Champe, 1997). Τέλος, το DAMGO ([D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]-enkephalin) είναι συνθετικό οπιοειδές πεπτίδιο το οποίο παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα για τον μ υποδοχέα (Handa *et al.*, 1981) και έχει παρόμοια ισχύ με τη μορφίνη στο να προκαλέσει έναρξη της σηματοδοτικής ακολουθίας (Burford *et al.*, 1998, Keith *et al.*, 1998).



Εικόνα 1.2. Η δομή της μορφίνης και άλλων συναφών οπιοειδών. (A) (5(6,<-)7,8 didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol) μορφίνη, (B) ((N-phenyl-N-(1-phenethyl-4-piperidinyl) propanamide) φαιντανύλη, (Γ) (6-(Dimethylamino)-4,4-diphenylheptan-3-one) μεθαδόνη, (Δ) ([D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]-enkephalin) DAMGO.

Παλαιότερες μελέτες αναφέρουν ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη σχέση ανάμεσα στην ικανότητα ενός οπιοειδή αγωνιστή να προκαλέσει ενδοκύττωση του μ οπιοειδή υποδοχέα (MOR) και στην ικανότητα του να ξεκινήσει μια σηματοδότηση. Νεότερες έρευνες όμως υποστηρίζουν ότι αγωνιστές όπως η μορφίνη, το DAMGO, η φαιντανύλη και η μεθαδόνη ενώ μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των GPCRs, διαφέρουν στην ικανότητα τους να προκαλέσουν απευαισθητοποίηση του υποδοχέα. (Sim-Selley *et al.*, 2000). Ένας από τους λόγους ανάπτυξης ανοχής 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 ενδοκύττωση (Pineyro 2007).

Πολλοί είναι πλέον και οι ερευνητές που υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός της ενδοκύττωσης των μ υποδοχέων μετά από διέγερση τους τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* εξαρτάται από τον αγωνιστή (Arden *et al.*, 1995, Sternini *et al.*, 1996, Keith *et al.*, 1996, 1998). Οι Liu και Prather το 2001 υποστήριξαν ότι η χρόνια έκθεση σε μορφίνη ή DAMGO προκαλεί δραστηριότητα ανάλογη με την αποτελεσματικότητα (efficacy) του φαρμάκου. Η πρόταση αυτή είναι σύμφωνη με αναφορές που έδειξαν ότι η ρύθμιση των GPCR από τις GRK και β -αρρεστίνες σχετίζεται απευθείας με την ενεργότητα του φαρμάκου (Konoor *et al.*, 1998, Szekeres *et al.*, 1998).

1.3. Οπιοειδείς υποδοχείς

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 εξειδίκευση τους οφείλεται στο υπόλοιπο 40% των αλληλουχιών τους (Reisine και Bell, 1993). Ανήκουν στην κατηγορία των διαμεμβρανικών υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες, με ένα τμήμα τους να παραμένει εκτός κυττάρου (εξωκυττάριο τμήμα), ενώ ένα δεύτερο τμήμα τους να βρίσκεται μέσα στο κύτταρο (ενδοκυττάριο τμήμα). Μεγάλη συγκέντρωση οπιοειδών υποδοχέων βρίσκεται στις περιοχές του στελέχους του εγκεφάλου, στον έσω θάλαμο, στο νωτιαίο μυελό, στον υποθάλαμο, στο μεταιχμιακό σύστημα, σε περιφερικές αισθητικές νευρικές ίνες και στην επιφάνεια ανοσοκυττάρων. Η κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των οπιοειδών υποδοχέων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον μιας μεγάλης μερίδας της επιστημονικής κοινότητας λόγω της μεγάλης σημασίας τους στην αντιμετώπιση του πόνου. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από την

αναλγησία οι συγκεκριμένοι υποδοχείς εμπλέκονται και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες όπως στην κινητικότητα, στο αναπνευστικό και στο γαστροεντερικό σύστημα (Pasternak, 1988).

Ο δ υποδοχέας είναι και ο πρώτος που κλωνοποιήθηκε και οπιοειδείς αγωνιστές όπως οι [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE), SNC-80 (Calderon *et al.*, 1994), BW373U86 (Calderon *et al.*, 1997) δείχνουν μεγάλη εκλεκτικότητα για αυτόν. Ο ενδογενής αγωνιστής που προσδένεται στον δ υποδοχέα είναι η εγκεφαλίνη [D-Ala², D-Leu⁵] (Quock *et al.*, 1999). Εκφράζεται στις περιοχές του επικλινή πυρήνα, στην αμυγδαλή, στον υποθάλαμο, στον ιππόκαμπο και στα DRGs. Η ενεργοποίηση των δ υποδοχέων προκαλεί αναλγησία σε μικρότερο εύρος από ότι οι αγωνιστές των μ υποδοχέων (Varga *et al.*, 2004) και σε ορισμένες περιπτώσεις οι δ αγωνιστές χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της κατάθλιψης.

Το ενδογενές πεπτίδιο δυνορφίνη (Lord *et al.*, 1977, Chen *et al.*, 1993), καθώς και οι συνθετικοί αγωνιστές U50488H, U 69593 (Alzheimer και Bruggencate, 1990) παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για τον κ υποδοχέα. Ο KOR κατανέμεται ευρέως στον εγκέφαλο (επικλινή πυρήνα, αμυγδαλή, υποθάλαμο) και στο νωτιαίο μυελό (Mansour *et al.*, 1995). Οι κ υποδοχείς μπορούν να παίξουν ρόλο στη διαχείριση του πόνου, αλλά είναι λιγότεροι αποδοτικοί σαν αναλγητικοί στόχοι (Przewlocki και Przewlocka 2001).

1.3. α. μ οπιοειδής υποδοχέας

Οι GPCRs κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, με βάση τη συνάφεια που μπορεί να έχουν με τη β-αρρεστίνη. Οι ομάδες αυτές ονομάστηκαν A και B. Ο μ οπιοειδής υποδοχέας ανήκει στην A ομάδα (rhodopsin like), δηλαδή στην κατηγορία υποδοχέων που ανακυκλώνονται και ευαισθητοποιούνται ξανά με γρήγορους ρυθμούς σε αντίθεση με τη B ομάδα όπου για αυτές τις διεργασίες απαιτείται πολύς περισσότερος χρόνος. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ οι υποδοχείς της A κατηγορίας προσδέονται με υψηλή συγγένεια με τη β-αρρεστίνη², η αλληλεπίδραση αυτή είναι προσωρινή (Luttrell και Lefkowitz, 2002). Δηλαδή κατά την ενδοκύττωση του υποδοχέα και ενώ ο τελευταίος κατευθύνεται προς τα ενδοσώματα, η β-αρρεστίνη ανακυκλώνεται πίσω στην κυτταρική μεμβράνη. Στην περίπτωση της B κατηγορίας οι υποδοχείς σχηματίζουν ενιαίες μονάδες με τις β-αρρεστίνες και κατά αυτόν τον τρόπο κατευθύνονται στα ενδοσώματα (Oakley *et al.*, 2000). Οι περιοχές που καθορίζουν τη σταθερότητα του συμπλόκου αρρεστίνης-υποδοχέα αποτελούνται από αμινοξέα σερίνης/θρεονίνης και εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο του ίδιου του υποδοχέα (Oakley *et al.*, 2001).

Η ενδομορφίνη είναι ο ενδογενής αγωνιστής που παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για το μ υποδοχέα (Kieffer, 1999), ενώ η μορφίνη είναι το κυριότερο αναλγητικό φάρμακο που προσδέεται σε αυτόν, περιέχεται στο ακατέργαστο όπιο και είναι το πρότυπο του αγωνιστή οπιοειδών. Η μορφίνη είναι αλκαλοειδές και οι ιδιότητες, την έχουν καταστήσει ένα από τα καλύτερα αναλγητικά. Ωστόσο οι παρενέργειες που εμφανίζονται κατά τη χρήση της όπως ανοχή, εξάρτηση, καταστολή του

αναπνευστικού περιορίζουν σημαντικά την κλινική χρήση της (Rachel και Bohn 2005). Παρόλη τη χρήση της ως αναλγητικό, το έναυσμα για τη διερεύνηση των κυτταρικών μηχανισμών δράσεων της μορφίνης δόθηκε μετά την ανακάλυψη των οπιοειδών υποδοχέων τη δεκαετία του 70 (Zadina, 2002). Η συγγένεια της μορφίνης για τον μ υποδοχέα είναι περίπου 50 φορές μεγαλύτερη από αυτή που έχει για τον δ (Emmerson *et al.*, 1994). Ασκεί την αναλγητική και ανταμοιβική δράση της μέσω των G_i/o πρωτεϊνών που είναι συζευγμένες με τους μ οπιοειδείς υποδοχείς (Evans, 2004), αν και μπορεί να παρουσιάσει μια πολύ μικρή δράση μέσω των δ και κ (Kieffer, 1999).

Ο MOR εκφράζεται ευρέως τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και στο περιφερικό. Η διαφορετική κατανομή του σημαίνει ότι μπορεί να συμμετέχει σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, ανάλογα με τον τύπο κυττάρων που εντοπίζεται. Στον εγκέφαλο βρίσκεται κυρίως στο εγκεφαλικό στέλεχος (brainstem) και στο διάμεσο θάλαμο, ενώ στο ραβδωτό σώμα εκφράζεται σε δενδριτικές άκανθες και στα άκρα των νευραξόνων.

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. Πιο συγκεκριμένα το αναλγητικό αποτέλεσμα επέρχεται κυρίως χάρη στη δράση της μορφίνης στους μ οπιοειδείς υποδοχείς που εντοπίζονται στο γάγγλιο οπίσθιας ρίζας (DRG) και στο οπίσθιο κέρασ (dorsal horn) που έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότηση του πόνου από τις νευρικές ίνες στον εγκέφαλο. Στον εγκέφαλο το αναλγητικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται λόγω της

κατανομής των μ υποδοχέων στις περιοχές του ιπόκαμπου, της περιδραγωγικής φαιάς ουσίας, του υπομέλανα τόπου και του ραβδωτού. Οι υποδοχείς αυτοί απαντώνται επίσης στο γαστροεντερικό (gastrointestinal tract) και στο ανοσοποιητικό σύστημα.

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

Τα ενδογενή οπιοειδή συστήματα, ευρέως διανεμημένα στο νευρικό σύστημα επηρεάζουν διάφορες λειτουργίες του κυττάρου, όπως το μονοπάτι των MAPK (Mitogen activated protein kinases), την καταλυτική δράση της πρωτεΐνης ERK (Extracellular signal-regulated kinase), την αδενυλική κυκλάση (AC), τα κανάλια καλίου-ασβεστίου και παρουσιάζουν λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση του πόνου.

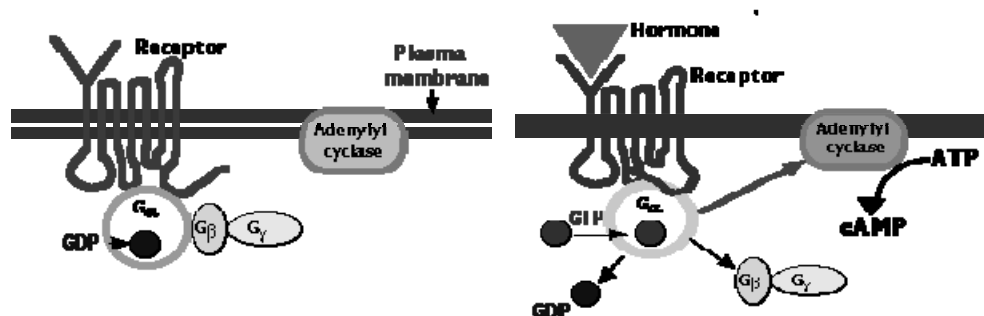
Ποιο συγκεκριμένα οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (GPCRs). Οι GPCRs απαρτίζουν μεγάλο τμήμα των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης και κωδικοποιούνται από 1-3% των γονιδίων των θηλαστικών. Ένα κοινό χαρακτηριστικό της σηματοδότησης των 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 αποτελούνται από επτά τμήματα με τα οποία διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποιούνται κυρίως από τις Gi ή Go πρωτεΐνες. Η σηματοδότηση τους ξεκινά με μία ανενεργή G

πρωτεΐνη προσδεμένη στον 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. Οι ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες μεταδίδουν πληροφορίες από τους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου προς τα μόρια τελεστές (effector molecules), μεσολαβώντας σε σημαντικές κυτταρικές αποκρίσεις, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ο λόγος αυτός τις καθιστά σημαντικούς στόχους για το θεραπευτικό χειρισμό των σηματοδοτικών μονοπατιών.

Μετά την πρόσληψη ενός αγωνιστή από τον υποδοχέα, η στερεοδομή του τελευταίου αλλάζει γεγονός που οδηγεί την πρόσδεση της G πρωτεΐνης σε αυτόν. 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 τις εξωκυττάριας κοιλότητες διαδραματίζοντας ρόλο στην επιλεκτική πρόσδεση των αγωνιστών στους διαφορετικούς οπιοειδείς υποδοχείς (Pogozheva *et al.*, 1998). Τα πεπτίδια γεμίζουν σχεδόν όλη τη διαθέσιμη περιοχή πρόσδεσης και αλληλεπιδρούν και με τμήματα από μη συντηρημένες περιοχές. Αγωνιστές αλκαλοειδών όπως η μορφίνη, αλληλεπιδρούν κυρίως με τα συντηρημένα τμήματα που βρίσκονται στο κατώτερο σημείο της περιοχής πρόσδεσης. Οι ανταγωνιστές των αλκαλοειδών (όπως η ναλοξόνη) προσδέονται στα κατώτατα σημεία της περιοχής πρόσδεσης, γεγονός που εμποδίζει την αλλαγή στη στερεοδομή του υποδοχέα οδηγώντας συνεπώς σε ανταγωνισμό (Pogozheva *et al.*, 1998).

Ο διεγερμένος υποδοχέας πυροδοτεί την ανταλλαγή GDP που είναι προσδεμένο στην G_{α} 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 μόρια τελεστές οδηγώντας στην αύξηση της GTPase δραστηριότητας που έχει η α υπομονάδα, της οποίας το μέγεθος καθορίζεται από τον κάθε τελεστή. Μέσω της GTPase δράσης της G_{α} , το α -GTP σύμπλοκο υδρολύεται σε α -GDP, οδηγώντας στην επανένωση της G_{α} με τις $G_{\beta\gamma}$, επαναφέροντας το όλο σύστημα στην αρχική ανενεργή του κατάσταση (Εικόνα 1.3).



Εικόνα1.3. Η σηματοδότηση των GPCRS, περνώντας από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση (users.rcn.com/.../BiologyPages/G/G_Proteins.html).

1.4.α. G_{α} υπομονάδες των G πρωτεϊνών

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες των G_{α} υπομονάδων (Simon *et al.*, 1991) οι οποίες ενεργοποιούν μόρια τελεστές και διαφέρουν τόσο δομικά όσο και λειτουργικά (Πίνακας 1.4). Οι τελεστές μπορούν να είναι ένζυμα όπως η φωσφολιπάση C (PLC) ή η αδενυλική κυκλάση (AC) και παράγουν δεύτερους αγγελιοφόρους. Οι δεύτεροι αγγελιοφόροι ξεκινούν μια σειρά ενδοκυττάρων διαδικασιών που περιλαμβάνουν τη

φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση ενζύμων, καθώς και την απελευθέρωση ασβεστίου από αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου.

G protein	α-subunit subfamily	Effect of activation
G _s	G _{sα} , G _{12α}	Stimulation of adenylyl cyclase
G _i	G _{α1-3} , G _{oα} , G _{zα} G _{α1}	Inhibition of adenylyl cyclase Activation of αGMP phosphodiesterase (specific for retinal phototransduction)
G _q	G _{qα} , G _{11α} , G _{14α} , G _{15α}	Activation of phospholipase Cβ (PLCβ)
G ₁₂	G _{12α} , G _{13α}	Activation of RhoA signalling; activation of PLCε

Πίνακας 1.1. Οι δράσεις των α υπομονάδων των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών (Neubig and Siderovski, 2002).

Το μέγεθος των μελών των Ga υπομονάδων ποικίλει από 39-52 kDa και οι πρωτεΐνες μοιράζονται μεταξύ τους ομολογία μεταξύ 35% and 95% (Downes & Gautam, 1999). Επιπλέον παρουσιάζουν διαφορά στην κατανομή τους. Κάποιες όπως οι Gas και οι Gaq εκφράζονται παντού, ενώ οι Gaz ή οι Ga14 εκφράζονται σε μικρό αριθμό και άλλες όπως η Gat εκφράζονται συγκεκριμένα μόνο σε φωτο-υποδοχείς της αμφιβληστροειδικής ράβδου (Varrault *et al.*, 1995). Ποιο συγκεκριμένα οι Gas ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία καταλύει τη μετατροπή του ATP σε κυκλικό AMP οδηγώντας στην αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP. Οι Gai/o αναστέλλουν την ενεργοποίηση της αδενυλική κυκλάσης και ενεργοποιούν GIRK κανάλια ενώ αναστέλλουν τη δράση διαύλων ασβεστίου. Οι Ga12 ενεργοποιούν τη μικρή G πρωτεΐνη Rho και οι Gaq υπομονάδες διεγείρουν τα PLCβ (phosphoinositide phospholipase C) ένζυμα για να παράγουν inositol 1,4,5-trisphosphate και να απελευθερώσουν Ca²⁺ (Simon *et al.*, 1991). Η κατηγορία των

G α περιλαμβάνει τις G α _q, G α ₁₁, G α ₁₄ και G α _{15 / 16}. Οι G α _q, G α ₁₁, G α ₁₄ έχουν υψηλή ομολογία και ενεργοποιούν τους τελεστές με παρόμοια δράση.

1.4.β. G β / γ υπομονάδες των G πρωτεϊνών

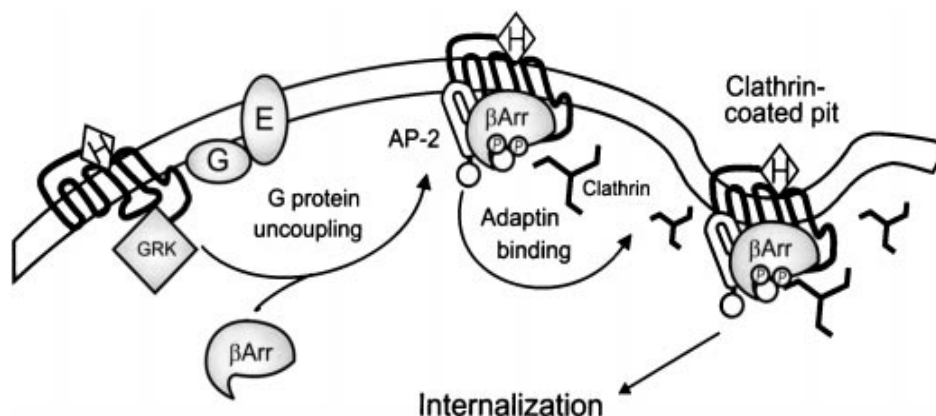
Οι G β και G γ υπομονάδες δεν μπορούν να εκφραστούν ανεξάρτητα. Υπάρχουν πέντε γονίδια που κωδικοποιούν τις G β και τουλάχιστον δώδεκα για τις G γ , δημιουργώντας έτσι μια μεγάλη ποικιλία διμερών. Ενώ οι περισσότεροι συνδυασμοί μπορούν να σχηματίσουν διμερή (Clapham και Neer, 1997), υπάρχουν και κάποιες εξαιρέσεις: π.χ η G β ₂ πρωτεΐνη μπορεί να διμεριστεί με την G γ ₂ αλλά όχι με τη G γ ₁ (Schmidt *et al.*, 1992). Στους G α _q συζευγμένους υποδοχείς εκφράζεται με μεγάλη εκλεκτικότητα το G β ₅ γ ₂ διμερές (Fletcher *et al.*, 1998), ενώ στους G α _s το G β ₄ γ ₂. Η ομολογία στην αλληλουχία που παρουσιάζουν οι G β ₁₋₄ υπομονάδες είναι τουλάχιστον 80% και είναι ευρέως κατανεμημένες σε διαφορετικούς ιστούς.

Η G β ₅ υπομονάδα είναι μέλος της οικογένειας των G β πρωτεϊνών με μόλις 50% ομοιότητα με τα υπόλοιπα τέσσερα μέλη (Watson *et al.*, 1994, Jones *et al.*, 1998). Η πιο μεγάλη εκδοχή της ονομάζεται G β _{5L}, το αμινοτελικό της άκρο είναι κατά 42 αμινοξέα πιο εκτεταμένο και εντοπίζεται μόνο στον αμφιβληστροειδή (Watson *et al.*, 1996). Η G β ₅ εκφράζεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό στον εγκέφαλο και σε μικρότερα επίπεδα στο συκώτι, στην καρδιά και στους πνεύμονες (Watson *et al.*, 1994, Jones *et al.*, 1998). Παρόλο που είναι κυρίως παρούσα στην κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων (Betty *et al.*, 1998), ένα 30%-50% μπορεί να βρεθεί διάχυτο

(Cabrera *et al.*, 1998) και στον πυρήνα των νευρώνων (Zhang *et al.*, 2001) σε αντίθεση με τις άλλες Gβ που απαντώνται μόνο συνδεδεμένες με τη μεμβράνη (Clapham, and Neer, 1997). Αυτά τα χαρακτηριστικά προσδίδουν στη Gβ5 πρόσθετο ρόλο από το σχηματισμό διμερούς με τη Gγ.

1.5. Φωσφορυλίωση και ενδοκύττωση των GPCR

Μετά την πρόσδεση του αγωνιστή, οι βγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τις GRK (G-protein coupled receptor kinase) πρωτεΐνες οι οποίες και φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς. 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. Κατόπιν της φωσφορυλίωσης δημιουργούνται θέσεις πρόσδεσης για την β-αρρεστίνη τόσο στην τρίτη ενδοκυττάρια κοιλότητα του υποδοχέα, όσο και στο καρβοξυτελικό 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 (Εικόνα 2).



Εικόνα 1.4. GRK και β-arrestin εξαρτώμενη απευαισθητοποίηση και ενδοκύττωση των GPCRs. (Ferguson, 2001).

Μόλις φτάσει στο εσωτερικό του κυττάρου διαγράφονται δύο πιθανές πορείες. Η πρώτη αφορά στη 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 αφορά στην κατεύθυνση του υποδοχέα στα λυσοσώματα όπου και αποδομείται (Moore *et al.*, 1999). Εκτός από το ρόλο τους στην ομόλογη απευαισθητοποίηση οι β-αρρεστίνες μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με πολλές σηματοδοτικές πρωτεΐνες όπως οι ERK1/2, προσδίδοντας έτσι διαφορετικές σηματοδοτικές δραστηριότητες στον υποδοχέα π.χ. μετακίνηση ενεργών MAP κινασών σε συγκεκριμένα σημεία του κυττάρου (DeFea, *et al.*, 2000).

1.5.α. GRK (G protein couples receptor kinase)

Η φωσφορυλίωση των GPCR_ς επιτυγχάνεται όταν οι GRK_ς φωσφορυλιώσουν τα αμινοξέα της σερίνης και της θρεονίνης που βρίσκονται στην τρίτη ενδοκυττάρια κοιλότητα τους και στα καρβοξυτελικά άκρα τους. Υπάρχουν επτά GRK πρωτεΐνες και η μεταφορά τους στην κυτταρική μεμβράνη είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους. Η GRK1 (rhodopsin kinase) και η GRK7 είναι κινάσες που εντοπίζονται στον αμφιβληστροειδή και συμμετέχουν στην ρύθμιση των φωτουποδοχέων (Weiss *et al.*, 1998), ενώ η GRK2 και 6 έχουν πιο ευρύ φάσμα έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούνται από τρία διαφορετικά τμήματα. Το αμινοτελικό άκρο τους είναι παρόμοιο με το RGS τμήμα των RGS (regulatory G protein signaling) πρωτεϊνών και ονομάζεται RH (RGS homology) τμήμα. Το κεντρικό καταλυτικό τμήμα τους

αποτελείται από 350 αμινοξέα και είναι συγγενές με εκείνο των PKA, PKG, PKC κινασών (Hanks και Hunter, 1995) ενώ η κύρια διαφορά τους έγκειται στο καρβοξυτελικό τμήμα τους. Η στερεοδομή των τριών τμημάτων των GRK πρωτεϊνών επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση τους με τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες. α) το RH τμήμα αλληλεπιδρά με την Gα υπομονάδα, β) το PH (pleckstrin homology) τμήμα με τις Gβγ (Shenoy και Lefkowitz, 2003) και γ) το κεντρικό τμήμα με κυτταροπλασματικές περιοχές του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα είναι η φωσφορυλίωση των υποδοχέων από τις GRK, ενώ οι τελευταίες εμποδίζουν τις Gα και Gβγ υπομονάδες να ενεργοποιήσουν τους τελεστές τους.

Η πρόσδεση του PH τμήματος στις βγ υπομονάδες των G πρωτεϊνών είναι που φέρνει τις GRK2 και GRK3 κοντά στη μεμβράνη. Επίσης η GRK2 μέσω του RH τμήματος της μπορεί να προσδεθεί *in vitro* στις Gαq και Gα11 χωρίς όμως να ασκεί GTPase δράση. Τέτοιου τύπου όμως αλληλεπίδραση δε συμβαίνει με τις Gas και Gαi υπομονάδες (Carman *et al.*, 1999).

1.5.β. β-αρρεστίνη

Οι αρρεστίνες παράγονται ενδογενώς από διάφορους τύπους κυττάρων και εκφράζονται σε όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά εμφανίζονται τέσσερις αρρεστίνες που αποτελούνται περίπου από 420 αμινοξέα. Αυτές είναι η οπτική αρρεστίνη (visual arrestin), η αρρεστίνη των κωνίων του αμφιβληστροειδούς (cone arrestin), η β-αρρεστίνη1 και β-αρρεστίνη2 (Attramadal, *et al.*, 1992). Τόσο οι οπτική όσο και η αρρεστίνη των κωνίων περιορίζουν την έκφραση

τους στα μάτια όπου μετέχουν στη ρύθμιση της σήμανσης της ροδοψίνης και φωτοψίνης (cone opsin) αντίστοιχα (Clainig *et al.*, 2002). Κατά συνέπεια, οι β-αρρεστίνη1 και 2 που βρίσκονται σε πολύ υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο και στον σπλήνα, ρυθμίζουν τις δράσεις των περισσότερων GPCRs (Sterne-Marr και Benovic, 1995).

Όλο και περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε δραστηριότητες της β-αρρεστίνης. Παρόλο που η λειτουργία της στον πυρήνα δεν είναι ακόμα κατανοητή, πιστεύεται ότι μπορεί να επιφέρει μετατροπές στην έκφραση γονιδίων, με το να ενισχύει τη μεταγραφή μερικών από αυτά. Ο πιο απλός μηχανισμός δράσης της αρρεστίνης είναι η πρόσδεση της στο ενδοκυττάριο τμήμα των GPCRs με τέτοιο τρόπο ώστε το σημείο πρόσδεσης των G πρωτεϊνών να μην είναι πλέον διαθέσιμο, συντελώντας στην αναστολή της σηματοδότησης και στην απευαισθητοποίηση των υποδοχέων (Luttrell και Lefkowitz 2002). Μια δεύτερη δράση των αρρεστίνων έγκειται στη σύνδεση των υποδοχέων με σημαντικούς παράγοντες του μηχανισμού της ενδοκύττωσης, οδηγώντας τους στο εσωτερικό του κυττάρου όπου και όπως προαναφέρθηκε καθορίζεται η πορεία τους (Goodman *et al.*, 1996). Σε κατάσταση ηρεμίας, η β-αρρεστίνη βρίσκεται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Εισέρχεται στην πλασματική μεμβράνη μετά την ενεργοποίηση και τη φωσφορυλίωση των GPCRs, όπου από το καρβοξυτελικό της άκρο, απελευθερώνονται παράγοντες του μηχανισμού ενδοκύττωσης, όπως τα AP-2 σύμπλοκα και η κλαθρίνη.

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι β-αρρεστίνες 1 και 2 συγκεντρώνονται στις συνάψεις και κυρίως στις μετα-συναπτικές δενδριτικές περιοχές. Στον εγκέφαλο

εντοπίζονται στις περιοχές της περιυδραγωγικής φαιάς ουσίας, του εγκεφαλικού φλοιού και της περιοχής του ιπποκάμπου (Gurevich *et al.*, 2002). Οι β-αρρεστίνες 1 και 2 ρυθμίζουν περισσότερους από 1000 διαφορετικούς GPCRs. Οι μ οπιοειδής υποδοχείς όμως παρουσιάζουν μεγαλύτερη συνάφεια για τη β-αρρεστίνη 2. Πειράματα που διεξήχθησαν σε εμβρυικούς ινοβλάστες μυών όπου είχε απαλειφθεί το γονίδιο της β-αρρεστίνης 1 και 2 οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο μ υποδοχέας ρυθμίζεται *in vivo* από τη β-αρρεστίνη 2 (Bohn *et al.*, 2004). Επιπλέον έρευνες ανέφεραν ότι παρόλο που η β-αρρεστίνη 1 αλληλεπιδρά με τους δ και κ υποδοχείς δεν έχει καμία δράση στους μ (Cheng *et al.*, 1998).

Οι περισσότεροι μ αγωνιστές επιστρατεύουν τη β-αρρεστίνη 2, με κάποιες εξαιρέσεις όπως η μορφίνη, η οποία καθυστερεί να την φέρει στη μεμβράνη (Bradaïa *et al.*, 2005). Πρόσθετες μελέτες που έγιναν με τη χρήση β-αρρεστίνη^{2-/-} ποντικών, έδειξαν ότι οι αναλγητικές δράσεις της μορφίνης ενισχύονται κατά την απουσία της β-αρρεστίνη² (Bohn *et al.*, 1999), ενώ αντίθετα τα μη μεταλλαγμένα ζώα, δεν αναπτύσσουν ανοχή (Bohn *et al.*, 2000). Τα *in vivo* αυτά δεδομένα προσδίδουν ένα πρόσθετο ρόλο στη β-αρρεστίνη 2, ο οποία καθίσταται σημαντική στο μηχανισμό ανάπτυξης ανοχής ως προς τη μορφίνη.

1.5.γ. ERK (extracellular signal-regulated kinases) πρωτεΐνες

Οι MAP (mitogen-activated proteins) πρωτεΐνες είναι μία ομάδα κινασών που ενεργοποιούνται μετά από ποικίλα εξωκυττάρια ερεθίσματα και ρυθμίζουν τη

σηματοδότηση του κυττάρου από τη μεμβράνη του έως τον πυρήνα (Pearson *et al.*, 2001). Σε συνδυασμό με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να διαφοροποιήσουν και να φωσφορυλιώσουν πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναφερθεί τρεις μεγάλοι υπότυποι. Η πιο γνωστή κατηγορία είναι των ERK1/ERK2 MAP κινασών (Boulton και Cobb, 1991).

Οι ERKs συμμετέχουν σε διάφορες διαδικασίες (Seeger και Krebs, 1995 Atkins *et al.*, 1998) συμπεριλαμβανομένου και στον εθισμό από οπιοειδή (Berhow *et al.*, 1996 Mazzucchelli *et al.*, 2002). Οι τέσσερις κατηγορίες των G πρωτεϊνών G_s , G_i , G_q και G_{12} ρυθμίζουν τις ERK πρωτεΐνες μέσω διαφορετικών μηχανισμών, που περιλαμβάνουν τη μεσολάβηση μορίων τελεστών (Goldsmith και Dhanasekaran, 2007). Σε κυτταρικό επίπεδο η ERK εκτός από πυρηνικές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες, μπορεί να φωσφορυλιώσει και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Ωστόσο οι κυτταρικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούν τη σηματοδότηση των MAPK ποικίλουν ανάμεσα στους διάφορους GPCR τύπους (Luttrell, 2002). Σε πολλές περιπτώσεις όμως, η ενεργοποίηση των MAPK ελέγχεται από την πρόσδεση τους σε πρωτεϊνικά ικριώματα (Burack και Shaw, 2000) όπως οι β-αρρεστίνες, οι οποίες και διασφαλίζουν την αυξημένη αποδοτικότητα της σηματοδότησης ανάμεσα στις κινάσες. Για το σύμπλοκο αυτό λίγα είναι γνωστά, αλλά ένας πιθανός ρόλος είναι η στόχευση της ERK1/2 σε μη πυρηνικά υποστρώματα που μετέχουν στη ρύθμιση του GPCR μονοπατιού.

1.5.γ.α. ERK1/2 πρωτεΐνες

Οι ERKs 1 και 2 είναι οι πιο διαδεδομένες κινάσες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Ortiz *et al.*, 1995) και εκφράζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον επικληνή πυρήνα στον κερκοφόρο πυρήνα, στον ιππόκαμπο και στο μετωπιαίο φλοιό. Παίζουν σημαντικό ρόλο σε λειτουργίες όπως η μνήμη, η μάθηση, και μπορούν να ρυθμίσουν την πυρηνική αντιγραφή, να επηρεάσουν τη λειτουργία των συστατικών της μεμβράνης ή να φωσφορυλιώσουν κυτταροπλασματικά και κυτταροσκελετικά υποστρώματα (Luttrell, 2003). Η ενεργοποίηση των GPCRs συμπεριλαμβανομένων και των μ υποδοχέων έχει ως συνέπεια και την ενεργοποίηση διαφόρων παραγόντων οι οποίοι τελικά φωσφορυλιώνουν τις ERK1 και 2 (Shah και Catt, 2004), τις οδηγούν στον πυρήνα του κυττάρου όπου και φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους μεταγραφικούς παράγοντες (Pearson *et al.*, 2001). Η καταλυτική τους δράση ρυθμίζεται από τη διπλή φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα αμινοξέα τυροσίνης και θρεονίνης.

Η σηματοδότηση των ERK έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στις ανταμοιβικές ιδιότητες των εξαρτησιογόνων φαρμάκων (Narita *et al.*, 2002). Η μορφίνη ρυθμίζει την ERK τόσο *in vivo* (Fukuda *et al.*, 1996) όσο και *in vitro* (Eitan *et al.*, 2003). Για παράδειγμα η ενεργοποίηση του μ υποδοχέα *in vitro* συντελεί στη γρήγορη αλλά μικρή σε διάρκεια ενεργοποίηση της δράσης της ERK (Li και Chang, 1996). Οι Schulz και Hollt το 1998

αναφέρανε ότι τόσο η εφάπαξ όσο και η χρόνια χορήγηση μορφίνης, συμβάλανε στη ρύθμιση της δραστηριότητας της ERK σε συγκεκριμένη περιοχή στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο η ικανότητα των ERK 1/2 να ενισχύουν τις ιδιότητες της μορφίνης αποδείχθηκε αργότερα, όπου ζώα στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο της ERK 1 παρουσίασαν υπερευαισθησία στις ανταμοιβικές ιδιότητες της μορφίνης (Mazzucchelli *et al.*, το 2002).

1.5.γ.β. ERK3/5 πρωτεΐνες

Η ERK3 είναι πυρηνική πρωτεϊνική κινάση, έχει 50% ομολογία με το καταλυτικό τμήμα των ERK1/ERK2 και δεν φωσφορυλιώνει τυπικά υποστρώματα των ERK. Διαπιστώθηκε ότι διαγονιδιακά ζώα που δεν εκφράζουν την ERK3 μπορούν να επιζήσουν καθώς θεωρείται ότι η ERK1 μπορεί να αναπληρώσει τις λειτουργίες της στα περισσότερα κύτταρα (Pages *et al.*, 1999). Η ERK5 μπορεί να ενεργοποιηθεί από ποικιλία ερεθισμάτων, όπως από EGF παράγοντες ή κάποιου τύπου κυτταρικό στρες (Kato *et al.*, 1998). Νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η παρουσία της είναι απαραίτητη στα πρώτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης και ότι χρειάζεται για την φυσιολογική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος και της επιβίωσης των κυττάρων (Yan *et al.*, 2003).

1.5.γ.γ. JNK/SAPK πρωτεΐνες και p38 κινάση

Η δεύτερη πιο καλά μελετημένη οικογένεια MAP κινασών είναι η JNK/SAPK (c-Jun kinase/stress activated protein kinase). Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται μετά την

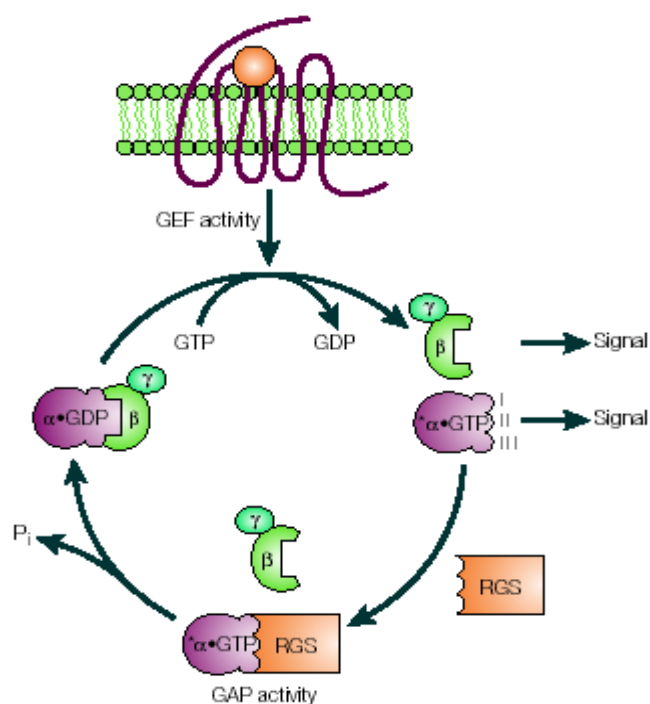
έκθεση σε UV ακτινοβολία, σε θερμικό επεισόδιο και φλεγμονώδεις κυτοκίνες μέσω δύο μικρών G πρωτεϊνών, των Rac και cdc42 (Oltmanns *et al.*, 2003).

Η p38 κινάση είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας των MAP κινασών. Ενεργοποιείται σε απάντηση παρουσίας ενδοτοξινών και οσμωτικού στρες, μετά τη φωσφορυλίωση της από τη MKK3 και παρουσιάζει ομολογία με τις ERKs κατά 50%. Προάγει την έξοδο από τη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων (Nebreda και Porras 2000) ενώ στην ενεργή μορφή της φωσφορυλιώνει κάτωθεν σηματοδοτικά μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιομυϊκή διαφοροποίηση και υπερτροφία (Liang και Molkentin 2003).

1.6. RGS (regulators of G protein signaling) πρωτεΐνες

Η μακροπρόθεσμη πρόσδεση των G υπομονάδων με τις RGS πρωτεΐνες πιθανόν να παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην απευαισθητοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων. Οι RGS πρωτεΐνες ρυθμίζουν την ένταση και τη δραστηριότητα της G πρωτεΐνης μετά την ενεργοποίηση των μ 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 1.5. Ο ρόλος των RGS πρωτεϊνών στη σηματοδότηση των GPCRs (Neubig και Siderovski 2002).



Προσδένονται απευθείας με τη μεταβατική δομή της Ga υπομονάδας (Burchet, 2003) και επιταχύνοντας την υδρόλυση του GTP (Berman και Gilman, 1998, Ross και Wilkie, 2000) επαναφέρουν τους GPCRs στην ανενεργή τους κατάσταση (Εικόνα 3). Κατά αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν τη σηματοδότηση υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες.

Οι RGS όταν αρχικά ανακαλύφθηκαν στο *Caenorhabditis elegans* (EGL10) (Koelle και Horvitz, 1996) και στο *Saccharomyces cerevisiae* (Sst2p) (Dohlman και Thorner, 1997) θεωρήθηκαν αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών. 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 120 αμινοξέα (Koelle και Horvitz, 1996) και ασκεί τη δράση του μέσω της πρόσδεσης του στη προσδεμένη GTP μορφή Ga υπομονάδων και επιταχύνει τον τερματισμό της διέγερσης των μορίων τελεστών. Παρόλα αυτά, λόγω του μεγάλου αριθμού των γνωστών RGS πρωτεϊνών, ακολούθησε το εξής ερώτημα: με ποιο τρόπο επιτυγχάνεται η ειδίκευση στην RGS σηματοδότηση. Πρώτοι οι Gold *et al.*, το 1997 απέδειξαν ότι υπάρχει ειδικευμένη έκφραση των RGS υποτύπων κατά περιοχή, το οποίο συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα.

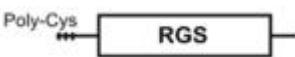


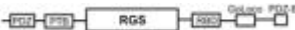

Πίνακας 1.2. Η συγκεκριμένη έκφραση διαφόρων RGS πρωτεϊνών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Neubig και Siderovski, 2002).

RGS gene	Basal CNS expression pattern
RGS2	Cerebral cortex; striatum; hippocampus; amygdala; thalamic and hypothalamic nuclei; pontine, interpeduncular and dorsal raphe nuclei ^{42,35}
RGS4	Cerebellar Purkinje-cell layer; cortex; amygdala; striatum; thalamus; pyramidal cell layer of hippocampus ^{41,42}
RGS5	Hypothalamic paraventricular and supra-optic nuclei; basomedial amygdala; glia; brain-capillary endothelium; choroid plexus ⁴¹
RGS7	Cerebral neocortex; pyriform cortex; thalamus; hypothalamus; hippocampus; amygdala; cerebellar granule-cell layer; retina ^{41,42}
RGS9-1	Retina (rod and cone photoreceptors) ^{54,55}
RGS9-2	Striatum; hypothalamic nuclei ³³
RGS10	Parietal neocortex layers II and III; dentate gyrus granule cells; dorsal raphe ⁴¹

Οι RGS έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 5 μεγάλες υπο-οικογένειες (Πίνακας 1.6.1). 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:

Πίνακας 1.3. Κατηγοριοποίηση των RGS υπο-οικογενειών και των δομικών χαρακτηριστικών τους (Goldsmith και Dhanasekaran, 2007).

Subfamily	Members	Representative Protein	Common Features Outside
		Structure	RGS Domain
RZ / A	GAIP/RGS19, RGSZ1/RGS20, RGSZ2/RGS17, Ret-RGS1		N-terminal cysteine string
R4 / B	RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16, RGS18, RGS21		N-terminal amphipathic α -helix, or without any specified domains
R7 / C	RGS6, RGS7, RGS9, RGS11		N-terminal DEP and GGL domains may contain PDZ, PTB,
R12 / D	RGS10, RGS12, RGS14		RBD, GoLoco, and PDZ-binding domains
RA / E	Axin, Conductin		GSK binding, β -catenin binding, PP2A homology, and dimerization domains

Η A/RZ υπο-οικογένεια αποτελείται από τις πρωτεΐνες RGSZ1 (ή RGSZ20), RGSZ2 (ή RGS17), RGS19 (ή GAIP) και RET-RGS1 (retinal-specific RGS protein) (Siderovski και Willard, 2005). Τα μέλη της A/RZ εκτός από το συντηρημένο RGS τμήμα περιέχουν στο αμινοτελικό άκρο τους μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες (cysteine string motif). Αυτή η περιοχή παλμιτολιώνεται και πιθανόν να εμπλέκεται τόσο στην πρόσδεση τους στη μεμβράνη όσο και στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες (Jones, 2004).

Η υπο-οικογένεια B ή R4 αποτελείται από μικρές πρωτεΐνες οι οποίες είναι: RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16, RGS18 και RGS21 και θεωρείται η μεγαλύτερη στην οικογένεια των RGS (Druey *et al.*, 1996, Hollinger και Hepler, 2002). Οι RGS4, 5, 16 έχουν επίσης στο αμινοτελικό άκρο τους μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες η οποία και παλμιτολιώνεται παίζοντας ρόλο στη πρόσδεση τους στη μεμβράνη. Οι περισσότερες RGS αυτής της υποοικογένειας δρουν σαν GAPs για τις Gαq και Gai/o πρωτεΐνες (De Vries *et al.*, 2000, Ross και Wilkie, 2000).

Η D ή αλλιώς R12 υπο-οικογένεια αποτελείται από τρία μόνο μέλη: τις RGS10, RGS12 και RGS14. Η RGS10 είναι μικρή πρωτεΐνη των 173 αμινοξέων και χαρακτηρίζεται από ένα πολύ μικρό αμινοτελικό άκρο, αλλά και από ότι το RGS τμήμα της ομοιάζει αυτό της RGS4. Οι RGS12 και RGS14 είναι μεγαλύτερες πρωτεΐνες και εμπεριέχουν πρόσθετα τμήματα, όπως το RDB (Ras-binding), το Gi/o-LoCo, το PTB (Phosphotyrosine binding) και το PDZ (PSD-95/Disk-Large/ZO-1) (Siderovski και Willard, 2005).

Ε ή RA είναι η υποοικογένεια των RGS που αποτελείται από δύο μέλη, την Axin και την Conductin. Παρόλο που και οι δύο πρωτεΐνες εμπεριέχουν το RGS συντηρημένο τμήμα, δεν έχει αποδειχθεί ποτέ η δράση τους ως GAPs ή αρνητικών ρυθμιστών ως προς τις αποκρίσεις των G πρωτεϊνών (Siderovski και Willard, 2005). Ωστόσο μία μελέτη υποστηρίζει ότι υπάρχει απευθείας αλληλεπίδραση του RGS τμήματος της Axin με τις Gas υπομονάδες (Castellone *et al.*, 2005).

Οι RGS πρωτεΐνες είναι βασικοί ρυθμιστές σηματοδότησης που εξαρτάται από τους GPCR, συμπεριλαμβανομένων και των δεύτερων αγγελιοφόρων. Λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλομορφία τους είναι σαφές ότι η λειτουργία των RGS υπερβαίνει τον ρόλο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Αλλαγές στην έκφραση των RGS πρωτεϊνών ή των mRNA επιπέδων τους έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθήσεις σε ανθρώπους (Πίνακας 4). Στην περίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας τα επίπεδα της RGS3 και 4 αυξάνονται (Owen *et al.*, 2001), μειωμένο mRNA της RGS4 σχετίζεται με σχιζοφρένεια (Mirnics *et al.*, 2001), ενώ έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα της RGS9 στην περιοχή του ραβδωτού σε εγκέφαλους ασθενών με Parkinson (Tekumalla *et al.*, 2001).

Πίνακας 1.6.2. Πιθανές δράσεις των RGS πρωτεϊνών σε κλινικές παθήσεις (Neubig and Siderovski 2002).

Alzheimer's disease	Selectively enhance M ₁ muscarinic effects on cognitive function by inhibition of G _q -specific RGS proteins, such as RGS2, in septohippocampal brain regions
Depression	Enhance catecholamine and/or serotonin-agonist signalling
Epilepsy	Enhance presynaptic inhibition by GABA _B receptors and α ₂ -adrenoceptors
Parkinson's disease	Enhance dopamine D ₂ -receptor signalling by inhibition of RGS9-2, which is expressed at high levels in basal ganglia
Pain	Potentiate endogenous opioid action; permit lower doses of synthetic opioid analgesics and decrease physiological tolerance by reduced receptor downregulation
Spasticity	Prolong GABA _B -receptor signalling and inhibition of presynaptic neurotransmitter release

1.7. R7 υποοικογένεια των RGS πρωτεϊνών

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει δοθεί στην R7 υπο-οικογένεια των RGS πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις RGS6, RGS7, RGS9 και RGS11 (Burns και Wensel 2003). Τα μέλη της συγκεκριμένης υποοικογένειας στο κεντρικό νευρικό σύστημα συσχετίζονται κυρίως με τις κυτταρικές μεμβράνες. Εκτός από την RGS9-2 τα υπόλοιπα μέλη της R7 οικογένειας εκφράζονται στον εγκέφαλο σε μικρές συγκεντρώσεις με εξαίρεση την RGS7 που εκφράζεται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στον υπομέλανα τόπο (locus coeruleus) και μετρίως στον επικλινή πυρήνα (Gold *et al.*, 1997). Οι RGS-R7 πρωτεΐνες έχουν αρνητική ρυθμιστική δραστηριότητα ως προς τη σήμανση που ξεκινάει από τους μ υποδοχείς, για αυτό και συμμετέχουν στην ανάπτυξη ανοχής μετά τη επίδραση των αγωνιστών (Zachariou *et al.*, 2003).

1.7.α. DEP (Disheveled, Egl-10 και Pleckstrin ομολογία) τμήμα των RGS

Εκτός από το συντηρημένο RGS τμήμα, οι R7 πρωτεΐνες περιέχουν ένα DEP τμήμα στο αμινο-τελικό άκρο τους που ακολουθείτε από ένα GGL (G-protein Gamma-subunit Like) τμήμα (Εικόνα 4). Παρόλο που η λειτουργία του DEP τμήματος δεν είναι απόλυτα γνωστή, έχει δειχθεί ότι το GGL τμήμα αντιπροσωπεύει ένα σημείο πρόσδεσης για το πέμπτο μέλος της ετεροτριμερούς β-υπομονάδας των G- πρωτεϊνών.



Εικόνα 1.6. Η δομή των πρωτεϊνών της R7 οικογένειας.

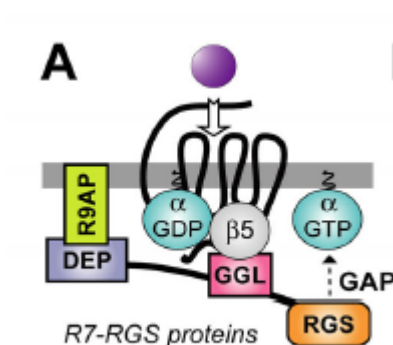
Τα DEP τμήματα αποτελούνται από 70 αμινοξέα και εντοπίζονται σε πολλές σηματοδοτικές πρωτεΐνες (Ballon *et al.*, 2006), από τις οποίες 67 βρίσκονται στο ανθρώπινο γένομα (Martemyanov *et al.*, 2003). Οι πρωτεΐνες που περιέχουν το DEP τμήμα ρυθμίζουν ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών λειτουργιών και μολονότι σε πολλές περιπτώσεις τα τμήματα αυτά περιγράφονται ως αγνώστου λειτουργίας, νεώτερα στοιχεία δείχνουν ότι σηματοδοτικές πρωτεΐνες μπορεί να βασίζονται σε αυτά για την σύνδεση τους με τις πλασματικές μεμβράνες (Hoffman *et al.*, 2000) (Εικόνα 5). Ερευνητές παρήγαγαν διαγονιδιακά ζώα στα οποία η RGS9 είχε αντικατασταθεί από την μεταλλαγμένη μορφή της, της οποίας έλειπε το DEP τμήμα (Martemyanov *et al.*, 2003). Χρησιμοποιώντας ραβδία σαν μοντέλο, η ίδια ομάδα έδειξε ότι όταν η μεταλλαγμένη RGS9 εκφράζεται στα ραβδία και παρόλο που βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα, εξαλείφεται παντελώς από τα εξωτερικά τμήματα. Έτσι πρότειναν ότι η μεταφορά της RGS9 στα εξωτερικά τμήματα των ραβδίων διαμεσολαβείται πιθανότατα από το DEP τμήμα της.

1.7.β. G-protein Gamma-subunit Like (GGL) τμήμα των RGS

Εκτενής έρευνα έχει γίνει και σε ότι αφορά το G-protein Gamma-subunit Like (GGL) τμήμα και στις RGS πρωτεΐνες που το εμπεριέχουν. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το GGL τμήμα αποτελεί σημείο πρόσδεσης για το πέμπτο μέλος της ετεροτριμερούς β-υπομονάδας των G πρωτεϊνών (Snow *et al.*, 1998). Οι υπόλοιπες Gβ υπομονάδες δεν μπορούν να προσδεθούν με τις RGS6, RGS7, RGS9 και RGS11 (Snow, *et al.*, 1998). Η ισχυρή αλληλεπίδραση της Gβ5 με το GGL τμήμα της R7 υποοικογένειας είναι

απαραίτητη για τη σταθερότητα και των δύο μελών του συμπλόκου. Δεδομένη της μεγάλης ομολογίας στην αλληλουχία των αμινοξέων του GGL τμήματος και των Gγ υπομονάδων, θεωρείται πιθανό, η αλληλεπίδραση της Gβ5 με τις RGS πρωτεΐνες να γίνεται με τρόπο δομικά ανάλογο της Gβ-Gγ αλληλεπίδρασης (Sondek και Siderovski, 2001).

Εικόνα 1.7. Στρατηγική πρόσδεσης στη μεμβράνη από την R7 υποοικογένεια των RGS πρωτεϊνών (Siderovski και Willard 2005).

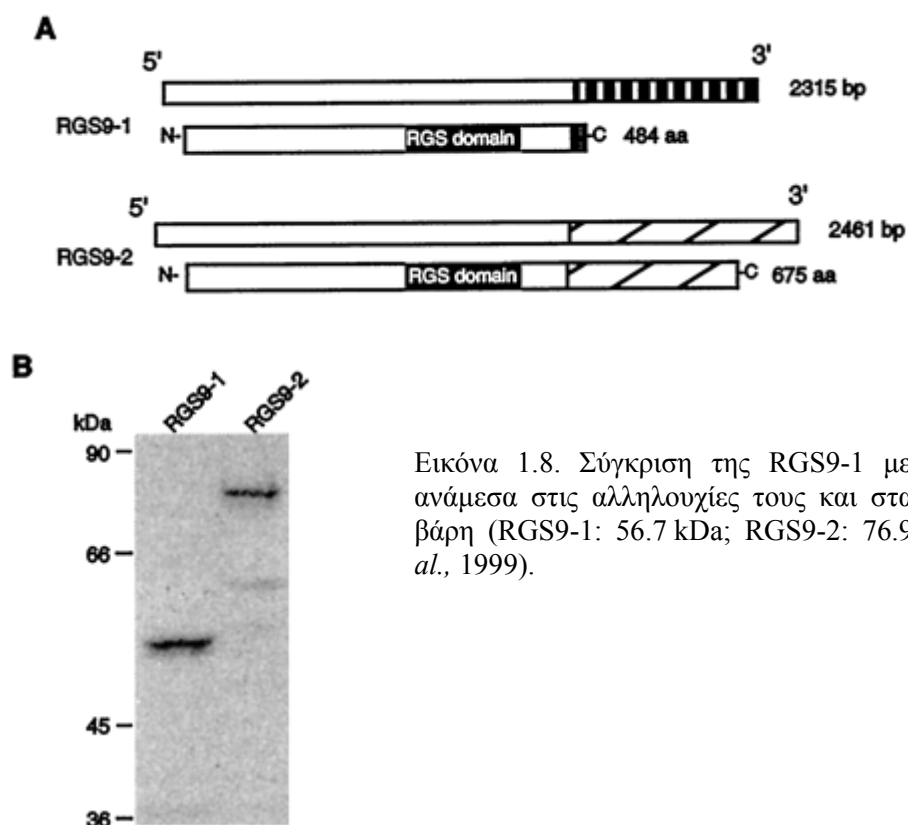


1.8. RGS9 πρωτεΐνη

Το μοντέλο έκφρασης για ένα από τα μέλη της R7 οικογένειας, της RGS9, παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το mRNA της RGS9 βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα σε περιοχές του εγκεφάλου που παίζουν ρόλο στην αναλγησία και τον εθισμό από οπιοειδή, όπως το ραβδωτό, συμπεριλαμβανομένου του επικληνή πυρήνα, με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται σε όλο τον υπόλοιπο εγκέφαλο (Rahman *et al.*, 1999). Το 1998, ερευνητές κλωνοποίησαν το cDNA της RGS9 από βιβλιοθήκες cDNA αμφιβληστροειδούς ποντικού και βοός για να βρουν τελικά ότι η πρωτεΐνη και το mRNA της εκφράζονται μόνο σε κύτταρα-φωτουποδοχείς στον αμφιβληστροειδή (Cowan *et al.*, 1998). Εκεί η RGS9 αναγνωρίστηκε ως η GAP πρωτεΐνη για την οπτική πρωτεΐνη transducin. Έτσι και ενώ παρόμοιες δράσεις της RGS9 δεν είχαν ακόμη

αναφερθεί για το ραβδωτό, οι έρευνες στράφηκαν στον ρόλο του RGS9 γονιδίου σε αυτήν την περιοχή. Ο Rahman *et al.*, το 1999 αναφέρανε την αναγνώριση ενός cDNA για την RGS9 που κωδικοποιούσε μια διαφορετική πρωτεΐνη από εκείνη που είχε ήδη απομονωθεί από τον αμφιβληστροειδή, με αποκλειστική κατανομή στον εγκέφαλο. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε RGS9-2 (Εικόνα 1.8).

Η RGS9-2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά σε περιοχές του εγκεφάλου που νευρώνεται από ντοπαμινεργικούς νευρώνες όπως ο επικληνής πυρήνας (Granneman *et al.*, 1998). Περιέχει μια αλληλουχία 205 αμινοξέων πλούσια σε προλίνη στο καρβοξυτελικό άκρο της η οποία είναι παρόμοια με το PDEγ, το οποίο και μιμείται προκειμένου να επιτύχει περαιτέρω συνάφεια με τις Gα υπομονάδες (Martemyanov *et al.*, 2003).



Εικόνα 1.8. Σύγκριση της RGS9-1 με την RGS9-2 A) ανάμεσα στις αλληλουχίες τους και στα B) μοριακά τους βάρη (RGS9-1: 56.7 kDa; RGS9-2: 76.9 kDa) (Rahman *et al.*, 1999).

Ο φυσιολογικός ρόλος της αλληλουχίας αυτής δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι πιθανώς παίζει ρόλο στην εκλεκτικότητα υποστρώματος (Martemyanov *et al.*, 2003) ή στον προσανατολισμό στον πυρήνα του κυττάρου (Bouhamdan *et al.*, 2004). Στην περίπτωση της RGS9-1 στο C άκρο υπάρχει το ένζυμο της φωσφοδιεστεράσης που δρα σαν ‘προσαρμοστής συγγένειας’ (affinity adapter), ώστε να αυξηθεί η συγγένεια του RGS τμήματος για την Gat. (Tsang *et al.*, 1998).

Η περιοχή του ραβδωτού όπου εκφράζεται η RGS9-2 σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις, είναι πλούσια σε ντοπαμίνη, για αυτό και η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη ρύθμιση των δράσεων τόσο ντοπαμινεργικών αγωνιστών όσο και των οπιοειδών. Το περιορισμένο μοτίβο έκφρασης της RGS9-2 υποδηλώνει ότι ασκεί συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Προηγούμενες μελέτες (Zachariou *et al.*, 2003) έδειξαν ότι ζώα στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο της RGS9, παρουσιάζουν αυξημένη κατά 10 φορές περίπου την ανταμοιβική δράση της μορφίνης συγκριτικά με τα μη μεταλλαγμένα ζώα. Επιπλέον εμφανίζουν ενισχυμένη αναλγητική απόκριση από τη μορφίνη και καθυστέρηση ανάπτυξης ανοχής καθώς και πολύ έντονη εξάρτηση από τη μορφίνη. Μετά από μια σειρά συμπεριφερικών πειραμάτων, η ίδια ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι η ικανότητα που έχει η χορήγηση εφάπαξ μορφίνης να αυξάνει τα επίπεδα της RGS9-2 στον επικληνή πυρήνα, δρα και σαν είδος μηχανισμού απευαισθητοποίησης (Zachariou *et al.*, 2003).

Εκτός από ρόλο της RGS9-2 στην ανάπτυξη ανοχής ως προς τη μορφίνη (Zachariou *et al.*, 2003), υπάρχουν επίσης αναφορές που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα έκφρασης της αλλάζουν κατά την εκδήλωση της νόσου του Parkinson (Tekumalla *et al.*, 2001). Τα δεδομένα αυτά κατέστησαν την RGS9-2 ως ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη ρύθμιση της νευρωνικής λειτουργίας και συμπεριφοράς. Ωστόσο ο εντοπισμός της RGS9-2 και η λειτουργία της μέσα στο κύτταρο δεν είναι απόλυτα γνωστά.

1.9. Διασυνδεδετικές πρωτεΐνες των RGS πρωτεϊνών

Για πολλές από τις RGS, ο εντοπισμός τους στην κυτταρική μεμβράνη είναι απαραίτητος για την περαιτέρω αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες μέσω των οποίων ασκούν την δράση τους. Το γεγονός αυτό καθιστά σαφές πως η λειτουργία των RGS ποικίλει. Στη συνέχεια παρεντίθενται κυτταρικές πρωτεΐνες, διασυνδεδετικές ή ικριώματα που προσδέονται εκλεκτικά στο N ή C άκρο, ή ακόμα και σε άλλες περιοχές των RGS πρωτεϊνών και συνδέονται με GPCRs, G πρωτεΐνες ή μόρια τελεστές. Οι διασυνδεδετικές πρωτεΐνες μπορούν να ενισχύσουν ή και να τροποποιήσουν την εκλεκτικότητα των RGS.

1.9.α. R7 πρωτεΐνη πρόσδεσης (R7BP) και R9 διασυνδεδετική πρωτεΐνη (R9AP)

Η R7 οικογένεια των RGS πρωτεϊνών μπορεί να προσδεθεί με την R7BP πρωτεΐνη η οποία είναι συγγενής της μεμβρανικής R9AP (RGS9-1-anchor protein) πρωτεΐνης που αυξάνει την GTPase δραστηριότητα της RGS9-1 κατά 70 φορές. (Martemyanov και

Arshavsky, 2002, Martemyanov *et al.*, 2003). Οι R7BP και R9AP είναι πρωτεΐνες στις οποίες οι R7-RGS προσδένονται μέσω του DEP τμήματος τους (Martemyanov *et al.*, 2003). Δομικά και οι δύο μοιάζουν με την υποοικογένεια των syntaxin των πρωτεϊνών SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) (Hu και Wensel, 2002). Συγκεκριμένα η R7BP εκφράζεται στο νευρικό σύστημα και αλληλεπιδρά με όλα τα R7 μέλη, καθορίζοντας την εκλεκτικότητα τους (Drenan *et al.*, 2005).

1.9.β. Η πρωτεΐνη spinophilin

Η spinophilin ή αλλιώς neurabin II, αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στις δενδριτικές άκανθες. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η πρωτεϊνική φωσφατάση1 (PP-1) (Allen *et al.*, 1997)) η οποία και ρυθμίζει τη δραστηριότητα διαφόρων καναλιών όπως και τους γλουταμικούς υποδοχείς (Greengard *et al.*, 1999). Οι δενδριτικές άκανθες είναι προεξοχές που προέρχονται από τα δενδριτικούς άξονες και λαμβάνουν την πλειοψηφία των εισερχόμενων διεγέρσεων (excitatory input) στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Harris και Kater, 1994). Μετατροπές στον αριθμό, στο μέγεθος και στο σχήμα των δενδριτικών ακανθών έχουν συσχετιστεί με τη μάθηση και με αναπτυξιακές (Boyer *et al.*, 1998) ή ορμονικές μεταβολές (Murphy και Segal, 1996). Υποστηρίζεται ότι αλλαγές στη συναπτική δραστηριότητα μπορεί να προκαλέσουν μορφολογικές αλλαγές των δενδριτικών ακανθών (Maletic-Savatic *et al.*, 1999) που επηρεάζουν τις βιοχημικές τους ιδιότητες (McKinney *et al.*,

1999) ρυθμίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της συναπτικής μετάδοσης (Fischer *et al.*, 1998).

Μελέτες συμπεριφοράς που ολοκληρώθηκαν σε spinophilin^{-/-} ποντίκια, έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα ζώα αναπτύσσουν ανοχή, εξάρτηση και αυξημένη ευαισθητοποίηση στις ανταμοιβικές δραστηριότητες της μορφίνης (Charlton *et al.*, 2008). Σε κυτταρικό επίπεδο, στο ραβδωτό, η spinophilin αλληλεπιδρά με τον μ υποδοχέα των οπιοειδών μεσολαβώντας έτσι στη ρύθμιση της σηματοδότησης και της ενδοκύττωσης του (Charlton *et al.*, 2008).

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). Συγκεκριμένα προσδέεται στις RGS1, RGS2, RGS4, RGS16 και GAIP/RGS19. Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι προσδέεται στην τρίτη ενδοκυττάρια κοιλότητα των α₂ 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. Δηλαδή οδηγεί στη μείωση της ενδοκύττωσης του υποδοχέα και της δραστηριότητας της MAPK (Wang *et al.*, 2004).

1.10. Ερευνητικός σκοπός

Η έκθεση στα οπιοειδή συχνά οδηγεί σε ανάπτυξη ανοχής και εξάρτησης, πιθανόν λόγω αλλαγών στη σύνθεση μοριακών συμπλοκών που είναι απαραίτητα για την ομαλή σηματοδότηση MOR. Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης είναι η κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η RGS9-2 πρωτεΐνη, συμβάλλει στις αλλαγές στη σηματοδότηση του MOR μετά τη χρήση μορφίνης και άλλων οπιοειδών. Επιπλέον η γνωστοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που έπονται της ενεργοποίησης του MOR, μπορεί να συνδράμει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την βελτίωση της αναλγητικής απόκρισης προς τα οπιοειδή και στην καθυστέρηση ανάπτυξης ανοχής.

Πιο συγκεκριμένα με τη χρήση μοντέλων κυτταροκαλλιέργειας μελετήθηκε κατά πόσο η RGS9-2 επηρεάζει σηματοδοτικά γεγονότα και την κατανομή του MOR στο κύτταρο. Με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων ταυτοποιήθηκαν τα σηματοδοτικά μόρια που είτε επηρεάζονται από την RGS9-2 είτε αλληλεπιδρούν άμεσα μαζί της και συμβάλλουν στην δραστικότητα και απευαισθητοποίησης του MOR, κατόπιν εφάπαξ ή χρόνια χορήγησης οπιοειδών.

Σε αυτήν την μελέτη, παρέχουμε στοιχεία στα οποία η διαμόρφωση των οπιοειδών αποκρίσεων από την RGS9-2 περιλαμβάνει έναν σύνθετο μηχανισμό, που εξαρτάται από τον εκάστοτε αγωνιστή. Τα συμπεράσματά μας προτείνουν ότι RGS9-2 κατέχει έναν ουσιαστικό ρόλο α) στους αναλγητικούς μηχανισμούς μετά την χορήγηση οπιοειδών, β) στην ανοχή, διαμορφώνοντας τη διάρκεια της σηματοδότησης και επηρεάζοντας το ρυθμό ενδοκύττωσης των MOR. Η παρουσία της RGS9-2 στην μεμβράνη συντελεί στον αργό ρυθμό ενδοκύττωσης των υποδοχέων, καθυστερώντας

την ανακύκλωση τους, οδηγώντας στην απευαισθητοποίηση τους, αναπτύσσοντας έτσι ανοχή στην αναλγητική δράση της μορφίνης. Ωστόσο ο κάθε αγωνιστής συμβάλλει στη ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μηχανισμών μέσα στο κύτταρο, που ξεκινούν από την επιστράτευση διαφορετικών G πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό επηρεάζει και τη δράση της RGS9-2 προσδίδοντας της πρόσθετο ρόλο από την GTPase λειτουργία της.

Κατέχοντας ρόλο κλειδί στο μηχανισμό απευαισθητοποίησης των υποδοχέων, η RGS9-2 μπορεί να αποτελέσει ένα καινούριο φαρμακευτικό στόχο για την ανάπτυξη ουσιών που μπορούν να συγχωρηγηθούν μαζί με τη μορφίνη για την επίτευξη της αναλγησίας και την πρόληψη ανάπτυξης ανοχής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μοριακές μέθοδοι

2.1.1. 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 διαλύμα: 36ml γλυκερόλης, 12 gr PEG 8000, 1.2ml 1M MgSO₄, 60ml LB

Από απόθεμα βακτηριακών κυττάρων (σειρές DH10b) που φυλάσσονται στους -80°C ή από αποικία κυττάρων σε τριβλίο Petri, ελήφθησαν μεμονωμένα κύτταρα τα οποία και επώαστηκαν σε 3ml θρεπτικό 2XYT, υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για ~16 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια των 3 ml μεταφέρθηκε φλάσκα που περιείχε 100ml θρεπτικού 2XYT και επώαστηκε υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C. Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν στη mid log phase (O.D.600 = 0.5). Έπειτα η φλάσκα τοποθετήθηκε σε πάγο για 10 λεπτά μαζί με δύο σωληνάρια χωρητικότητας των πενήντα ml. Η καλλιέργεια αφού χωρίστηκε στα 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 φυλάχτηκαν στους -80 βαθμούς Κελσίου.

2.1.2. DNA κατασκευές

Το EGFP-RGS9-2 πλασμίδιο χορηγήθηκε από τον E.J. Nestler (UT Southwestern Medical Center, Dallas TX), το HA-MOR από τον M. Von Zastrow (UCSF, San Francisco CA), το Gβ5

από τον A. Krumins (UT Southwestern Medical Center, Dallas TX) και το DEPlless RGS9-2 δόθηκε από τον A. Konoor (Caltech, CA).

2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων DH10B της E. coli (transformation)

Υλικά:

Tryptone, NaCl, Agar, Αμπικιλίνη (Sigma),

Yeast extract (Scharlau)

Διαλύματα:

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

2XYT-άγαρ:

Σε σωληνάριο erppendorf 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.

2.1.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure)

Υλικά:

Γλυκόζη (Merck),

Tris, EDTA, NaOH, SDS, glacial acetic acid, NaCl, οξικό κάλιο (Sigma)

Διαλύματα:

A) Διάλυμα εναιώρησης κυττάρων (solution 1):

50mM γλυκόζης, 25mM TrisCL pH 8, 10mM EDTA pH 8

B) Διάλυμα λύσης κυττάρων (solution 2):

200mM NaOH, 1% SDS

Γ) Διάλυμα ουδετεροποίησης (solution 3):

3.1M οξικού καλίου (pH 5.5) και glacial acetic acid

Για τον έλεγχο των DNA κατασκευών αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της απομόνωσης DNA από βακτηριακές αποικίες σε μικρή κλίμακα. Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων με την επιθυμητή πλασμίδιο-DNA κατασκευή, οι βακτηριακές αποικίες που αναπτύχθηκαν καλλιεργούνται περαιτέρω, τοποθετώντας την κάθε μια σε 3ml θρεπτικού 2XYT με αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλίνη). Οι αποικίες ελήφθησαν από το τριβλίο με τη χρήση αποστειρωμένων κίτρινων ρύγχων και καλλιεργήθηκαν σε 3ml LB-αντιβιοτικό, για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. 1.5ml από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Eppendorf). Το υπερκείμενο απομονώθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος εναιώρησης κυττάρων. Ύστερα στα κύτταρα προστέθηκαν 200μl διαλύματος λύσης και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 150μl κρύου διαλύματος ουδετεροποίησης και μετά από πεντάλεπτη επώαση στον πάγο, προστέθηκαν 200μl χλωροφορμίου και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf. Μετά τη φυγοκέντρωση η πάνω φάση μεταφέρθηκε σε καθαρά σωληνάρια, όπου και προστέθηκε μίγμα φαινόλης-χλωροφορμίου σε ίσο όγκο με αυτόν του δείγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4°C. Για άλλη μια φορά η πάνω φάση μεταφέρθηκε σε καθαρά σωληνάρια, όπου και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίστηκε με 1/10 του όγκου του δείγματος NaAc και διπλάσιο του

όγκου 100% αιθανόλης. Τα δείγματα αφέθηκαν για 20 λεπτά στους -80°C και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου τα δείγματα ξηράνθηκαν υπό κενό και το DNA επαναδιαλύθηκε σε 30μl αποστειρωμένου nanopure νερού που περιείχε RNase (10mg/ml).

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

Διαλύματα:

A) Διάλυμα εναιώρησης κυττάρων (P1):

50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, RNase 100μg/ml

B) Διάλυμα λύσης κυττάρων (P2):

NaOH 0.2M, 1% w/v SDS

Γ) Διάλυμα ουδετεροποίησης (P3):

3M οξικό οξύ pH 5.5

Δ) Διάλυμα εξισορρόπησης (QBT):

50mM MOPS pH 7.0, 0.75M NaCl, 0.15% v/v Triton X-100, 15% v/v αιθανόλη

E) Διάλυμα Πλύσης (QC):

50mM MOPS pH 7.0, 1M NaCl, 15%v/v αιθανόλη

ΣΤ) Διάλυμα Εξαγωγής (QF):

10mM Tris-HCl pH 8.5, 1.25M NaCl, 15% v/v αιθανόλη

H) Διάλυμα TE):

10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0

Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφία σε στήλη Qiagen-tip 500 χρησιμοποιώντας το σύστημα Qiagen Plasmid Maxi Kit με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Τα βακτήρια

αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια των 250ml για 16 ώρες και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 5.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10ml διαλύματος P1 και λύση με προσθήκη 10ml διαλύματος P2 και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια ακολούθησε η πρόσθεση 10ml κρύου διαλύματος P3 και η επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34), όπου και επιτευχθεί η απομάκρυνση χρωμοσωμικού DNA και υπολειμμάτων. Η στήλη Qiagen-tip 500 εξισορροπήθηκε με 10ml διαλύματος QBT. Το υπερκείμενο διαβιβάστηκε στην κολώνα, όπου και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 30ml διαλύματος QC. Η έκλουση του DNA από τη στήλη πραγματοποιήθηκε μετά την πρόσθεση 15ml διαλύματος QF. Η κατακρήμνιση του DNA ολοκληρώθηκε με την προσθήκη 10.5ml ισοπροπανόλης και στη συνέχεια με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα ξηράνθηκε και επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος TE. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm ενώ η ποιότητά του εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.6. 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. Το μείγμα TAE και αγαρόζης θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστέθηκε 1X βρωμιούχο αιθίδιο (10.000X stock).

Το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1X TAE. Η αποτύπωση του αποτελέσματος έγινε με έκθεση της πηκτής επάνω σε τράπεζα UV ακτινοβολίας και φωτογράφησης με κάμερα.

2.1.7. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αφορά την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή θραύσματος DNA) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων το καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικά με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος δεδομένου ότι το τελικό προϊόν μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Η επώαση γίνεται σε συσκευή PCR και η αντίδραση περιλαμβάνει διαδοχικά την αποδιάταξη του cDNA στους 94°C, την ψύξη του στους 61°C προκειμένου να επικολληθούν οι εκκινητές στα συμπληρωματικά τμήματα του DNA και την σύνθεση της αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από τους εκκινητές, τα ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs) και την πολυμεράση.

Η πολυμεράση χρησιμοποιεί το μονόκλωνο μόριο DNA για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου, το οποίο και παράγεται από δίκλιωνα μόρια DNA όταν αυτά θερμανθούν σε υψηλές θερμοκρασίες. Το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού μορίου, του εκκινητή. Για κάθε αντίδραση PCR επιλέγονται εκκινητές εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να αντιγραφεί. Ο κλώνος που συντέθηκε τελευταία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου στον επόμενο κύκλο ενίσχυσης.

Η PCR εφαρμόστηκε για την εξακρίβωση των RGS9^{+/+} (αγρίου τύπου) και RGS9^{-/-} (KO) ζώων.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε αντιπαρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 1: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

ddH ₂ O	10.8 μl
Betaine	5 μl
10x Buffer (w/o MgCl)	2.5 μl
25mM MgCl	1.25 μl
2mM dNTPs	2.5 μl
P1 (reverse)	0.6μl
P2 (wt forward) P3 (ko forward)	0.6 μl 0.6 μl
Taq	0.5 μl
DNA	0.8 μl

Πίνακας 2: Πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της RGS9

PCR PROGRAM:		
Step 1	94oC	3min
Step 2	94oC	1min
Step 3	61oC	1min
Step4	72oC	1min
Step5	Go to step 2	35x
Step6	72oC	10min
Step7	4oC	for ever

P1: GTAACAGCTGCTGTTCCAAAATCG

P2: TGCATTCTGACTAAAGTCTCTGGG

P3: CGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCA

2.2. Κυτταρικές μέθοδοι

2.2.1. Κυτταρικές σειρές - Πρωτογενείς καλλιέργειες

Υλικά:

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

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

Ορός αλόγου (HS): (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

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

Τρυψίνη-EDTA: (Gibco)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή (Neubauer)

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

DMSO (Sigma, USA)

Trypan Blue χρωστική (Seromed Biochrom, Germany).

α) PC12 (pheochromocytoma rat cells) είναι η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, ανάλυσης πρωτεϊνών κατά western καθώς και στη μέθοδο της ELISA και βιοτυνιλίωσης. Ο λόγος είναι ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν ενδογενώς τον μ υποδοχέα των οπιοειδών, συνεπώς συμπεριλαμβάνουν όλα τα μόρια που παίζουν ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινάει κατόπιν ενεργοποίησης του. Το θρεπτικό στο οποίο καλλιεργήθηκαν τα PC12 αποτελείται από: DMEM, 10% FBS, 1% P/S, 5% HS.

β) HEK 293 (human embryonic kidney cells) είναι η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό του υποδοχέα στο κύτταρο κατόπιν ενεργοποίησης 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.

γ) MEFs (mouse embryonic fibroblasts) είναι οι πρωτογενείς σειρές που απομονώθηκαν, εξετάστηκαν και συνεισέφεραν στην εργασία επιτρέποντας συγκρίσεις μεταξύ MEF, ζώων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων. Τα κύτταρα απομονώθηκαν από έμβρυα 14 ημερών είτε από RGS9^{+/+} τύπου ζώα, είτε από ζώα τα οποία δεν εκφράζουν την RGS9 (RGS9^{-/-}). 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.

2.2.2. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Υλικά:

DMEM, Optimem (Gibco)

Λιποφεκταμίνη 2000, Λιποφεκταμίνη (Invitrogen)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή DNA κατασκευών σε καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων, αφορά τη χρήση λιποφεκταμίνης και λιποφεκταμίνης 2000. Η λιποφεκταμίνη δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA, απορροφάτε 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 τόσο των PC12 όσο και 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 250.000/ml σε πλάκες των 6 οπών. Και στις δύο περιπτώσεις από το θρεπτικό απουσιάζει ο ορός και τα αντιβιοτικά. Συνολικά 4μg πλασμιδιακού DNA τοποθετείται σε 100μl θρεπτικού σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Σε αντίστοιχο αριθμό σωληνάρων τοποθετούνται από 8μl 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. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂ για 18 ώρες. Τέλος το θρεπτικό τους αντικαθίσταται από DMEM με 10% FBS στην περίπτωση των PC12 και HEKκυτταρικών σειρών ή με 20% FBS στην περίπτωση των MEF.

2.2.3. 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)

Κύτταρα HEK-293T καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες σε DMEM με 10% FBS πάνω σε καλυπτρίδες καλυμμένες με πολυλυσίνη σε πλάκες των 24 οπών. Ακολούθησε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη χρήση λιποφεκταμίνης και επώαση για 18 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε η χορήγηση 5μmol/L DAMGO, ή 10μmol/L μορφίνη ή 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 4% φορμαλδεΰδης αραιωμένης σε 1X PBS. Έπειτα τα δείγματα επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα IMF/saroinin, ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα για 45 λεπτά, σύντομη πλύση και επώαση με το 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 40x/1.25.

2.3. Βιοχημικές μέθοδοι

2.3.1. Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Υλικά:

Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma USA)

Διάλυμα A (Biorad)

Διάλυμα B (Biorad)

Διάλυμα S/C (Biorad)

Πλάκες 96 οπών, τύπου ELISA, επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)

Φωτόμετρο πλακών ELISA (Biorad)

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική μέθοδος Lowry (Lowry *et al.*, 1951), η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ του folin phenol reagent και πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος 750nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη η οποία κατασκευάστηκε από τη μέτρηση δειγμάτων με γνωστή συγκέντρωση αλβουμίνη ορού βοός (BSA). Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων BSA είναι το ίδιο με το διάλυμα, στο οποίο διαλύθηκαν τα υπό εξέταση δείγματα. Σε πλάκα 96 οπών τύπου ELISA τοποθετήθηκαν 5μl ανά οπή από κάθε γνωστό και άγνωστο δείγμα εις τριπλούν και εις διπλούν αντίστοιχα και προστέθηκαν 25μl μίγματος διαλύματος A και S. Έπειτα σε κάθε οπή προστέθηκαν και 200 μl διαλύματος B γεγονός που προκάλεσε αντίδραση που δίνει χρώμα.. Ακολούθησε ανάδευση του μείγματος και 15 λεπτά αργότερα μετρήθηκε η οπτικής πυκνότητας (O.D.) σε μήκος κύματος 750nm σε φωτόμετρο πλακών τύπου ELISA. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων υπολογίστηκε σύμφωνα με την πρότυπης καμπύλη και εκφράστηκε σε μονάδες μg/ml.

2.3.2. 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, μετά τη λύση τους επώαστηκαν με 20 μl κόκκους πρωτεΐνης

agarose G, σε περιστρεφόμενη βάση στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο επώαστηκε για 16 ώρες στους 4°C με το επιθυμητό αντίσωμα σε περιστρεφόμενη βάση, ενώ ακολούθησε επώαση για 1-2 ώρες με 20 μl κόκκους πρωτεΐνης agarose G σε περιστρεφόμενη βάση. Έπειτα από τρεις διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με το διάλυμα λύσης και αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις, ακολούθησε ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western.

2.3.3. 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)
Τελικός όγκος: 450μl 3x αποδιατακτικού διαλύματος, 50μl β-μερκαπτοαιθανόλης

2. Διάλυμα διαχωρισμού 500 ml (pH 8.9)

Tris 90gr, SDS 2gr

3. Διάλυμα επιστοιίβαξης 500 ml (pH 6.8)

Tris 15,15gr, SDS 1gr

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

Tris 15gr, Γλυκίνη 71gr, SDS 5gr

Τελικός όγκος:: 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης, 900ml απεσταγμένου νερού

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

Tris 15gr, Γλυκίνη 71gr, SDS 0.5gr

Τελικός όγκος:: 100ml διαλύματος μεταφοράς πρωτεϊνών, 200ml μεθανόλης,
700ml απεσταγμένου νερού.

6. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

6α. Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (15ml)

Διάλυμα διαχωρισμού 3.75 ml
Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 4.98 ml
SDS 10% 150μl
Απεσταγμένο νερό 6.025 ml
APS 10% 300μl
TEMED 6.78μl

6β. Πήκτωμα επιστοιβαξης (10ml)

Διάλυμα επιστοιβαξης 2.5 ml
Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 1.2 ml
SDS 10% 100μl
Απεσταγμένο νερό 6.2 ml
APS 10% 30μl
TEMED 10μl

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) Rabbit protein A-purified anti-RGS9-antibody (1:10,000) δημιουργήθηκε από τον Stephen Gold (UT Southwestern Medical center, Dallas, TX)
- ii) Mouse anti-p-ERK antibody (1:5,000 Sigma-Aldrich, Germany)
- iii) Rabbit affinity purified anti ERK antibody (1:2,000, Chemicon, UK)
- iv) Rabbit affinity purified anti RGS7 (1:5,000) δημιουργήθηκε από τον Phillip Jones (Wyeth, Ayerst Pharmaceuticals, Madison, NJ)
- v) Rabbit anti-Gβ5 (C terminus) antibody (1:10,000) χορηγήθηκε από τον W. Simonds, (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD).
- vi) HRP-conjugated anti-rabbit antibody (Sigma, Germany), HRP-conjugated anti-mouse antibody (Sigma, Germany)
- vii) Rabbit anti- PLCβ3 (1:1000, Cell Signaling,)
- viii) Rabbit anti-p PLCβ3 (1:1000, Cell Signaling, UK)
- viiii) Mouse GRK2 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology)

* όλα τα Ga αντισώματα και το αντίσωμα για τον μ υποδοχέα, δόθηκαν από τον Alfred Gilman, UT Southwestern Medical Center.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν από την ηλεκτροφόρηση διαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα και στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 95 °C για 4 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Για την ανάλυση πρωτεϊνών κατασκευάστηκαν πήκτωμα με 10% περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα. Αρχικά εκχύθηκε το πήκτωμα διαχωρισμού και μετά τον πολυμερισμό του προστέθηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης. Τα δείγματα φορτώθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις και ηλεκτροφορήθηκαν στα 30Volt μέχρι να διανύσουν το πήκτωμα επιστοιβάξης και έπειτα στα 100 Volts μέχρι να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Μετά τον διαχωρισμό τους οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (BioRad 0.45μm) με ηλεκτροφόρηση στα 300mA για 1 ώρα με τη βοήθεια του διαλύματος μεταφοράς. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλύθηκε από τυχόν υπολείμματα του πηκτώματος και επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα γάλακτος 3% σε PBS-Tween (διάλυμα blocking) για τον αποκλεισμό των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις των 15 λεπτών με σκοπό την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος και στη συνέχεια επώαση για 1 ώρα με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, αραιωμένο σε διάλυμα blocking. Μετά από ακόμα 3 πλύσεις, όπως και παραπάνω, οι ανοσοεντοπιζόμενες πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύθηκαν μέσω του συστήματος ενισχυμένης χρωμοφωταύγειας ECL σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Pierce. 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).

2.3.4. Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)

Υλικά-Διαλύματα:

ABTS (2,2-Azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Sigma A3219-100ml

poly-l-lysine (Sigma)

Lipofectamin 2000 (Invitrogen)

anti-HA rabbit

HRP-conjugated anti-rabbit (Vector laboratories)

Optimem (Gibco)

4% Paraformaldehyde (Sigma)

1X PBS +1mM CaCl₂

Κύτταρα της κυτταρικής σειράς PC12 καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες σε πλάκες 24 οπών αφού είχε προηγηθεί η επίστρωση πολυλυσίνης στον πυθμένα των πλακών. Ακολούθησε η διαμόλυνση των κυττάρων με DNA κατασκευές που εκφράζουν είτε την RGS9 σημασμένη με EGFP πρωτεΐνη, ή την DEPlless RGS9 EGFP πρωτεΐνη, ή με πλασμιδιακό DNA που δεν εκφράζει κάποια μορφή της RGS9 και χρησιμοποιήθηκε σαν ομάδα ελέγχου, καθώς και με κατασκευή που εκφράζει τον μ υποδοχέα σημασμένο με haemagglutinin (HA). Στη μέθοδο της ELISA υπεβλήθησαν και πρωτογενείς καλλιέργειες RGS9^{+/+} MEF κυττάρων και MEF κύτταρα που απομονώθηκαν από ζώα στα οποία το γονίδιο της RGS9 έχει απαλειφθεί. Τα εμβρυικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν επίσης για 16 ώρες σε πλάκες 24 οπών και διαμολύνθηκαν με DNA κατασκευή που εκφράζει τον μ υποδοχέα σημασμένο με HA. 16 ώρες μετά τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 1X PBS σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα επώαστηκαν με αντι-HA μονοκλωνικό αντίσωμα για 2 ώρες στους 4°C σε Optimem (1μg αντισώματος ανά δείγμα). Στη συνέχεια αφού επώαστηκαν είτε για 15 είτε για 30 λεπτά στους 37°C με 5μmol/L DAMGO, 10μmol/L μορφίνη και με φυσιολογικό ορό, μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεύδης στους 4°C για 10 λεπτά. Ακολούθησε μία πλύση με 1X PBS σε θερμοκρασία δωματίου και άλλες 2 ώρες επώασης με HRP-conjugated

anti-rabbit πολυκλωνικό αντίσωμα (1:1000) σε Optimem. Τα δείγματα πλύθηκαν με 1X PBS +1mM CaCl₂ σε Θ.Δ. και σε κάθε οπή της πλάκας προστέθηκαν 250 μl ABTS. Αυτή η προσθήκη οδήγησε στην ανάπτυξη χρώματος το οποίο ήταν ανάλογο της δεσμευμένης ουσίας. Δέκα λεπτά αργότερα 200 μl κάθε δείγματος μεταφέρθηκαν σε πλάκα των 96 οπών και τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με την ένταση του χρώματος σε φωτόμετρο ELISA στα 405nm. Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος που επωάστηκε με οποιοειδής ουσίες γίνεται σε σύγκριση με τα δείγματα που δέχτηκαν μόνο φυσιολογικό ορό, η μέτρηση των οποίων έγινε ταυτόχρονα.

2.3.5. Βιοτυνυλίωση

Υλικά:

sulfo-NHS-Biotin (Pierce)

avidin-coupled agarose ()

Protease Phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)

Διαλύματα:

Διάλυμα λύσης: Tris HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, Glycerol 10%, EDTA 2mM, Protease Phosphatase inhibitor cocktail 1 μg/ml

PBS/Ca/Mg:

Μία άλλη μέθοδος μελέτης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών είναι αυτή που χρησιμοποιεί την ισχυρή σύνδεση ανάμεσα σε κόκκους στρεπταβιδίνης και βιοτυνυλιωμένες πρωτεΐνες. Γι αυτό το σκοπό, κύτταρα PC12 καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες σε πλάκες των 6 οπών αφού είχε προηγηθεί η επίστρωση πολυλυσίνης στον πυθμένα των πλακών. Ακολούθησε η διαμόλυνση των κυττάρων με DNA κατασκευές που εκφράζουν είτε την RGS9 σημασμένη με EGFP πρωτεΐνη, ή την DEPlless RGS9 EGFP πρωτεΐνη, ή με πλασμιδιακό DNA όπως προαναφέρθηκε,

επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 37°C με 5μmol/L DAMGO, 10μmol/L μορφίνη και με φυσιολογικό ορό. Μετά από 2 πλύσεις με κρύο 1X PBS/Ca/Mg, τα δείγματα επώαστηκαν με sulfo-NHS-Biotin (1 mg/mL PBS/Ca/Mg) στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml 0.1 M γλυκίνης σε κάθε κυψελίδα και ακολούθησε μισή ώρα επώασης στους 4°C. Έπειτα τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με 2 ml 1X PBS/Ca/Mg και κατόπιν την πρόσθεση διαλύματος λύσης, λύθηκαν με τη χρήση υπερήχων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές ανά λεπτό και το υπερκείμενο επώαστηκε με κόκκους avidin συζευγμένους με agarose (84 μl avidin για 600 μl δείγματος) στους 4°C για 16 ώρες. Τέλος τα δείγματα πλύθηκαν 4 φορές σε διάλυμα λύσης και αφού διαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα ακολούθησε ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western.

2.4. Πειραματόζωα

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν υπό συνθήκες δωδεκάωρου κύκλου φωτός/σκότους και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και φαγητό. Όλες οι διαδικασίες που αφορούν το χειρισμό ζώων έγιναν σύμφωνα με τις προδιαγραφές του National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory animals. Για την ανάλυση πρωτεϊνών κατά western χρησιμοποιήθηκαν ιστοί που απομονώθηκαν από αρσενικά ζώα ηλικίας 8 εβδομάδων. Για τις εφάπαξ χορηγήσεις οπιοειδών στα ποντίκια χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά φυσιολογικός ορός, μορφίνη (20 mg/kg) ή φαιντανύλη (0.1 mg/kg).

Οι χρόνιες χορηγήσεις ολοκληρώθηκαν σε 5 ημέρες και οι ενέσεις γινόντουσαν ενδοπεριτοναϊκά, δύο φορές την ημέρα, ανά διάστημα 12 ωρών. Στα ζώα χορηγήθηκε → φυσιολογικός ορός,

→ μορφίνη

1^η μέρα- 20 mg/kg και 20 mg/kg

2^η μέρα-40 mg/kg και 40 mg/kg,

3^η μέρα-40 mg/kg και 60 mg/kg,

4^η μέρα 60 mg/kg και 80 mg/kg

5^η μέρα 80 mg/kg και 20 mg/kg

→ φαιντανύλη

1^η μέρα- 0.05 mg/kg και 0.05 mg/kg

2^η μέρα-0.1 mg/kg και 0.1 mg/kg

3^η μέρα-0.1 mg/kg και 0.2 mg/kg

4^η μέρα -0.2 mg/kg και 0.35 mg/kg

5^η μέρα -0.35 mg/kg και 0.1 mg/kg

ή διαδοχική χορήγηση φαιντανύλης-μορφίνης (30 λεπτά πριν από κάθε δόση μορφίνης χορηγήθηκε 0.04 mg/kg φαιντανύλης-ακολούθησε η ίδια δοσολογία μορφίνης με την χρόνια χορήγηση).

2.4.α. Hot plate assay

Το hot plate assay πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός μηχανήματος που περιέχει μια θερμική πλάκα, η οποία και ρυθμίζεται στους 52 C. Για τη διεκπεραίωση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ομάδες των RGS9-2^{+/+} και RGS9-2^{-/-} ζώων. Στα ζώα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά μορφίνη, φαιντανύλη ή μεθαδόνη και η αναλγητική

απόκριση μετρήθηκε τριάντα λεπτά αργότερα. Προς αποφυγή καταστροφή του ιστού, τα ζώα που δεν έδειξαν καμία απόκριση, απομακρύνθηκαν από το μηχάνημα στα 40 δευτερόλεπτα (cutoff time).

2.4.β. Υπερέκφραση της RGS9 με *in vivo* έγχυση ιού

Οι AAV-GFP και AAV-RGS9 ιοί παράχθηκαν με την μέθοδο τριπλής διαμόλυνσης σε HEK κύτταρα και απομονώθηκαν μέσω τη διαδικασίας που έχει περιγραφεί σε προηγούμενες έρευνες (Hommel *et al.*, 2003, Zachariou *et al.*, 2006). Οι στερεοτακτικές συντεταγμένες για την εισαγωγή των AAV ιών στον επικλινή πυρήνα ποντικών είναι οι εξής: προσθιοπίσθιος άξονας +1.6mm, πλευρικός άξονας ± 1.5 mm και κατακόρυφος άξονας - 4.5mm σε γωνία of 10 μοιρών, με σημείο αναφοράς το σημείο τομής της οβελιαίας με τη στεφανιαία ραφή του κρανίου (σύμφωνα με τον Bregma).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Τα RGS9 διαγονιδιακά ζώα, είναι πιο ευαίσθητα στις αναλγητικές ιδιότητες της μορφίνης

Χρησιμοποιήθηκαν ομάδες ζώων RGS9-2^{-/-} και RGS9-2^{+/+}, στα οποία χορηγήθηκε μορφίνη, φαιτανύλη ή μεθαδόνη για το διάστημα της μισής ώρας. Η αναλγητική απόκριση σε κάθε φάρμακο μετρήθηκε με τη χρήση του hot plate assay. Παρατηρήθηκε ότι συγκριτικά με τα RGS9-2^{+/+}, τα RGS9-2^{-/-} ζώα παρουσιάζουν αυξημένη αναλγησία μετά τη χορήγηση μορφίνης. Η απόκριση αυτή οφείλεται αποκλειστικά στη δράση της μορφίνης, καθώς η χορήγηση μεθαδόνης ή φαιτανύλης οδήγησε στον αντίθετο φαινότυπο. Συγκεκριμένα, τα RGS9-2^{-/-} ζώα παρουσιάζουν μειωμένη ανταπόκριση στις αναλγητικές δράσεις της φαιτανύλης και μεθαδόνης. (εικόνα 3).

3.1. Μελέτες με χρήση *in vitro* πειραματικών μοντέλων

3.1.1. Η RGS9 ρυθμίζεται στον επικλινή πυρήνα αποκλειστικά από τη μορφίνη.

Παλαιότερες συμπεριφορικές μελέτες (Zachariou *et al.*, 2003) έχουν δείξει ότι η RGS9-2 μεσολαβεί στη ρύθμιση της λειτουργίας του μ υποδοχέα (εικόνα 3.1.8). Σκοπός μας ήταν να ερευνήσουμε εάν τα επίπεδα της ίδιας της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο, μπορούν να ρυθμιστούν από οπιοειδής ουσίες, γεγονός που θα απέδιδε σημαντικό ρόλο στην RGS9-2 κατά τη σηματοδότηση του MOR, στις περιοχές που παίζουν ρόλο στον εθισμό και την αναλγησία. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από επικλινείς πυρήνες μυών, μετά τη χορήγηση φυσιολογικού ορού, μορφίνης, φαιτανύλης ή μεθαδόνης για διάστημα δύο

ωρών. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καταγράφηκαν με την ανάλυση κατά western και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η RGS9-2 ρυθμίζεται αποκλειστικά από τη δράση της μορφίνης (εικόνα 3.1.1, αύξηση επιπέδων $125 \pm 10\%$). Η χορήγηση μορφίνης για 1 ή για 6 ώρες δεν προκάλεσε αλλαγή των επιπέδων της RGS9-2.

3.1.2. Η υπερέκφραση της RGS9-2 αναστέλλει την ενδοκύττωση του υποδοχέα που επάγεται από τη χορήγηση DAMGO

Έχει αναφερθεί ότι οι RGS πρωτεΐνες μέσω της πρόσδεσης τους στους GPCRs, επηρεάζουν και την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα. Για να διαπιστωθεί παρόμοια δράση της RGS9-2, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά μοντέλα στα οποία η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε. Συγκεκριμένα, κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν με DNA κατασκευές που εκφράζουν την RGS9-2, την Gβ5 υπομονάδα και τον HA-MOR σημασμένο υποδοχέα, προκειμένου ο τελευταίος να γίνει ορατός με τη χρήση ανοσοφθορισμού. Η κατανομή του υποδοχέα στο κύτταρο εξετάστηκε πριν και μετά τη χορήγηση DAMGO ή μορφίνης. Παρατηρήθηκε ότι ενώ φυσιολογικά ο υποδοχέας εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, δέκα λεπτά μετά τη χορήγηση DAMGO η διαδικασία της ενδοκύττωσης έχει ξεκινήσει (εικόνα 3.1.2.A). Η έκφραση όμως της RGS9-2 αναστέλλει τη διαδικασία αυτή. Αντίθετα, η χορήγηση μορφίνης στα είκοσι λεπτά, δεν προκαλεί αλλαγές στην κατανομή του υποδοχέα παρουσία ή απουσία της RGS9-2 (3.1.2.B).

3.1.3. Η διανομή της RGS9-2 στο κύτταρο επηρεάζεται από τη χορήγηση οπιοειδών

Γνωρίζοντας πλέον ότι η RGS9-2 επηρεάζει τη διαδικασία ενδοκύττωσης του υποδοχέα μετά την ενεργοποίηση του από οπιοειδή, θεωρήθηκε εξαιρετικά ενδιαφέρον

να μελετηθεί η κατανομή της ίδιας της πρωτεΐνης στο κύτταρο. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν PC12 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με DNA κατασκευές που εκφράζουν RGS9-2 πρωτεΐνη που φέρει την EGFP στο αμινοτελικό της άκρο, την Gβ5 υπομονάδα και τον HA-μ οπιοειδή υποδοχέα. Με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας παρατηρήθηκε ότι η RGS9-2 τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες (εικόνα 3.1.3.A), όσο και μετά τη χορήγηση DAMGO (εικόνα 3.1.3.B), επισημαίνεται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος κοντά στην κυτταρική μεμβράνη όπου εντοπίζεται και ο MOR. Η χορήγηση μορφίνης όμως επιφέρει αλλαγές στον εντοπισμό της RGS9-2, μετατοπίζοντας την στην κυτταρική μεμβράνη και αυξάνοντας τον συνεντοπισμό της με τον MOR, γεγονός που οδηγεί και σε αυξημένο συνεντοπισμό με τον υποδοχέα (εικόνα 3.1.3.Γ).

3.1.4.α&β. Το DEP τμήμα είναι απαραίτητο για τη επίδραση της RGS9-2 στην ενδοκύττωση του υποδοχέα

Μέσω του RGS συντηρημένου τμήματος οι R7 πρωτεΐνες προσδέονται στις Gα υπομονάδες και ασκούν την GTPase δράση τους. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι η RGS9-2 αναστέλλει την ενδοκύττωση του υποδοχέα, διαδικασία που προαπαιτεί την παρουσία της κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Το DEP τμήμα χάρη στο οποίο η R7 υπο-οικογένεια πρωτεϊνών μπορεί να προσδεθεί στην κυτταρική μεμβράνη, εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο. Στην περίπτωση που το τμήμα αυτό απαλειφθεί, θα μπορεί η RGS9-2 να ασκήσει τη φυσιολογική της δράση; Οι μελέτες που ακολούθησαν ολοκληρώθηκαν σε PC12 κύτταρα τα οποία εκφράζουν ενδογενώς τον μ υποδοχέα, τα οποία και διαμολύνθηκαν με την EGFP-RGS9-2 και την μεταλλαγμένη μορφή της EFGP-DEPless RGS9-2 στην οποία λείπει το DEP τμήμα. Μαζί με τις πρωτεΐνες στα κύτταρα εισήχθη και η Gβ5 υπομονάδα, η οποία ενισχύει τη σταθερότητα της RGS9-2,

καθώς και ο HA-MOR. Παρόλο που η EGFP-RGS9-2 εντοπίζεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (εικόνα 3.1.4.α.A) , η απαλοιφή του DEP τμήματος οδηγεί σε διάχυτη κατανομή της πρωτεΐνης (εικόνα 3.1.4.α.B). Ακολούθησε η χορήγηση DAMGO ή μορφίνης σε διαστήματα των 0, 5, 10, 20 και 30 λεπτών και με τη χρήση του ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας καταγράφηκε η πορεία της ενδοκύττωσης του υποδοχέα.. Φυσιολογικά ο MOR ενδοκυττώνεται δέκα λεπτά μετά την ενεργοποίηση του από τον αγωνιστή DAMGO (εικόνα 3.1.4.α.Γ) και τριάντα λεπτά κατόπιν χορήγησης μορφίνης (εικόνα 3.1.4.β.A). Η υπερέκφραση της RGS9-2 οδηγεί σε αναστολή της διαδικασίας και στις δύο περιπτώσεις (εικόνες 3.1.4.α.Δ & 3.1.4.β.B). Στην περίπτωση όμως που τα κύτταρα εκφράζουν την EF GFP-DEPless RGS9-2, η διαδικασία ενδοκύττωσης ξεκινάει νωρίτερα, στο διάστημα των πέντε λεπτών (εικόνες 3.1.4.α.E & 3.1.4.β.Γ).

3.1.4.γ.1. Χρήση ELISA σε PC12 κύτταρα για ποσοτικοποίηση της ενδοκύττωσης των μ υποδοχέων.

Για την καταμέτρηση του ποσοστού των ενδοκυττωμένων υποδοχέων χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) (Koch *et al.*, 2005). PC12 κύτταρα διαμολύνθηκαν είτε με το πλασμίδιο ελέγχου, είτε με τις μορφές της RGS9-2 πρωτεΐνης στα οποία χορηγήθηκε DAMGO, μορφίνη ή φυσιολογικός ορός για 15 ή 30 λεπτά. Φυσιολογικά τριάντα λεπτά μετά τη χορήγηση DAMGO κι ενώ η ενδοκύττωση του υποδοχέα έχει ξεκινήσει, η υπερέκφραση της RGS9-2 δρα ανασταλτικά. Αντίθετα η παρουσία της Depless RGS9-2 οδηγεί σε γρήγορη ενδοκύττωση του MOR μετά τη διέγερση του από DAMGO ή μορφίνη (εικόνα 3.1.4.γ.A). Στα 15 λεπτά και ενώ φυσιολογικά ο υποδοχέας εντοπίζεται στην κυτταρική

μεμβράνη, η μεταλλαγμένη μορφή της RGS9-2 οδηγεί σε γρήγορη ενδοκύττωση του MOR κατόπιν ενεργοποίησης του από DAMGO ή μορφίνη (εικόνα 3.1.4.γ.B).

3.1.4.γ.2. Βιοτυνιλίωση υποδοχέων για ποσοτικοποίηση της ενδοκύττωσης των μ υποδοχέων.

Συμπληρωματικά της ELISA χρησιμοποιήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση, σύμφωνα με την οποία μπορούν να καταμετρηθούν οι υποδοχείς που παραμένουν στην κυτταρική μεμβράνη μετά τη ενεργοποίησή τους από οπιοειδή. Το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση είναι τα PC12 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με την RGS9-2, τον HA-MOR, την Gβ5 υπομονάδα και με ένα πλασμίδιο ελέγχου. Δεκαπέντε λεπτά μετά τη διέγερση με DAMGO ή μορφίνη και κατόπιν της διαδικασίας της βιοτυνιλίωσης, ακολούθησε ανάλυση κατά western. Φυσιολογικά οι υποδοχείς εξακολουθούν να εντοπίζονται στη μεμβράνη μετά τη χορήγηση ορού ή μορφίνης. Η υπερέκφραση της RGS9-2 όμως, οδηγεί στην ανίχνευση των υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη ακόμα και μετά την ενεργοποίησή τους από DAMGO (εικόνα 3.1.4.γ.2).

3.1.5.α&β. Η RGS9-2 αναστέλλει την ενδοκύττωση του μ υποδοχέα που επάγεται από τα οπιοειδή, σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλάστων

Η επίδραση της RGS9-2 στην ενδοκύττωση του μ υποδοχέα μελετήθηκε και σε πρωτογενείς καλλιέργειες, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ένα μοντέλο που θα περιέχει όλα τα σημαντικά μόρια που μεσολαβούν κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης και τη διαδικασία ενδοκύττωσης. Για το λόγο αυτό απομονώθηκαν εμβρυϊκοί ινοβλάστες (MEF) από μύες που εκφράζανε στο γονίδιο της RGS9 και

ινοβλάστες στους οποίους το γονίδιο είχε απαλειφθεί. Στη συνέχεια τα MEF διαμολύνθηκαν με HSV ιό που εξέφραζε τον HA-MOR και ακολούθησε η χορήγηση μορφίνης ή DAMGO για 10 και 30 λεπτά και η παρακολούθηση του υποδοχέα στο κύτταρο με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Στα RGS9^{+/+} MEF η χορήγηση μορφίνης οδήγησε σε ενδοκύττωση του υποδοχέα στα 30 λεπτά, ενώ στα RGS9^{-/-} MEF η ενδοκύττωση του υποδοχέα ανιχνεύθηκε νωρίτερα στα 10 λεπτά (εικόνα.3.1.5.α). Ομοίως, η χορήγηση DAMGO στους RGS9^{+/+} ινοβλάστες οδήγησε σε ενδοκύττωση του υποδοχέα στα 30 λεπτά και στους RGS9^{-/-} ινοβλάστες στα 10 λεπτά (εικόνα 3.1.5.β).

3.1.5.γ. Χρήση ELISA σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες για ποσοτικοποίηση της ενδοκύττωσης των μ υποδοχέων.

Η διαδικασία της ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELISA) επαναλήφθηκε και στα MEF κύτταρα, όπου οι μ υποδοχείς ενεργοποιήθηκαν μετά τη χορήγηση των οπιοειδών για 15 ή 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ στα 15 λεπτά διέγερσης στους RGS9^{+/+} ινοβλάστες οι υποδοχείς εξακολουθούν να εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, στους RGS9^{-/-} ινοβλάστες η διαδικασία της ενδοκύττωσης έχει ήδη ξεκινήσει (εικόνα 3.1.5.γ.Α). Στα 30 λεπτά διέγερσης, η ενδοκύττωση των MOR είναι πλέον ανιχνεύσιμη και στα RGS9^{+/+} MEF (εικόνα 3.1.5.γ.Β).

3.1.6. Η RGS9-2 εμποδίζει τη ρύθμιση τη φωσφορυλίωσης της ERK1/ERK2 από τους ενεργοποιημένους μ οπιοειδείς υποδοχείς *in vitro*.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ελέγχονται από εξωκυττάρια σήματα (extracellular signal regulated kinase, ERK) ανήκουν στην οικογένεια των MAP κινασών. Οι ERK1/ERK2

(44/42 kDa) MAP κινάσες ενεργοποιούνται από υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Η διέγερση του μ οπιοειδή υποδοχέα από αγωνιστές μπορεί να ρυθμίσει τη φωσφορυλίωση της ERK1/ERK2 *in vivo* και *in vitro* (Schmidt *et al.*, 2000, Eitan *et al.*, 2003, Muller and Unterwald 2004). Θέλοντας να ερευνήσουμε το ρόλο της RGS9 στην φωσφορυλίωση της ERK που ακολουθεί τη διέγερση του MOR, μετρήσαμε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/ERK2 πρωτεϊνών. PC12 κύτταρα διαμολύνθηκαν με την RGS9-2, την Depless RGS9-2 και την Gβ5 και τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1/ERK2 μετρήθηκαν με ανάλυση κατά western, έπειτα από χορήγηση DAMGO, μορφίνης ή ορού. Οι μελέτες αυτές έγινες σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές: στα 3, 5 και 8 λεπτά κατόπιν της διέγερσης των υποδοχέων. Στα PC12, το μέγιστο της φωσφορυλίωσης των ERK1/ERK2 παρουσιάζεται στα 5 λεπτά. Η υπερέκφραση όμως της RGS9-2, αναστέλλει την επαγόμενη φωσφορυλίωση από τη μορφίνη ή το DAMGO χωρίς να επηρεάζονται καθόλου τα συνολικά επίπεδα της ERK (εικόνα 3.1.6.A). Η υπερέκφραση της DEPlless RGS9-2 όμως, οδηγεί στο μέγιστο της φωσφορυλίωσης των ERK1/ERK2 γρηγορότερα, στο χρονικό διάστημα των 3 λεπτών (εικόνα 3.1.6.B).

3.1.7. Αλληλεπίδραση της RGS9-2 με τον μ υποδοχέα των οπιοειδών και την β-αρρεστίνη 2.

Γνωστοποιώντας ότι η RGS9-2 εκτός από το ρόλο που ασκεί στην ενδοκύττωση του υποδοχέα συμμετέχει και διαμορφώνει και ενδοκυττάριους μηχανισμούς, ακολούθησαν μελέτες ανοσοκατακρίμησης για τη διερεύνηση ενδεχόμενων σηματοδοτικών συμπλόκων. Μελετήθηκε κατά πόσο αυξάνει η αλληλεπίδραση του MOR και της RGS9-2, αλλά και η αλληλεπίδραση με τα σηματοδοτικά μόρια που ενεργοποιούνται μετά τη χορήγηση μορφίνης. Κύτταρα PC12 διαμολύνθηκαν με την RGS9-2, τον HA-

MOR και την Gβ5 και κατόπιν χορήγησης ορού ή μορφίνης τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο western. Παρατηρήθηκε ότι η κυτταρική διέγερση από τη μορφίνη, οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS9-2 με τον MOR και τη β-αρρεστίνη 2 (εικόνα 3.1.7.A & B). Απουσία της RGS9-2, η πρόσδεση της β-αρρεστίνης 2 στον υποδοχέα είναι ανιχνεύσιμη, αλλά γίνεται σε μικρότερο βαθμό όταν η RGS9-2 εκφράζεται (εικόνα 3.1.7.Γ).

3.2.α&β.Επιδράσεις στην φωσφορυλίωση της ERK1/2 και της PLCβ3 στον επικλινή πυρήνα και στο ραχιαίο ραβδωτό, από τη χορήγηση μορφίνης ή φαιντανύλης.

Η επίδραση της μορφίνης και της φαιντανύλης μελετήθηκαν στο σύστημα της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 και της PLCβ3 *in vivo*. Η PLCβ3 είναι τελεστής της Gαq υπομονάδας των G πρωτεϊνών και ενεργοποιεί δεύτερους αγγελιοφόρους όπως η ινοσιτολική φωσφατάση (IP) και η diacyl glycerol (DAG). Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν επικλινείς πυρήνες και ιστοί ραχιαίου ραβδωτού, από RGS9^{+/+} ή RGS9^{-/-} ζώα στα οποία πρωτίστως είχε χορηγηθεί μορφίνη, στην περίπτωση της ERK για διάστημα των 30 λεπτών, ενώ στην περίπτωση της PLCβ3 χορηγήθηκε φαιντανύλη για 10 λεπτά και μορφίνη για 30 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με western και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μορφίνη προκαλεί αισθητή μείωση των επιπέδων της p-ERK στους επικλινείς πυρήνες των RGS9^{+/+} (30±5%) και RGS9^{-/-} ζώων (70±4%) (εικόνα 3.2.A), μεγαλύτερη όμως στα RGS9^{-/-} ζώα, χωρίς να επηρεάζονται τα συνολικά επίπεδα της ERK (RGS9^{+/+} 100±4%, RGS9^{-/-} 120±20%). Η χορήγηση φαιντανύλης προκαλεί επίσης μείωση των επιπέδων της p-ERK στους επικλινείς πυρήνες των RGS9^{+/+} ζώων (49±12%), χωρίς όμως να επηρεάζει τα ERK επίπεδα στα RGS9^{-/-} ζώα (110±20%), (εικόνα 3.2.Γ). Τα συνολικά επίπεδα της ERK παρέμεινα ίδια

(RGS9^{+/+} 127±22%, RGS9^{-/-} 126±22%). Στο ραχιαίο ραβδωτό των RGS9^{+/+}, η μορφίνη προκαλεί αύξηση της p-ERK (154±4%), αλλά παρόμοια δράση δεν παρατηρείται στα RGS9^{-/-} ζώα (113±3%), (εικόνα 3.2.B). Επιπλέον, η χορήγηση φαιντανύλης στο ραχιαίο ραβδωτό δεν αλλάζει στην αλλαγή επιπέδων της p-ERK τόσο στα RGS9-2^{+/+} (92±22%), όσο και στα RGS9^{-/-} ζώα (70±15%), (εικόνα 3.2.Δ). Τα συνολικά επίπεδα της ERK παρέμεινα ίδια (RGS9-2^{+/+} 111±27%, RGS9^{-/-} 99±13%). Η φαιντανύλη προκαλεί αύξηση των επιπέδων της p-PLCβ3 στους επικλινείς πυρήνες RGS9^{-/-} ιστών (152±5%), (εικόνα 3.2.E), σε δόσεις που δεν έχουν αποτελέσματα στα RGS9^{+/+} ζώα (100±20%), ενώ στους ιστούς του ραχιαίου ραβδωτού δεν παρατηρείται καμία μεταβολή των επιπέδων (RGS9-2^{+/+} ,100±4% - RGS9^{-/-},101±5%), (εικόνα 3.2.Z). Σε όλες τις περιπτώσεις τα συνολικά επίπεδα των ERK και PLCβ3 παραμένουν αναλλοίωτα (επικλινής πυρήνας: RGS9-2^{+/+} 97±6%, RGS9^{-/-} 95±6%, ραχιαίο ραβδωτό: RGS9-2^{+/+} 92±13%, RGS9^{-/-} 100±5%).

3.3.1.1. Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης κατόπιν οξείας χορήγησης οπιοειδών.

Στη προσπάθεια να εξεταστεί εάν οι αγωνιστές του μ οπιοειδή υποδοχέα είναι σε θέση να διαμορφώσουν επιλεκτικές αλληλεπιδράσεις σημαντικών σηματοδοτικών μορίων, εστίασαμε στην επίδραση της μορφίνης και της φαιντανύλης. Με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, προσδιορίσαμε τα σηματοδοτικά σύμπλοκα που σχηματίζονται κατά την ενεργοποίηση του MOR, μετά από οξεία ή χρόνια χορήγηση από διάφορων αγωνιστών. Τέτοιες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις α υπομονάδες των G πρωτεϊνών, καθώς επίσης και τις β-αρρεστίνη 2, GRK2 και PLCβ3.

3.3.1.1.α & β. Αλληλεπιδράσεις του μ υποδοχέα με σημαντικά σηματοδοτικά μόρια.

Αρχικά διερευνήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του MOR, με μόρια τα οποία ενεργοποιούνται κατόπιν της διέγερσης του υποδοχέα από μορφίνη ή φαιντανύλη. Διαπιστώθηκε ότι η μορφίνη ενισχύει την πρόσδεση του μ υποδοχέα με τις Gai3 and Gai2 υπομονάδες (εικόνες 3.3.1.1.α.A(260±16%) & B (259±23%), ενώ η φαιντανύλη αυξάνει την πρόσδεση του υποδοχέα με την Gas υπομονάδα κατά 245±20% (εικόνα 3.3.1.1.β.Γ). Επίσης μελετήθηκαν τα επίπεδα συμπλόκων του MOR με τις Gas και Gao, τα οποία δεν άλλαξαν σημαντικά μετά τη διέγερση του υποδοχέα από τα οπιοειδή (εικόνες 3.3.1.1.α.Γ & Δ). Στις μελέτες ανοσοκατακρίμησης που έγιναν σε PC12 κύτταρα η διέγερση του MOR από τη μορφίνη οδήγησε σε αυξημένη αλληλεπίδραση του με την RGS9-2. Η δημιουργία του συμπλόκου αυτού διαπιστώθηκε και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από τη περιοχή του ραβδωτού (αύξηση 550±80%, εικόνα 3.3.1.1.β.A) κατόπιν διέγερσης από μορφίνη. Ομοίως η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την β-αρρεστίνη2 ενισχύθηκε κατά 450±85% μετά τη χορήγηση μορφίνης (εικόνα 3.3.1.1.β.B), ενώ ενισχύθηκε κατά 213±13% μετά τη χορήγηση φαιντανύλης (εικόνα 3.3.1.1.β.B). Από την άλλη η χορήγηση φαιντανύλης οδηγεί στην πρόσδεση του MOR με την PLCβ3 πρωτεΐνη (αύξηση 297±16%, εικόνα 3.3.1.1.β.Δ).

3.3.1.1.γ,δ & ζ. Αλληλεπιδράσεις της RGS9 πρωτεΐνης με σημαντικά μόρια που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι κάτωθεν της διέγερσης του MOR.

Τα επόμενα πειράματα ανοσοκατακρίμησης έγιναν με σκοπό την ταυτοποίηση των Ga υπομονάδων που αλληλεπιδρούν με την RGS9-2 πρωτεΐνη, μετά την εφάπαξ χορήγηση οπιοειδών αγωνιστών. Η RGS9-2 αλληλεπιδρά με την Gas υπο φυσιολογικές

συνθήκες, αλλά το σύμπλοκο δεν επηρεάζεται από τη διέγερση του υποδοχέα (εικόνα 3.3.1.1.γ.A&B). Η RGS9-2 επίσης αλληλεπιδρά με τις Gα_o, Gα_{i1} και Gα_{i2} και το σύμπλοκο αυτό ενισχύεται μετά τη χορήγηση μορφίνης και φαιντανύλης (εικόνες 3.3.1.1.γ.Δ, Γ & ΣΤ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη κατά 218±32% αλληλεπίδραση μεταξύ της RGS9-2 και της Gα_{i3}, η οποία συμβαίνει μόνο κατόπιν διέγερσης του MOR από τη μορφίνη (εικόνα 3.3.1.1.γ.Γ). Επιπλέον η χρήση φαιντανύλης οδήγησε σε αυξημένη πρόσδεση της RGS9-2 με την Gα_q υπομονάδα (αύξηση 175±15%) (εικόνα 3.3.1.1.γ.Δ), ενώ δεν παρατηρείται αντίστοιχο σύμπλοκο μετά τη χορήγηση μορφίνης. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του μ υποδοχέα από τη μορφίνη και τη φαιντανύλη προκαλεί την εκλεκτική αλληλεπίδραση των Gα υπομονάδων με την RGS9-2 και πιθανώς την ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Η υπόθεση αυτή οδήγησε στην μελέτη των συμπλόκων που σχηματίζει η RGS9-2 με σηματοδοτικά μόρια, όπως είναι η β-αρρεστίνη 2, η GRK2 η Gβ5 και η PLCβ3. Πράγματι παρατηρήθηκε ενίσχυση των συμπλόκων της RGS9-2/β-αρρεστίνη 2 (340±24%, εικόνα 3.3.1.1.δ.A) και RGS9-2/Gβ5 (αύξηση 236±26%, εικόνα 3.3.2.1.δ.B), μετά τη χορήγηση μορφίνης και των συμπλόκων RGS9-2/GRK2 (αύξηση 274±14% εικόνα 3.3.1.1.ζ.A), RGS9-2/Gα_q (αύξηση 174±18%, εικόνα 3.3.1.1.ζ.B,) καθώς και RGS9-2/PLCβ3 (αύξηση 429±19%, εικόνα 3.3.1.1.ζ.Γ), μετά τη χορήγηση φαιντανύλης. Δεν παρατηρείται αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS9-2 ή του MOR με την Gα_q υπομονάδα μετά τη χορήγηση μορφίνης, όπως και δεν παρατηρείται αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS9-2 ή του MOR με την Gα_{i3} υπομονάδα μετά τη χορήγηση φαιντανύλης. Οι εικόνες 3.3.1.1.ε και 3.3.1.1.στ είναι σχηματικές αναπαραστάσεις των αυξημένων αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται κατά την εφάπαξ χορήγηση φαιντανύλης ή μορφίνης.

3.3.2. Η εφάπαξ χορήγηση μεθαδόνης ευνοεί την αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μετά τη διέγερση του υποδοχέα από φαιντανύλη.

Μια σειρά πειραμάτων έγιναν μετά τη χορήγηση μεθαδόνης προκειμένου να ανιχνευθούν τα σύμπλοκα που εμπλέκονται στη δράση αυτού του φαρμάκου. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ξεκάθαρα ότι ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μετά τη διέγερση του κυττάρου από φαιντανύλη. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η συγγένεια της RGS9-2 αυξάνεται σημαντικά για την PLCβ3 και την Gαq υπομονάδα (εικόνες 3.3.2.A & B) ενώ αντίθετα δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στην RGS9-2 και την Gαi3 υπομονάδα (εικόνα 3.3.2.Γ).

3.4. Μελέτες ανοσοκατακρίμνησης κατόπιν χρόνιας χορήγησης οπιοειδών

Ωστόσο όλες οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι τμήμα του μηχανισμού που ενεργοποιείται μετά την εφάπαξ χορήγηση φαρμάκων. Πιθανόν η χρόνια χορήγηση οπιοειδών να οδηγεί σε προσαρμοστικές αλλαγές μέσα στο κύτταρο που οδηγούν σε αναδιοργάνωση των σηματοδοτικών συμπλόκων. Εκτός από τις ομάδες ζώων που εκτέθηκαν σε μορφίνη ή φαιντανύλη, χρησιμοποιήθηκε και μια τρίτη ομάδα ζώων στα οποία χορηγήθηκαν σταδιακά και τα δύο φάρμακα. Πρώτα η χαμηλή δόση φαιντανύλης (0,04mg/kg) και μισή ώρα αργότερα η μορφίνη (20mg/kg).

3.4.1.α & β. Αλληλεπιδράσεις της RGS9 και του μ υποδοχέα με σημαντικά σηματοδοτικά μόρια.

Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δείχνουν ότι οι πρωτεϊνικοί σχηματισμοί διαφέρουν. Παρόλο που η ενεργοποίηση του MOR από τη μορφίνη οδηγεί στην ενίσχυση της πρόσδεσης του υποδοχέα με την RGS9-2 (αύξηση 323%±87, εικόνα

3.4.1.α A) και την Gβ5 (αύξηση 171±21%, εικόνα 3.4.1.α.Δ), οδηγεί επίσης και σε αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS9-2 με την Gαq υπομονάδα (αύξηση 216±39%, εικόνα 3.4.1.α.Β). Η χορήγηση φαιντανύλης πυροδοτεί μικρή αλληλεπίδραση της RGS9-2 με την β-αρρεστίνη 2 (αύξηση 218± 54%, εικόνα 3.4.1.α.Ε). Η αλληλεπίδραση με την PLCβ3 δεν είναι στατιστικά σημαντική (εικόνα 3.4.1.α.Ζ). Μετά τη διαδοχική χορήγηση αγωνιστών, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του MOR με την RGS9-2 ή την Gαq, ούτε μεταξύ της RGS9-2 και της Gβ5 (εικόνα 3.4.1.α.Ζ) σύμπλοκο, πράγμα που θεωρούμε ότι βοήθησε στην επαναφορά της φυσιολογικής σηματοδότησης του υποδοχέα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η χρόνια έκθεση σε μορφίνη οδηγεί σε ενίσχυση της αλληλεπίδρασης του MOR με την Gαq (εικόνα 3.4.1.β.Β). Διαπιστώθηκε επίσης ότι η διαδοχική χορήγηση των οπιοειδών αυξάνει τη συγγένεια του MOR για τη β-αρρεστίνη 2 (εικόνα 3.4.1.β.Α). Η εικόνα 3.4.5 είναι σχηματική αναπαράσταση των αυξημένων αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται κατά τη χρόνια χορήγηση φαιντανύλης, μορφίνης ή της διαδοχικής χορήγησης των δύο οπιοειδών.

3.5 Συμπεριφερικές μελέτες σε RGS9^{+/+} και RGS9^{-/-} ζώα

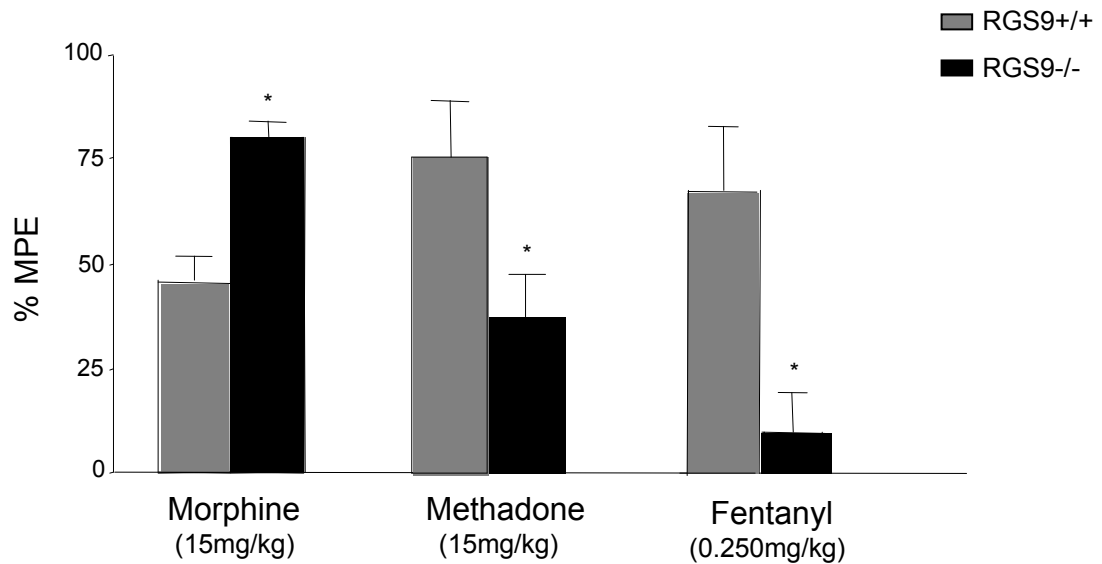
Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η RGS9-2 επηρεάζει την αναλγησία και την ανάπτυξη ανοχής ως προς τη χρόνια χορήγηση οπιοειδών, χρησιμοποιήθηκαν RGS9^{+/+} και RGS9^{-/-} ζώα για την ανάπτυξη συμπεριφορικών μελετών. Για τη διεκπεραίωση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το hot plate assay, το οποίο και ολοκληρώθηκε σε τέσσερις ημέρες. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η χρόνια χορήγηση φαιντανύλης δεν προκάλεσε σημαντική μείωση της αναλγησίας και τα RGS9^{-/-} ζώα παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά με τα RGS9^{+/+}. Αντίθετα η χρόνια χορήγηση μορφίνης, οδήγησε σε αύξηση της αναλγητικής ανοχής στα RGS9^{+/+} ζώα, ενώ τα

RGS9^{-/-} παρουσίασαν μικρότερη ανοχή στο φάρμακο (εικόνα 3.5, πίνακες A & B). Όταν προηγήθηκε η χορήγηση μικρής δόσης φαιντανύλης, 30 λεπτά πριν τη χορήγηση μορφίνης, τα RGS9^{+/+} ζώα δεν ανέπτυξαν ανοχή, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων, προλαμβάνει την ανάπτυξη ανοχής (εικόνα 3.5, πίνακας Γ).

3.5.α. Η υπερέκφραση της RGS9 με AAV ιό προκαλεί σημαντική μείωση στο αναλγητικό αποτέλεσμα που προκαλείται από τα οπιοειδή.

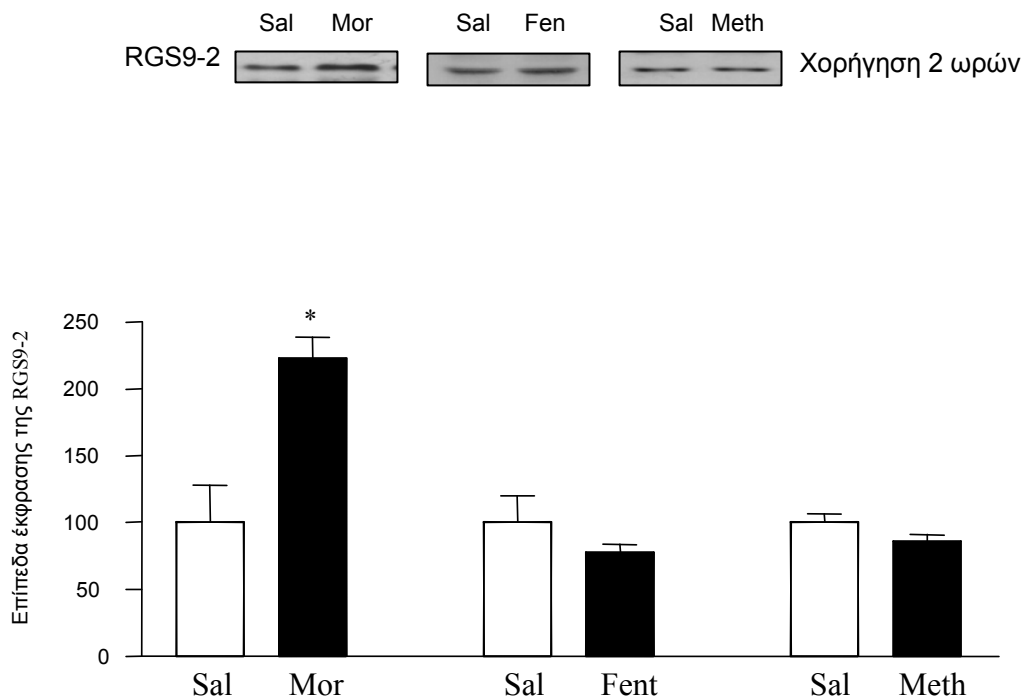
Σε RGS9^{+/+} και RGS9^{-/-} ζώα έγινε έγχυση AAV ιού με GFP ή RGS9, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της RGS9 στην αναλγησία που προκαλείται από τα οπιοειδή. Με τη χρήση του hot plate assay, διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση της RGS9 οδήγησε σε μείωση του αναλγητικού αποτελέσματος που προκλήθηκε από την φαιντανύλη ή τη μορφίνη, συγκριτικά με τα ζώα στα οποία έγινε έγχυση του AAV-GFP ιού (εικόνα 3.5.β).

52°C Hot plate

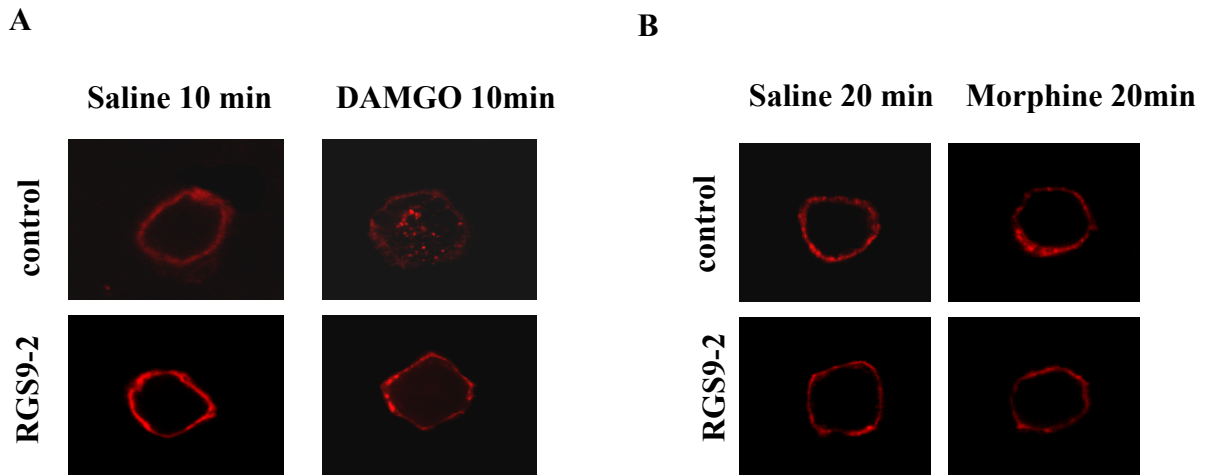


Εικόνα 3. Τα RGS9^{-/-} (KO) ζώα είναι πιο ευαίσθητα στις αναλγητικές ιδιότητες της Μορφίνης. Αντίθετα είναι λιγότερα ευαίσθητα στις αναλγητικές δράσεις τις Φαιντανύλης και της Μεθαδόνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % Maximal possible effect (MPE = (Latency-baseline)/(cutoff-latency)). n = 6-8 ανά ομάδα, *p < 0.05 ανάμεσα στις χορηγήσεις σε κάθε ομάδα ζώων, t-test.

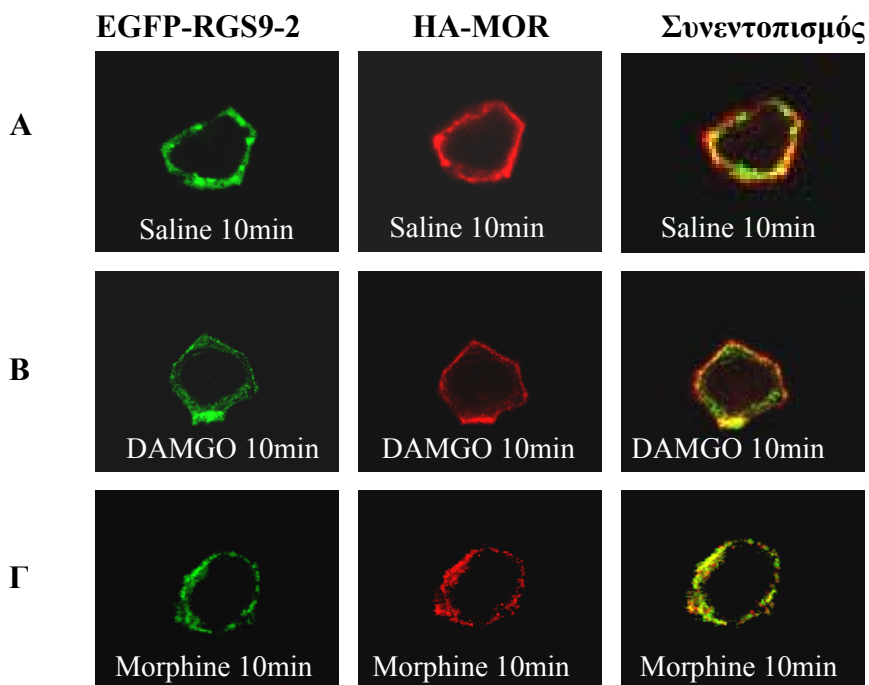
Επικλινής πυρήνας



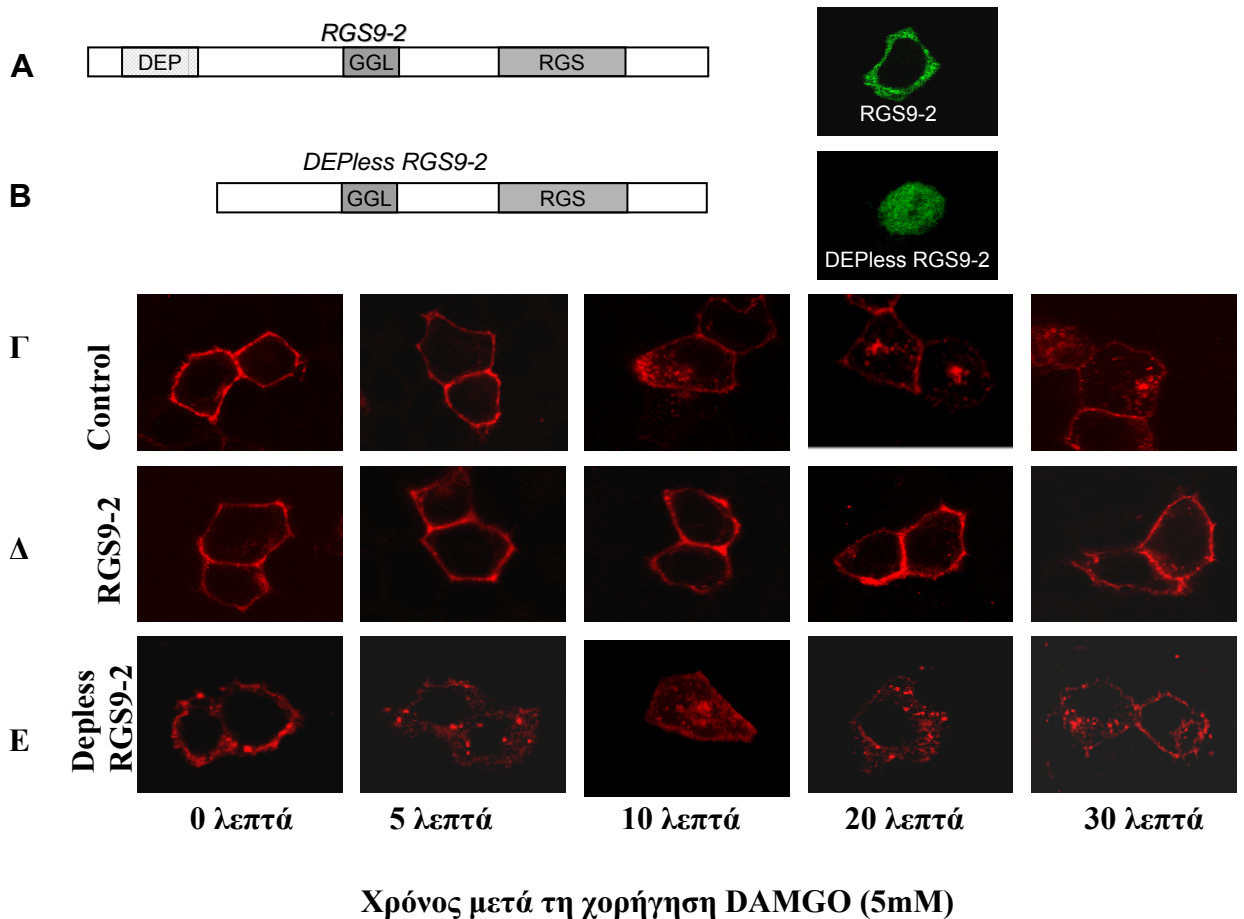
Εικόνα 3.1.1. Τα επίπεδα της RGS9 ρυθμίζονται αποκλειστικά από τη δράση της μορφίνης ($125 \pm 10\%$). Επικλινείς πυρήνες απομονώθηκαν από ζώα στα οποία δύο ώρες πριν είχε χορηγηθεί μορφίνη, φαιντανύλη ή μεθαδόνη και τα επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν με την ανάλυση πρωτεϊνών κατά western. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 3-4 ανά ομάδα, t-test.



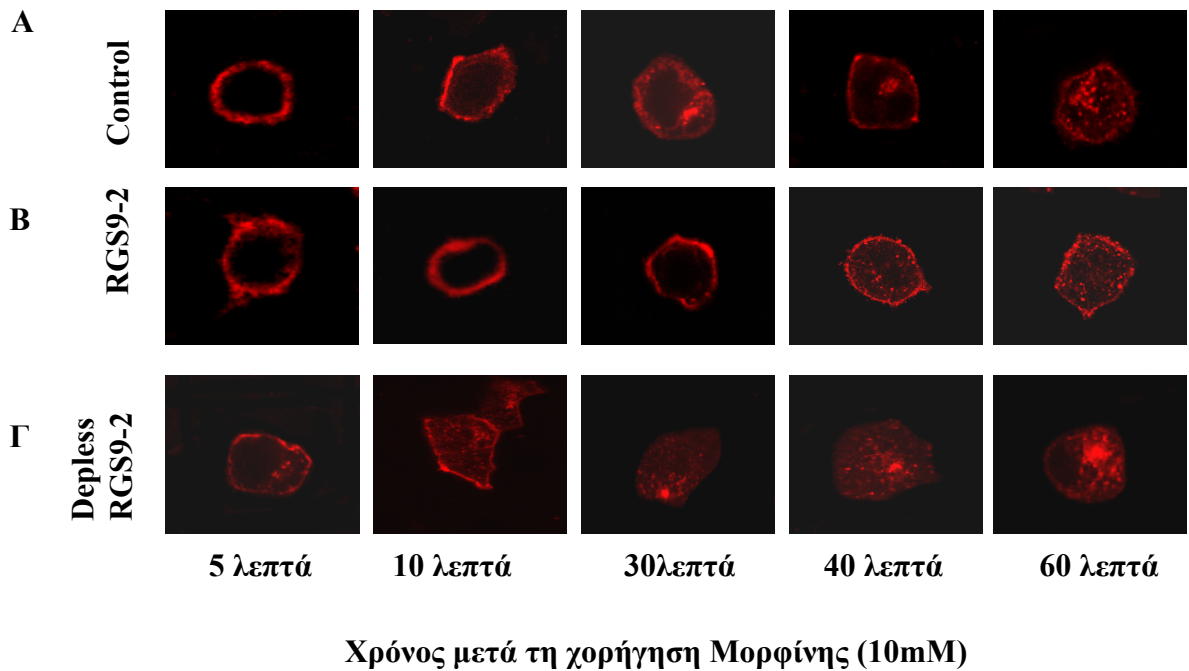
Εικόνα 3.1.2. Η RGS9-2 καθυστερεί την εσωτερικοποίηση του μ υποδοχέα στα PC12 κύτταρα, μετά την ενεργοποίηση του με D-Ala², N-Me-Phe⁴, gly⁵-ol-enkephalin (DAMGO). Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με DNA κατασκευές που εκφράζουν την RGS9-2 και τον μ υποδοχέα ο οποίος είναι σημασμένος με HA. Χρησιμοποιώντας δεύτερο αντίσωμα cy3 anti-mouse HA, εντοπίζεται η κόκκινη χρώση που αντιστοιχεί στη θέση του υποδοχέα.



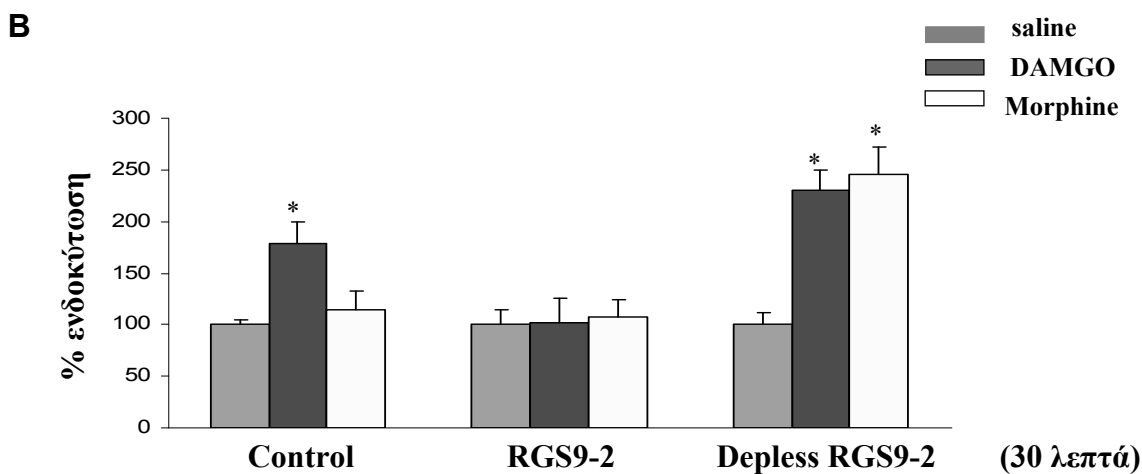
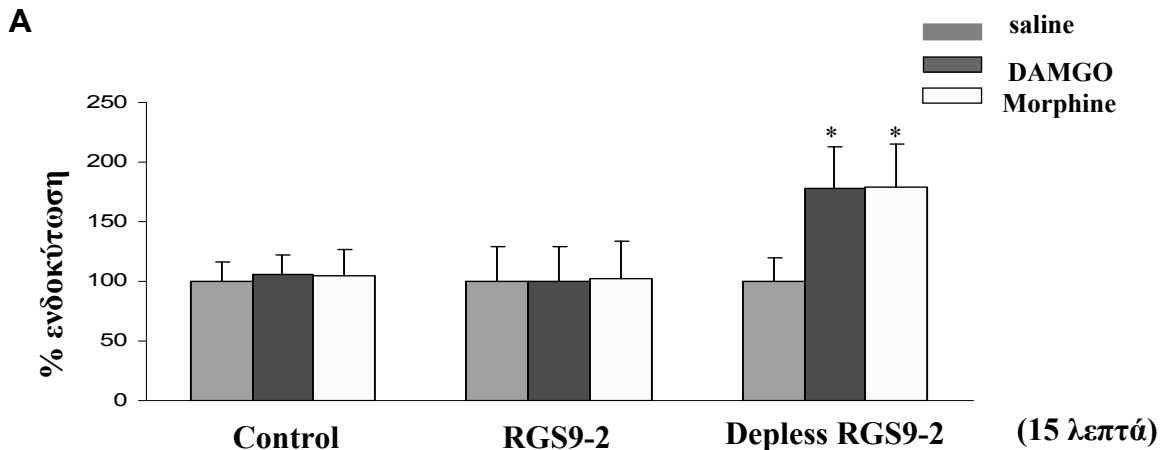
Εικόνα 3.1.3. Η RGS9-2 συνεντοπίζεται με το μ υποδοχέα (HA-MOR) μετά την ενεργοποίηση του από Μορφίνη (Γ) στα PC12 κύτταρα. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με EGFP-RGS9-2, HA-MOR και Gβ5. Η πράσινη χρώση οφείλεται στην EGFP πρωτεΐνη και αντιστοιχεί στην τοποθέτηση της RGS9-2 στο κύτταρο, ενώ η κόκκινη χρώση αντιστοιχεί στη θέση του μ υποδοχέα.



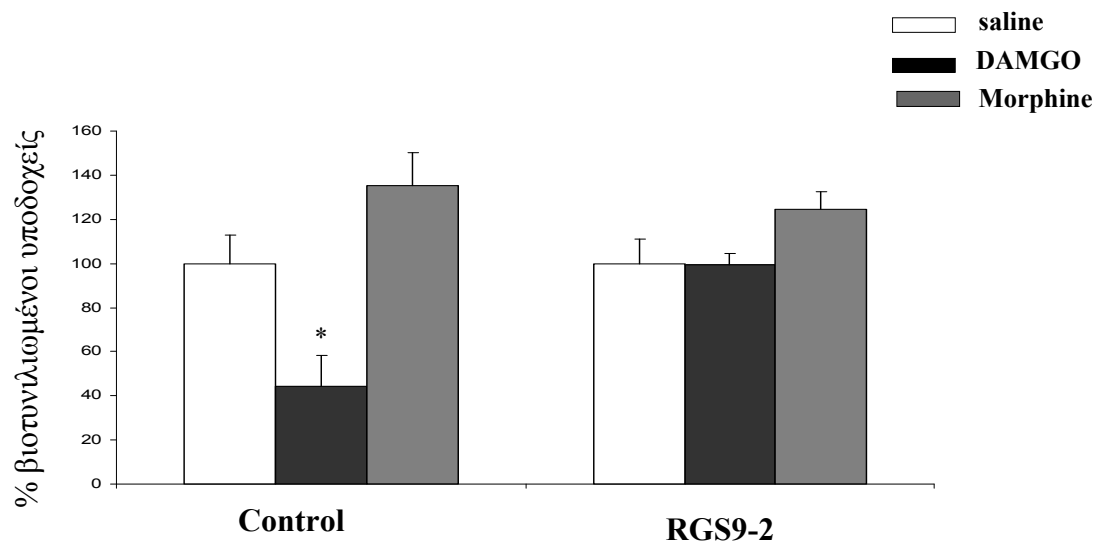
Εικόνα 3.1.4.α. Η επίδραση της χορήγησης DAMGO στον εντοπισμό του HA-MOR παρουσία ή απουσία της RGS9-2 σε HEK 293 κύτταρα. Η RGS9-2 φυσιολογικά εντοπίζεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (A). Απουσία όμως του DEP τμήματος παρουσιάζει διάχυτη κατανομή μέσα στο κύτταρο (B). Η υπερέκφραση της RGS9-2 καθυστερεί την ενδοκύττωση του MOR κατόπιν της χορήγησης DAMGO (Δ). Αντίθετα η παρουσία της DEPlless-RGS9-2 οδηγεί σε γρηγορότερη ενδοκύττωση του υποδοχέα (E) από ότι γίνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες.



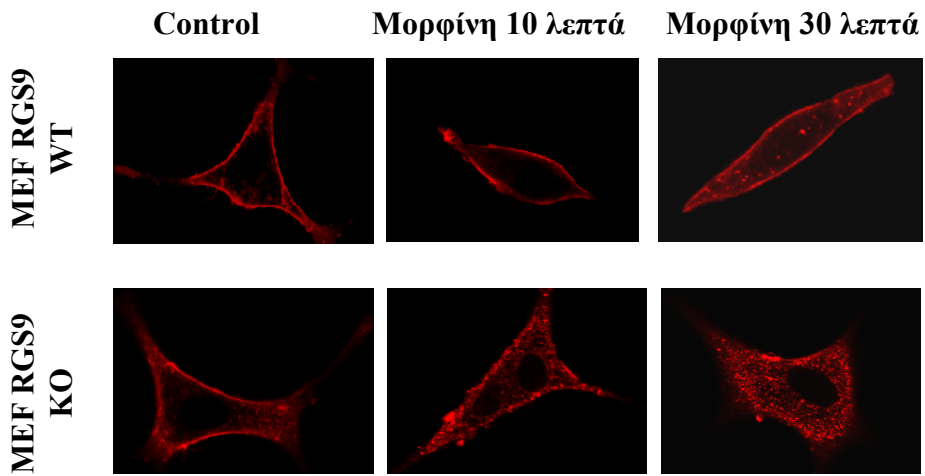
Εικόνα 3.1.4.β. Η επίδραση της χορήγησης μορφίνης στον εντοπισμό του HA-MOR παρουσία ή απουσία της RGS9-2 σε HEK 293 κύτταρα. Φυσιολογικά η ενδοκύττωση του υποδοχέα ξεκινάει στα 30 λεπτά (A). Η υπερέκφραση της RGS9-2 καθυστερεί την ενδοκύττωση του MOR (B). Αντίθετα η παρουσία της DEPlless-RGS9-2 οδηγεί σε γρηγορότερη ενδοκύττωση του υποδοχέα (Γ).



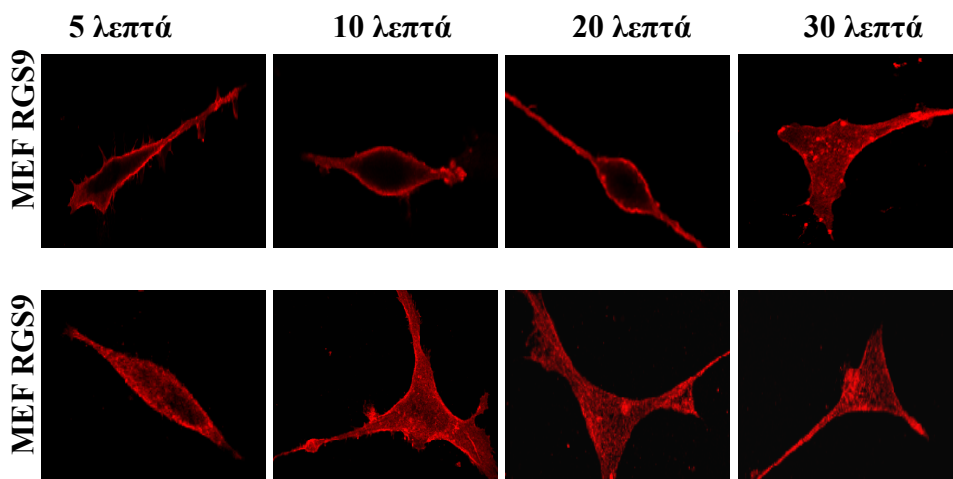
Εικόνα 3.1.4.γ.1. Ανίχνευση της ενδοκύτωσης του μ οπιοειδή υποδοχέα (HA-MOR) με τη μέθοδο της ELISA, σε PC12 κύτταρα μετά από διέγερση 15 και 30 λεπτών. Στα 30 λεπτά και ενώ υπο φυσιολογικές συνθήκες μετά τη χορήγηση DAMGO ο υποδοχέας ενδοκυττώνεται, η υπερέκφραση της RGS9-2 αναστέλλει τη διαδικασία αυτή. Αντίθετα η παρουσία της Depless RGS9-2 οδηγεί σε γρήγορη ενδοκύτωση του MOR μετά τη διέγερση του από DAMGO ή μορφίνη (B). Στα 15 λεπτά η Depless RGS9-2 οδηγεί σε γρήγορη ενδοκύτωση του MOR μετά τη διέγερση του από DAMGO ή μορφίνη (A). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM, n = 5–6 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test.



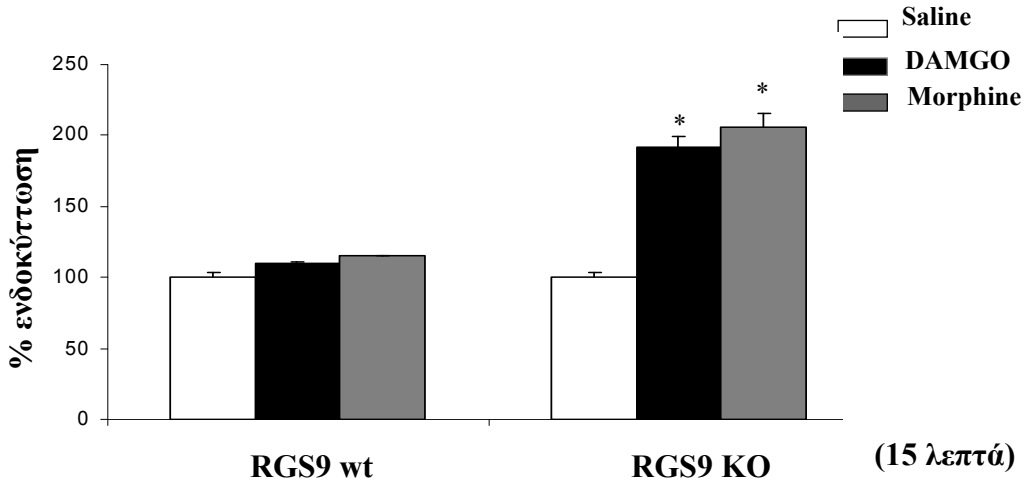
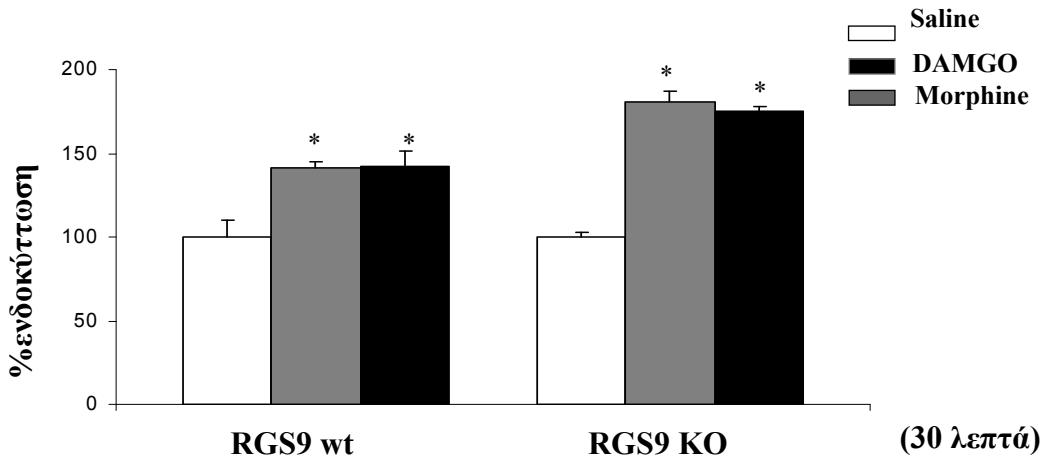
Εικόνα 3.1.4.γ.2. Ανίχνευση της ενδοκύτωσης του μ οπιοειδή υποδοχέα (HA-MOR) με τη μέθοδο της βιοτυνλίωσης, σε PC12 κύτταρα μετά από διέγερση 15 λεπτών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μετά τη χορήγηση DAMGO ο υποδοχέας ενδοκυττώνεται, η υπερέκφραση όμως της RGS9-2 αναστέλλει τη διαδικασία αυτή. (n = 3 ανά ομάδα)



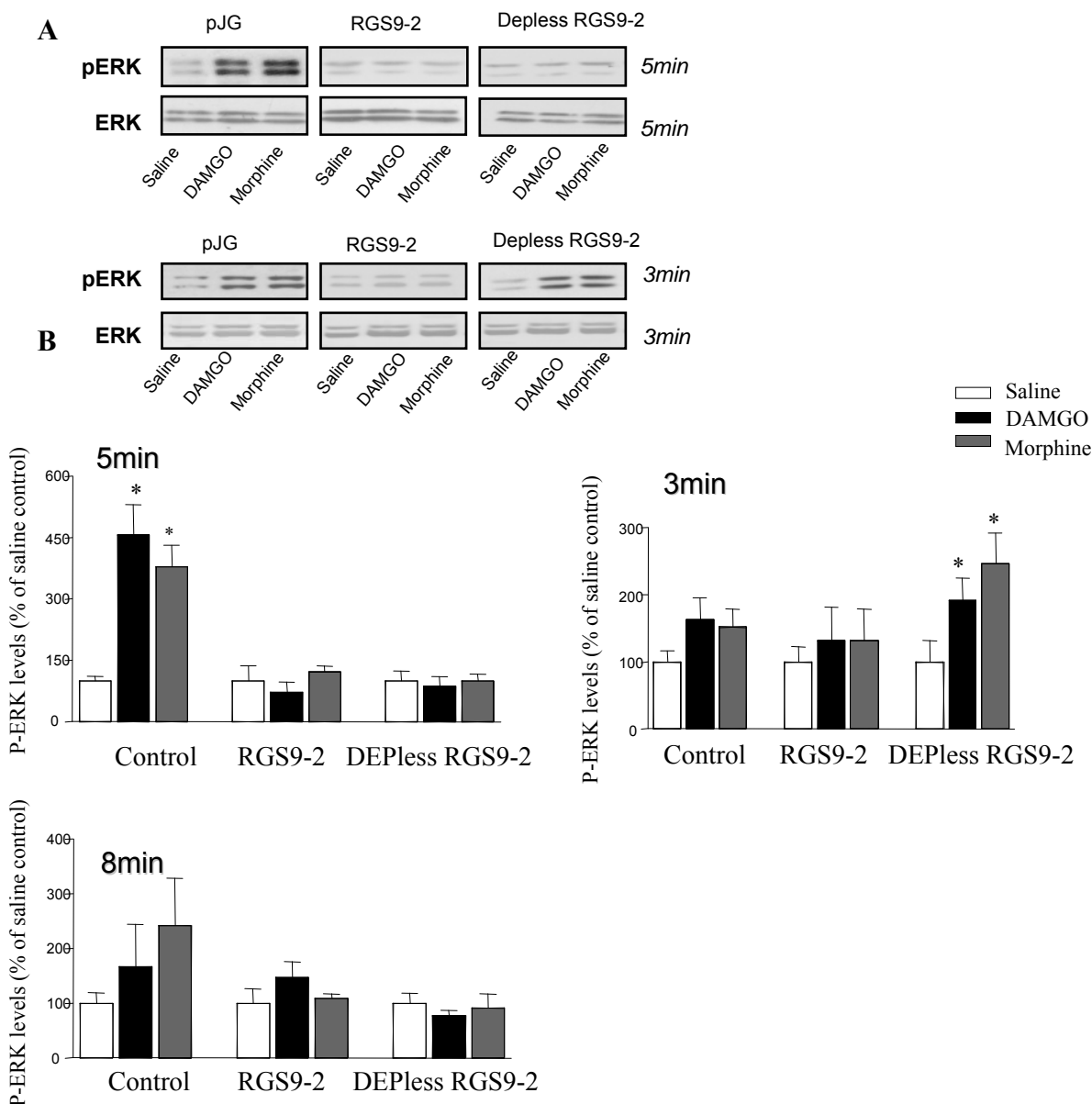
Εικόνα 3.1.5.α. Η απαλοιφή του RGS9 γονιδίου οδηγεί σε γρηγορότερη ενδοκύττωση του διεγερμένου από μορφίνη μ υποδοχέα (HA-MOR) σε ινοβλάστες που απομονώθηκαν από E14 μύες. (n = 3 ανά ομάδα)



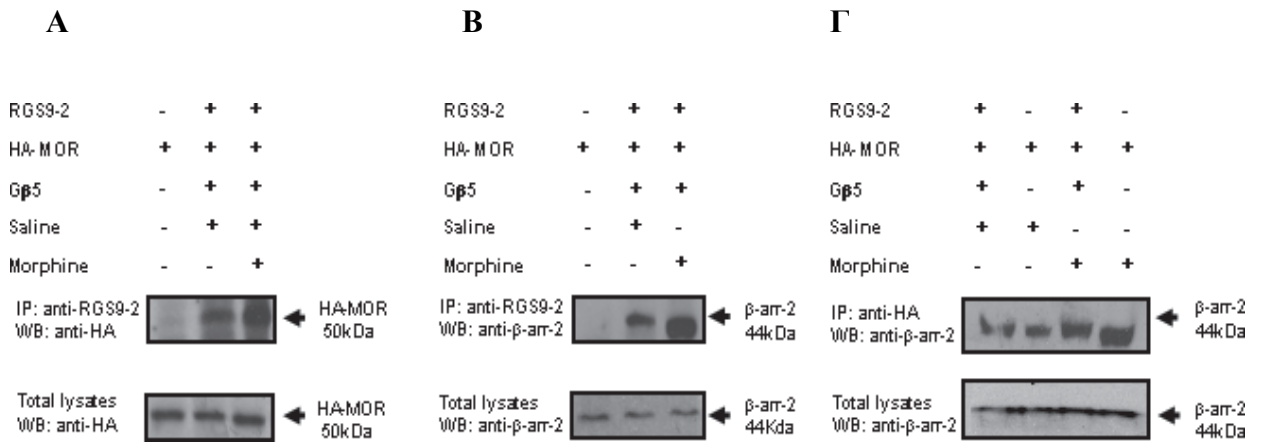
Εικόνα 3.1.5.β. Η Η απαλοιφή του RGS9 γονιδίου οδηγεί σε γρηγορότερη ενδοκύττωση του διεγερμένου από DAMGO μ υποδοχέα (HA-MOR), σε ινοβλάστες που απομονώθηκαν από E14 μύες. (n=3 ανά ομάδα).

A**B**

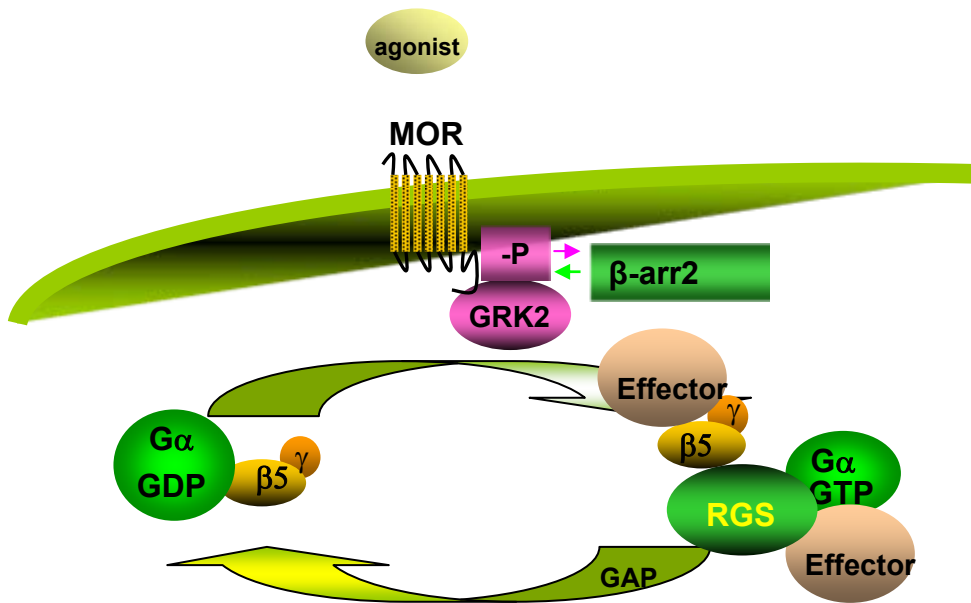
Εικόνα 3.1.5.γ Ανίχνευση της ενδοκύτωσης του μ οπιοειδή υποδοχέα (HA-MOR) με τη μέθοδο της ELISA, σε MEF κύτταρα μετά από διέγερση 30 και 15 λεπτών. Αντίθετα με τους RGS9 WT ινοβλάστες, η χορήγηση φαρμάκων για 15 λεπτά στους RGS9 KO ινοβλάστες, οδηγεί σε ενδοκύττωση του MOR (A). Στα 30 λεπτά η ενδοκύττωση του υποδοχέα έχει ξεκινήσει και στους RGS9 WT ινοβλάστες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM, n = 5–6 ανά ομάδα, *p < 0.05 ανάμεσα στις χορηγήσεις σε κάθε ομάδα ζώων, ANOVA ακολουθούμενη από PLSD test.



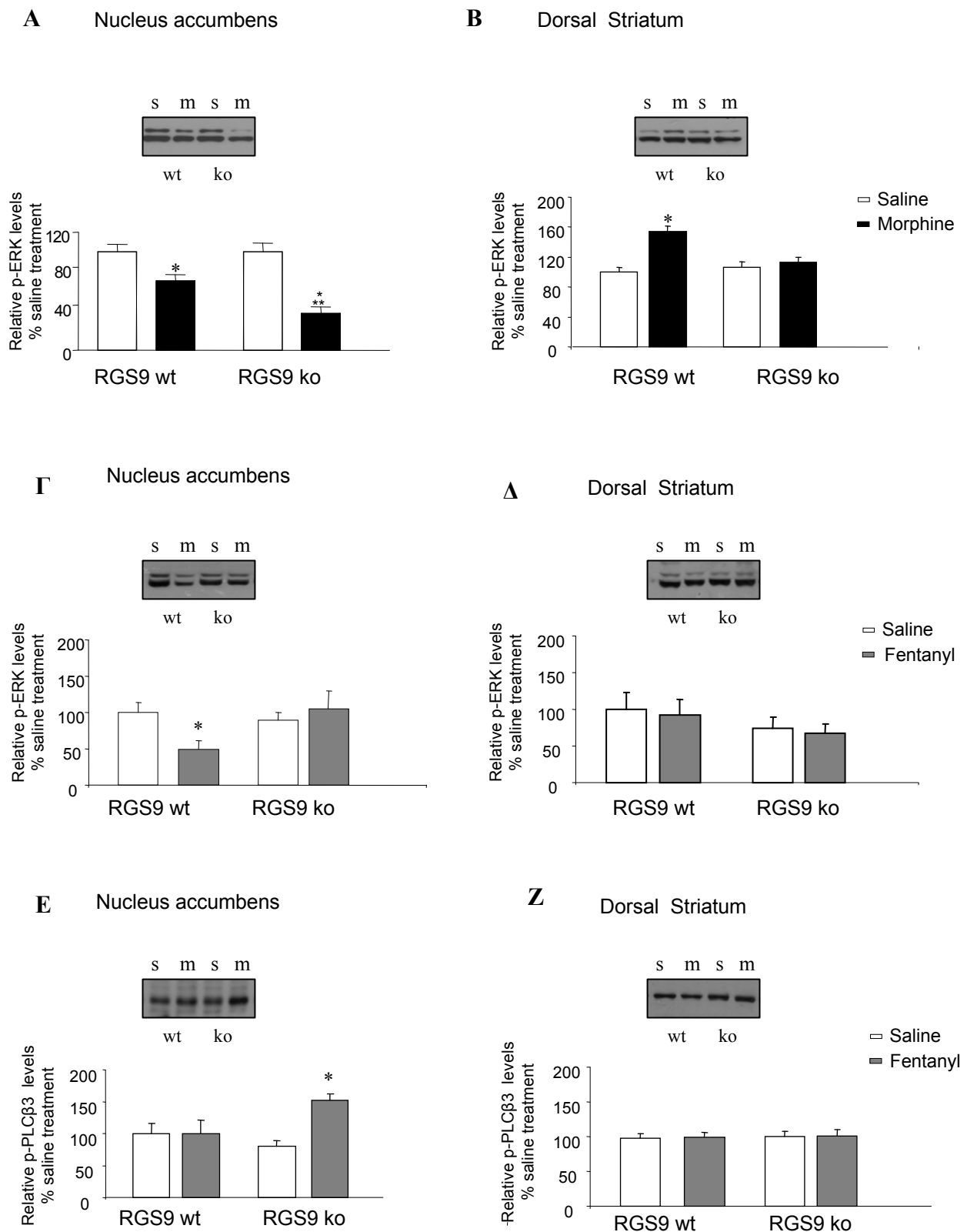
Εικόνα 3.1.6. Η RGS9-2 εμποδίζει την *in vitro* φωσφορυλίωση της ERK στα 5 λεπτά μετά τη χορήγηση μορφίνης ή DAMGO. PC12 κύτταρα διαμολύνθηκαν με την RGS9-2 και την Depless RGS9-2. Η Depless RGS9-2 προκαλεί γρηγορότερη φωσφορυλίωση της ERK από ότι φυσιολογικά. Οι μ υποδοχείς ενεργοποιήθηκαν από 10μM μορφίνης και 5μM DAMGO. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK μετρήθηκαν με την ανάλυση πρωτεϊνών κατά western και εκφράζονται ως mean ± SEM, n = 5–6 ανά ομάδα, *p < 0.05 ανάμεσα στις χορηγήσεις σε κάθε ομάδα ζώων, ANOVA και PLSD test.



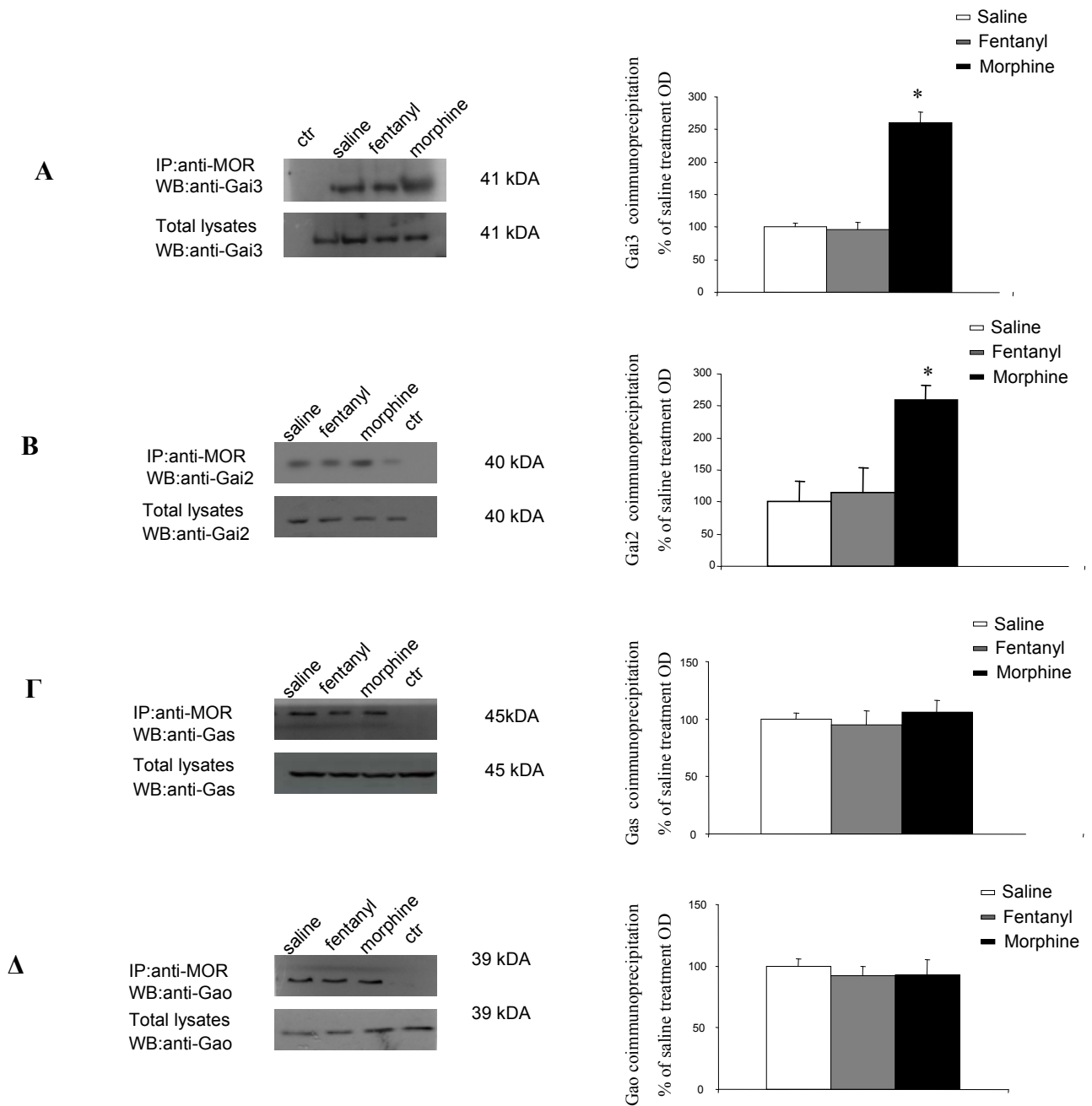
Εικόνα 3.1.7. *In vitro* αλληλεπίδραση του μ οπιοειδή υποδοχέα με τη β-αρρεστίνη 2 και την RGS9-2. PC12 κύτταρα διαμολύνθηκαν με την RGS9-2, την Gβ5 και τον HA μ υποδοχέα. Τα σύμπλοκα ανιχνεύθηκαν με μελέτες ανοσοκατακρίμησης. Η έκθεση σε μορφίνη ενισχύει το σχηματισμό των συμπλόκων μεταξύ RGS9-2 και MOR και RGS9-2/ β-αρρεστίνη 2.



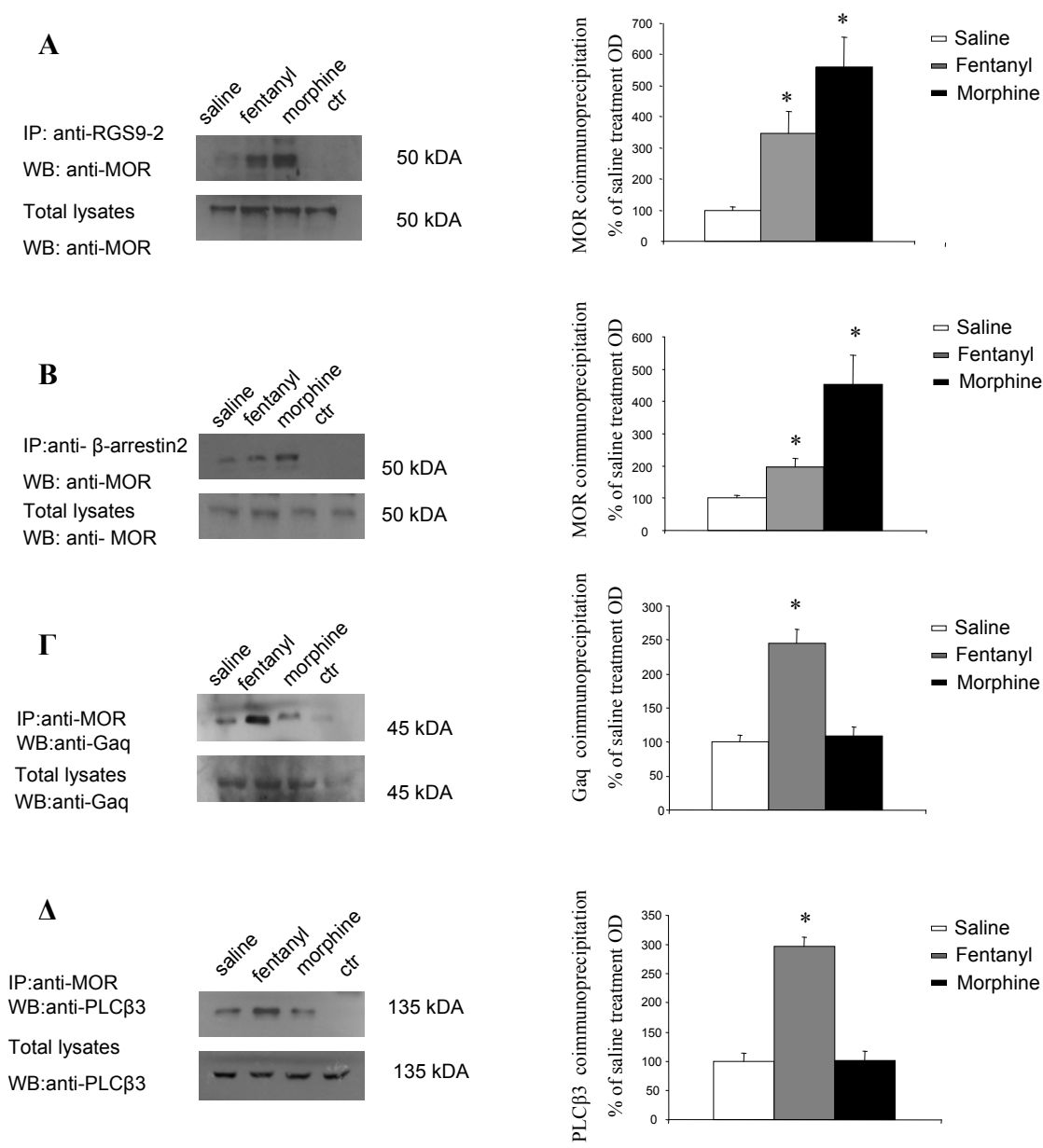
Εικόνα 3.1.8. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της διάρκειας και του εύρους της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών, από τις RGS πρωτεΐνες



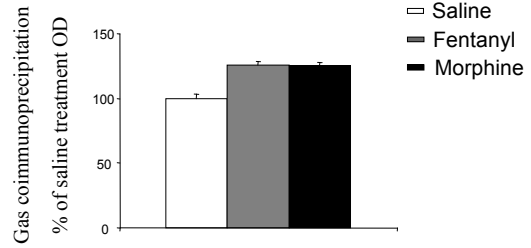
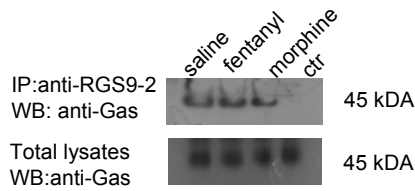
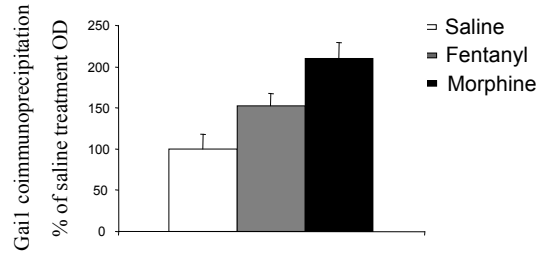
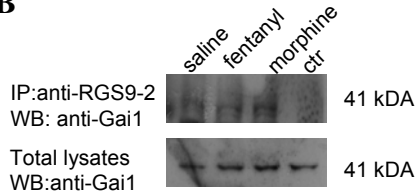
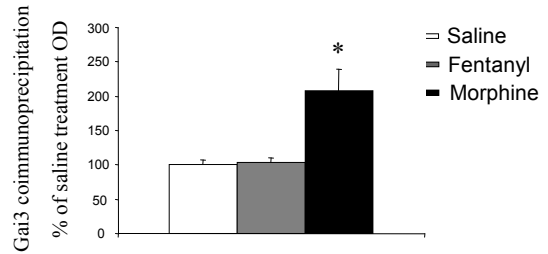
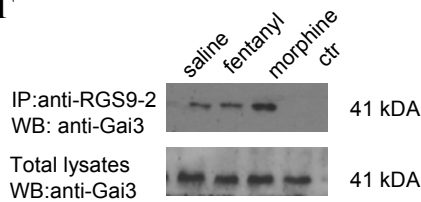
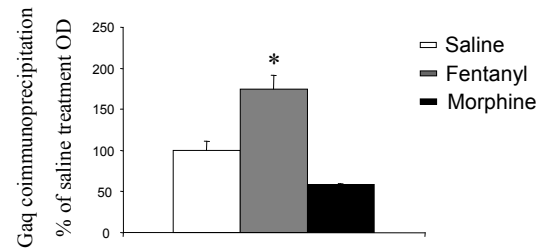
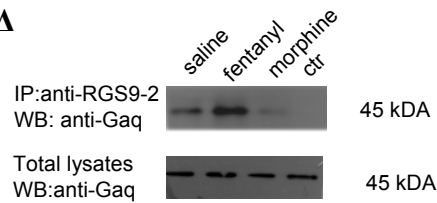
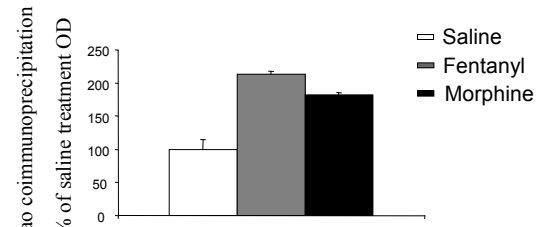
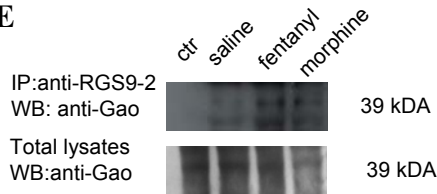
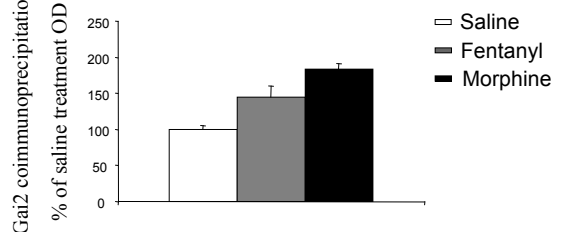
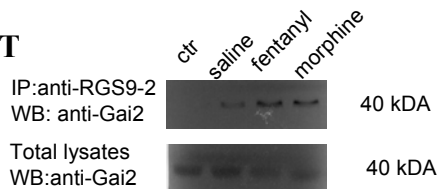
Εικόνα 3.2. Επίπεδα έκφρασης της p-ERK 30 λεπτά μετά τη χορήγηση μορφίνης και 10 λεπτά μετά τη χορήγηση φαιτανύλης, καθώς και της p-PLCβ3 10 λεπτά μετά τη χορήγηση φαιτανύλης, στον επικλινή πυρήνα (nucleus accumbens) και στο ραχιαίο ραβδωτό (dorsal striatum). Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK και PLCβ3 μετρήθηκαν με την ανάλυση πρωτεϊνών κατά western και εκφράζονται ως mean ± SEM, n = 3-4 ανά ομάδα, *p < 0.05 ανάμεσα στις χορηγήσεις σε κάθε ομάδα ζώων, ANOVA και PLSD test



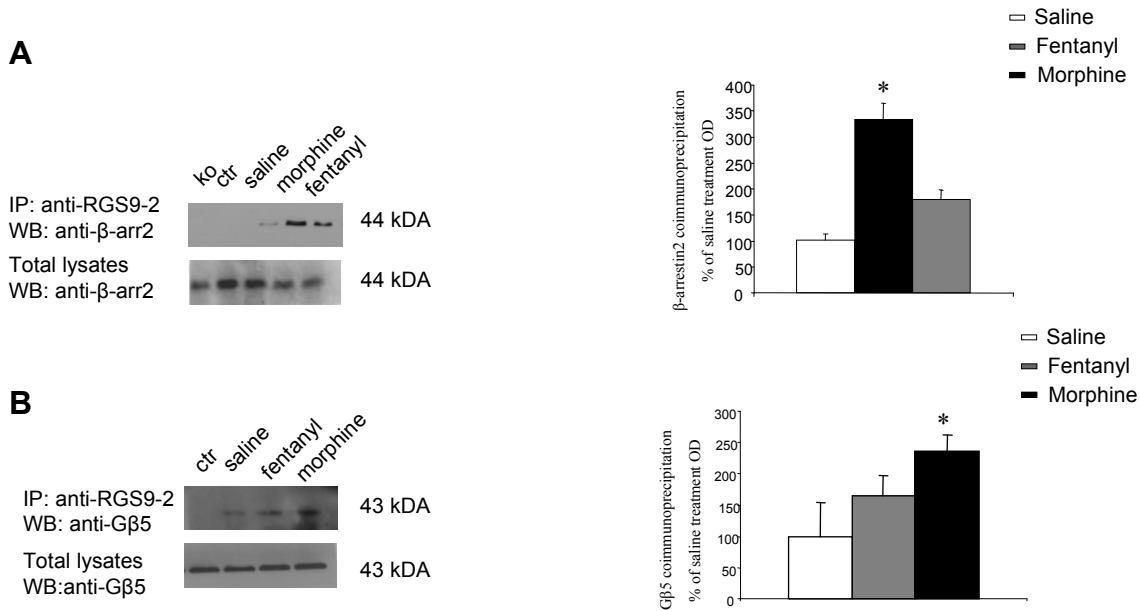
Εικόνα 3.3.1.1.α. Η χορήγηση μορφίνης ευνοεί την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις Gai3 και Gai2 υπομονάδες (A&B). Μετά τη χορήγηση και των δύο φαρμάκων τα επίπεδα αλληλεπίδρασης με τις Gas και Gao υπομονάδες παραμένουν κοντά σε αυτά που παρατηρούνται σε συνθήκες ηρεμίας. n = 3 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test



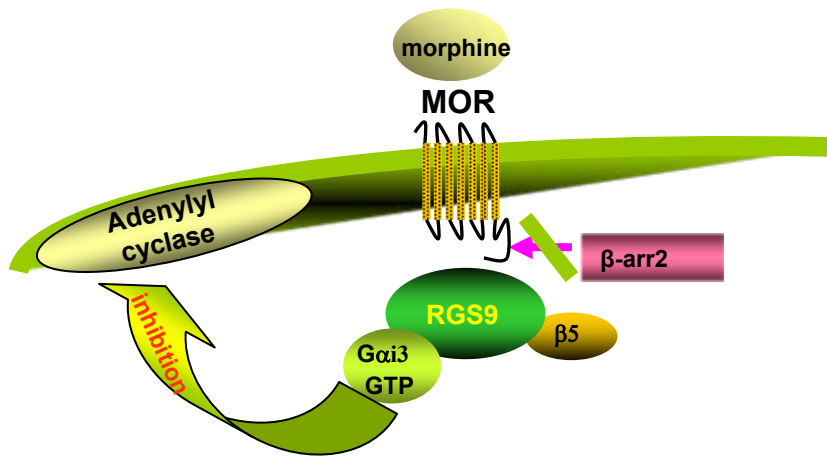
Εικόνα 3.3.1.1.β. Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο μ υποδοχέα και μόρια ‘κλειδιά’ στο σηματοδοτικό μονοπάτι μετά από εφάπαξ χορήγηση αγωνιστών. Μελέτες ανοσοκατακρίμησης έγιναν με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από ιστούς ραβδωτού ζώων στα οποία πρωτίστως είχε χορηγηθεί μορφίνη ή φαιντανύλη για 30 λεπτά. Η μορφίνη ευνοεί την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την RGS9-2 ($550 \pm 80\%$) και τη β -αρρεστίνη 2 ($450 \pm 85\%$) (A&B), ενώ η φαιντανύλη την αλληλεπίδραση του MOR με την Gaq (Γ , $245 \pm 20\%$) και την PLC β 3 (Δ , $297 \pm 16\%$). Τα επίπεδα πρωτεϊνών εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 3-4 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test

A**B****Γ****Δ****E****ΣΤ**

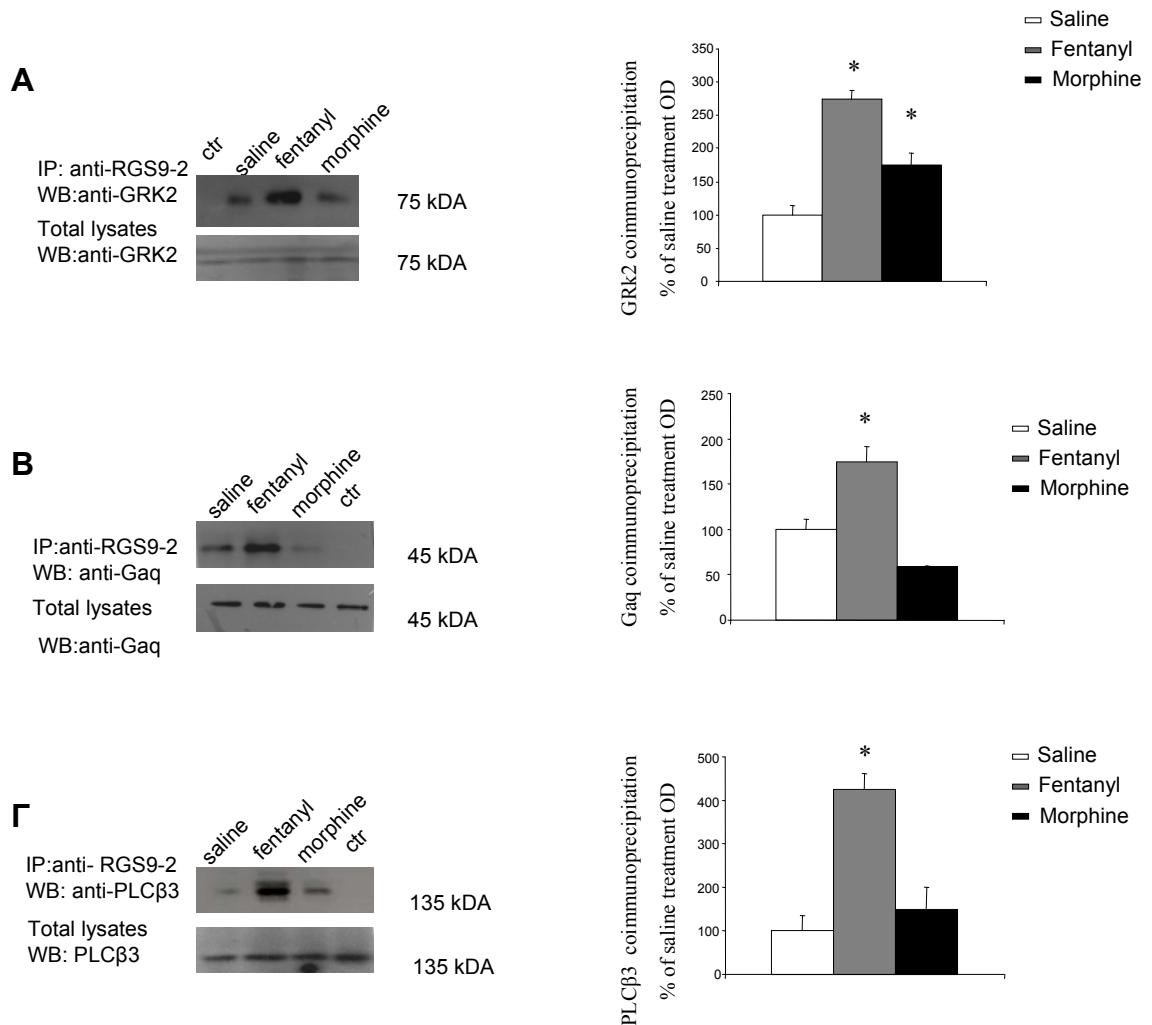
Εικόνα 3.3.1.1.γ. Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην RGS9-2 και στις Ga υπομονάδες μετά από εφάπαξ χορήγηση αγωνιστών. Στο ραβδωτό παρατηρούνται σύμπλοκα της RGS9-2 με τις Gai1 (B) και Gas (A), Gao (E) και την Gai2 (ΣΤ) κάτω από συνθήκες ηρεμίας. Η ενεργοποίηση του MOR αυξάνει τα σύμπλοκα της RGS9-2 με την Gao, την Gai1 και Gai2. Η μορφίνη αλλά όχι η φαιντανύλη αυξάνει το σύμπλοκο της RGS9-2 για την Gai3 (Γ, $218 \pm 32\%$), ενώ η φαιντανύλη ενισχύει τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ RGS9-2 και Gaq (Δ, $175 \pm 15\%$). Τα επίπεδα πρωτεϊνών εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 3-4 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test.



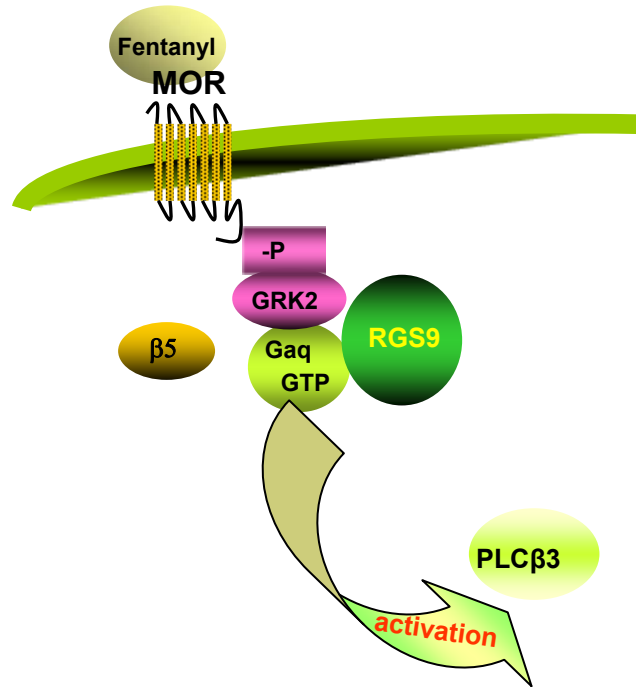
Εικόνα 3.3.1.1.δ. Σχηματισμός σηματοδοτικών συμπλόκων που ευνοούνται από την εφάπαξ χορήγηση μορφίνης. Τα επίπεδα πρωτεϊνών εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 4-5 ανά ομάδα. Παρατηρείται αύξηση αλληλεπίδρασης της RGS9-2 με τη β -αρρεστίνη 2 κατά 340 \pm 24 % (A) μετά τη μορφίνη και κατά 190 \pm 17% μετά τη φαιντανύλη (B). Το σύμπλοκο RGS9-2 G β 5 ενισχύθηκε κατά 236 \pm 26%, μετά τη μορφίνη και 164 \pm 33% μετά τη φαιντανύλη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 4-5 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test.



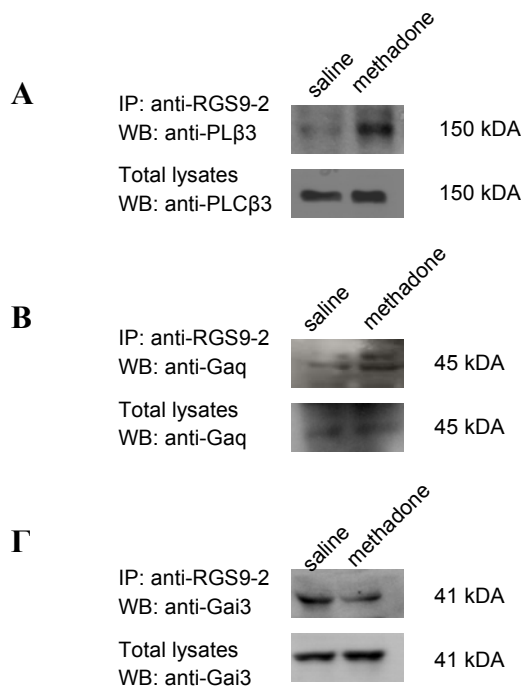
Εικόνα 3.3.1.1.ε. Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης που ξεκινάει μετά την εφάπαξ χορήγηση μορφίνης



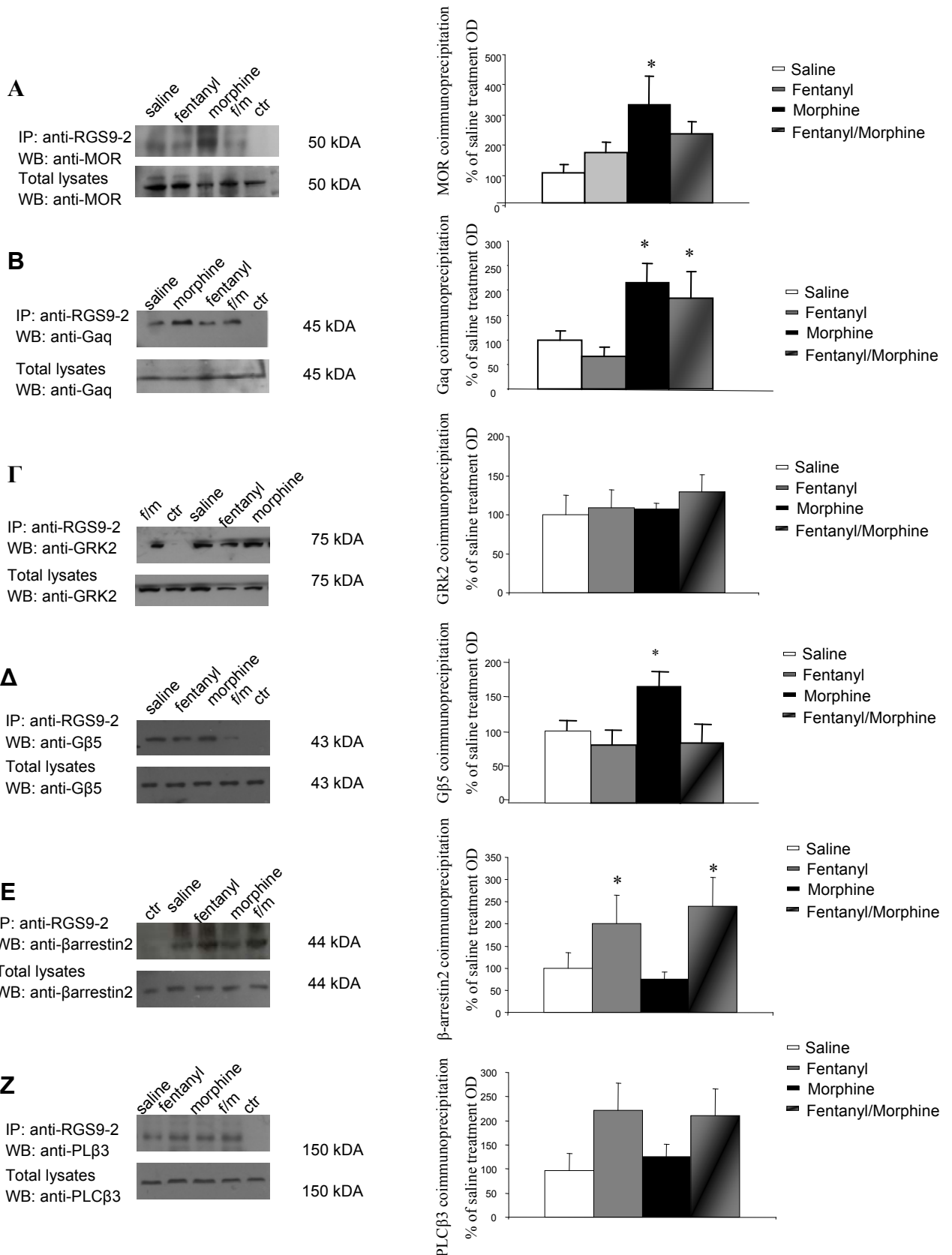
Εικόνα 3.3.1.1.ζ. Σχηματισμός σηματοδοτικών συμπλόκων που ευνοούνται από την εφάπαξ χορήγηση φαιτανύλης. Τα επίπεδα πρωτεϊνών εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 4-5 ανά ομάδα. Η αλληλεπίδραση της RGS9-2 με την GRK2 ενισχύθηκε κατά $274 \pm 14\%$ από την φαιτανύλη (A), ενώ οι RGS9-2/Gaq κατά $174 \pm 18\%$ (B) και οι RGS9-2/PLCβ3 κατά $429 \pm 19\%$ (Γ). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 4-5 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test



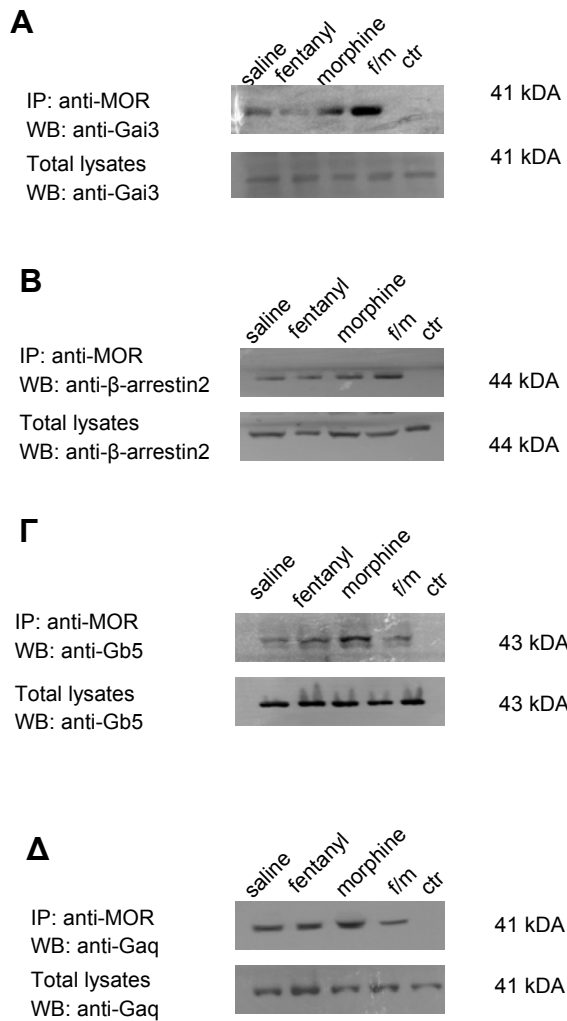
Εικόνα 3.3.1.1.στ. Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης που ξεκινάει μετά την εφάπαξ χορήγηση φαιντανύλης.



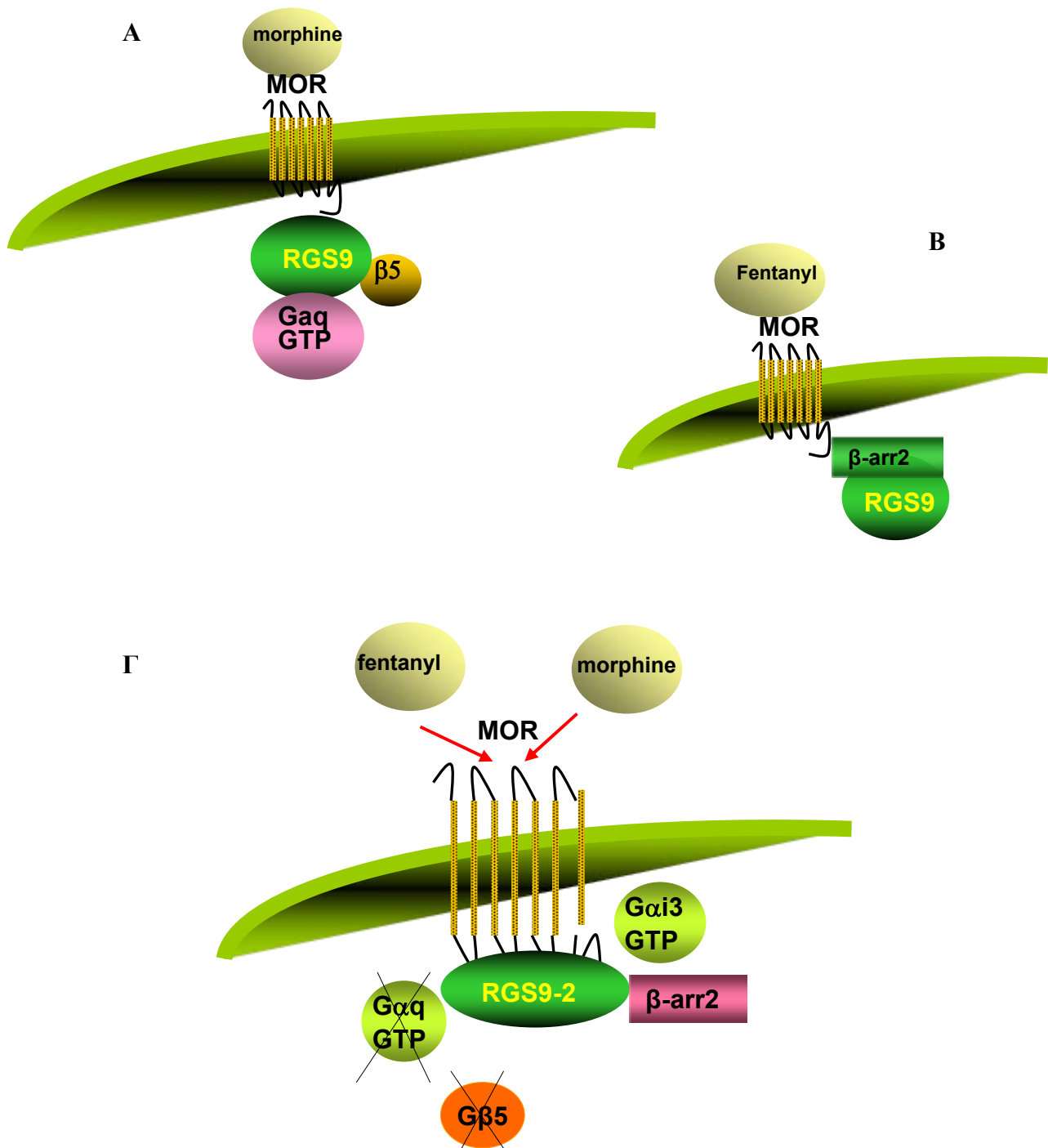
Εικόνα 3.3.2. Η εφάπαξ χορήγηση μεθαδόνης ευνοεί την αλληλεπίδραση της RGS9-2 με την PLCβ3 και την Gαq (A&B) αλλά όχι με την Gαi3 (Γ).



Εικόνα 3.4.1.α. Η χρόνια χορήγηση μορφίνης ευνοεί την αλληλεπίδραση της RGS9-2 με τον μ υποδοχέα (A, $323 \pm 87\%$), την Gaq (B, $216 \pm 39\%$), και Gβ5 (Δ, $171 \pm 21\%$), ενώ η χρόνια χορήγηση φαιντανύλης ευνοεί την αλληλεπίδραση της RGS9 με τη β-αρρεστίνη 2 (E, $218 \pm 54\%$) ενώ δεν αυξάνονται τα σύμπλοκα της RGS9-2 με GRK2 και PLCβ3. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM, n = 5-6 ανά ομάδα, ANOVA και PLSD test



Εικόνα 3.4.1.β. Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο μ υποδοχέα και μόρια ‘κλειδιά’ στο σηματοδοτικό μονοπάτι μετά από χρόνια χορήγηση αγωνιστών



Εικόνα 3.4.5. Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων που ευνοούνται που από τη χρόνια χορήγηση μορφίνης (Α), φαιντανύλης (Β) και τη διαδοχική χορήγηση φαιντανύλης-μορφίνης (Γ).

A

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΑΙΝΤΑΝΪΛΗΣ 0.2 mg/kg	%MPE ΗΜΕΡΑ 1	%MPE ΗΜΕΡΑ 4
RGS9 ^{+/+}	89.9±10	49.4±13
RGS9 ^{-/-}	68.2±17	49.77±14

B

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΜΟΡΦΪΝΗΣ 20 mg/kg	%MPE ΗΜΕΡΑ 1	%MPE ΗΜΕΡΑ 4
RGS9 ^{+/+}	70±9.90	9.9±6
RGS9 ^{-/-}	89±4	44.9±12

Γ

ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ Φαιντανύλης-Μορφίνης 0.04mg/kg + 20 mg/kg	%MPE ΗΜΕΡΑ 1	%MPE ΗΜΕΡΑ 4
RGS9 ^{+/+}	76.9±11	34.4±15
RGS9 ^{-/-}	81.2±11	58.9±15

Εικόνα 3.5. Συμπεριφερικές μελέτες του ρόλου της RGS9-2 στην αναλγητική ανοχή που προκαλεί η χρόνια χορήγηση μορφίνης και φαιντανύλης. Οι πίνακες A και B αφορούν τη σύγκριση της αναλγητικής ανταπόκρισης ζώων που εκτέθηκαν σε φαιντανύλη ή μορφίνη μεταξύ της πρώτης και τέταρτης μέρας χορήγησης των φαρμάκων. Σύμφωνα με τους πίνακες A και B η χορήγηση φαιντανύλης δεν προκαλεί σημαντική μείωση της αναλγησίας και τα RGS9^{-/-} ζώα δεν παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά από τα ζώα αγρίου τύπου. Αντίθετα ενώ τα RGS9^{-/-} ζώα παρουσιάζουν μικρή ανοχή στη μορφίνη, τα ζώα αγρίου τύπου παρουσιάζουν αυξημένη ανοχή στο φάρμακο. Ο πίνακας Γ δείχνει ότι στα ζώα αγρίου τύπου, η χορήγηση μικρής δόσης φαιντανύλης 30 λεπτά πριν τη χορήγηση μορφίνης, προλαμβάνει την ανάπτυξη ανοχής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % Maximal possible effect (MPE = (Latency-baseline)/(cutoff-latency)).n = 6-8 ζώα ανά ομάδα, t-test..

A

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΟΥ	ΕΓΧΥΣΗ ΙΟΥ	%MPE
Φαιντανύλη 0.2 mg/kg	AAV GFP	66.4±7
Φαιντανύλη 0.2 mg/kg	AAV RGS9-2	33±10

B

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΟΥ	ΕΓΧΥΣΗ ΙΟΥ	%MPE
Μορφίνη 20 mg/kg	AAV GFP	91.8±5
Μορφίνη 20 mg/kg	AAV RGS9-2	49.8±3

Πίνακας 3.5.β. Συμπεριφερικές μελέτες του ρόλου της RGS9-2 στην αναλγητική απόκριση που προκαλεί η χορήγηση μορφίνης και φαιντανύλης. Οι πίνακες A και B αφορούν τη σύγκριση της αναλγητικής ανταπόκρισης ζώων στα οποία εισήχθη AAV GFP ή AAV RGS9-2 ιός και εκτέθηκαν σε φαιντανύλη ή μορφίνη. Σύμφωνα με τους πίνακες η υπερέκφραση της RGS9-2 προκαλεί σημαντική μείωση της αναλγησίας μετά τη χορήγηση φαιντανύλης και μορφίνης σε σύγκριση με τα ζώα τα οποία μολύνθηκαν με AAV-GFP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % Maximal possible effect ($MPE = (Latency-baseline)/(cutoff-latency)$). n = 6-8 ζώα ανά ομάδα, t-test.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ως νευροδιαβιβαστές οι οπιοειδείς ουσίες μεσολαβούν σε διαδικασίες όπως η αναλγησία και η ευφορία. Στην πράξη χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση του πόνου, αλλά συχνά προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες. Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση τους οδηγεί στη μείωση του αναλγητικού τους αποτελέσματος και της λειτουργικής απόκρισης των υποδοχέων.

Σε αυτήν την μελέτη, παρουσιάζουμε στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση των αποκρίσεων στα οπιοειδή από την RGS9-2 περιλαμβάνει έναν σύνθετο μηχανισμό και εξαρτάται από τον αγωνιστή που χορηγείται. Πρώτα δείχνουμε ότι μόνο η μορφίνη και όχι άλλοι αγωνιστές του μ υποδοχέα οπιοειδών όπως η μεθαδόνη και η φαιντανύλη, αυξάνει τα επίπεδα της RGS9-2 στον εγκέφαλο. Επίσης συμπεριφορικές μελέτες του εργαστηρίου μας, μέσω παραδειγμάτων αναλγησίας, έδειξαν ότι ποντίκια που στερούνται το RGS9 γονίδιο είναι πιο ευαίσθητα στην αναλγητική δράση της μορφίνης, αλλά λιγότερο ευαίσθητα στη φαιντανύλη και τη μεθαδόνη συγκριτικά με τα ζώα RGS9^{+/+}. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η RGS9-2 μπορεί να δράσει σαν αρνητικός ή θετικός ρυθμιστής των οπιοειδών αναλγητικών. Η ταυτοποίηση των σηματοδοτικών συμπλόκων που συμμετέχει η RGS9-2 έπειτα από εφάπαξ ή χρόνια ενεργοποίηση του μ υποδοχέα, βοήθησε στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης της RGS9-2 στον εγκέφαλο.

4.1. Η RGS9-2 είναι αρνητικός ρυθμιστής της ενδοκύττωσης του μ υποδοχέα.

Στις μελέτες ενδοκύττωσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού και επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά PC12, η οποία και εκφράζει ενδογενώς τον μ υποδοχέα. Μετά την υπερέκφραση της RGS9-2 ή της μεταλλαγμένης RGS9-2 που

στερείται του DEP τμήματος (DEPless RGS9-2), αλλά και του HA-MOR, κατέστη δυνατή ανίχνευση του υποδοχέα σε ένα σύστημα που περιέχει όλα τα σημαντικά μόρια που συμμετέχουν στο μηχανισμό απευαισθητοποίησης του υποδοχέα. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση οπιοειδών αγωνιστών, συντελεί στη μετατόπιση της RGS9-2 προς τις περιοχές που εντοπίζεται ο μ υποδοχέας, οδηγώντας σε αύξηση του συνεντοπισμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διαδικασία αυτή, είναι η παρουσία της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, που πραγματοποιείται μέσω του τμήματος DEP. Πρόσφατες μελέτες έχουν τονίσει τη σημασία του DEP τμήματος στον εντοπισμό της RGS9-2 στο κύτταρο (Martemyanov *et al.*, 2003). Το τμήμα αυτό βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των όλων των μελών της R7 υποοικογένειας, μέσω του οποίου και αλληλεπιδρούν με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (π.χ. R7BP), προκειμένου να προσδεθούν στην κυτταρική μεμβράνη. Απαλοιφή του DEP τμήματος οδηγεί σε μη σωστή λειτουργικότητα της RGS9-2, καθώς και στη διάχυτη κατανομή της στο κυτταρόπλασμα (Martemyanov *et al.*, 2003).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες όταν σε ένα κύτταρο χορηγηθεί DAMGO, η ενδοκύττωση του υποδοχέα αρχίζει να παρατηρείται στα δέκα λεπτά. Όταν όμως χορηγηθεί μορφίνη, η διαδικασία της ενδοκύττωσης γίνεται αργότερα, στο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών. Η υπερέκφραση της RGS9-2 καθυστερεί την ενδοκύττωση του διεγερμένου MOR. Αντιθέτως όταν στα κύτταρα εκφραστεί η μεταλλαγμένη μορφή της RGS9, της οποίας και λείπει το DEP τμήμα, η διαδικασία ενδοκύττωσης του μ υποδοχέα επιταχύνεται μετά την ενεργοποίηση του από DAMGO ή μορφίνη. Σύμφωνα με τις μελέτες ανοσοφθορισμού σε κύτταρα PC12, η απαλοιφή του DEP τμήματος επηρεάζει την κατανομή της RGS9-2, η οποία μη μπορώντας πλέον να προσδεθεί στη μεμβράνη, παρουσιάζει διάχυτη κατανομή μέσα στο κύτταρο. Υποθέτουμε ότι παρόλο που η RGS9-2 δεν είναι πλέον κοντά στην κυτταρική

μεμβράνη προκειμένου να ασκήσει GTPase δράση, συνεχίζει να σχηματίζει σύμπλοκα με άλλα μόρια ρυθμιστές της σηματοδότησης και απευαισθητοποίησης του MOR. Πιθανόν στην αλληλεπίδραση της με πρωτείνες όπως η β-αρρεστίνη 2, να συντελείται η ταχύτερη ενδοκύττωση του υποδοχέα. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν το πόσο σημαντική είναι η ορθή κατανομή της RGS9-2 στο κύτταρο προκειμένου να ασκήσει τη ρυθμιστική δράση της στη σηματοδότηση του μ υποδοχέα. Επιπλέον παρέχουν ένα νέο εργαλείο επέμβασης στη δράση της RGS9-2 αφού το DEPless RGS9-2 έχει «*dominant negative*» δράση. Με βάση αυτά τα ευρήματα, για περαιτέρω μελέτες προτείνεται η παρασκευή ιών που εκφράζουν την DEPless RGS9-2, οι οποίοι διαμολύνοντας συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου βελτιώνουν την αναλγητική ανταπόκριση στη μορφίνη ανταγωνιζόμενη τη δράση της ενδογενούς RGS9-2.

Η χρήση ινοβλάστων από έμβρυα ποντικών RGS9^{+/+} ή RGS9^{-/-}, όντας πρωτογενές κυτταρικό μοντέλο, προσφέρει ένα επιπλέον εργαλείο για μελέτη της επίδρασης της RGS9 στο μηχανισμό ενδοκύττωσης του MOR. Σε σύγκριση με τα MEF αγρίου τύπου, στους ινοβλάστες που δεν εκφράζεται η RGS9, η ενδοκύττωση του ενεργοποιημένου από οπιοειδή μ υποδοχέα, γίνεται γρηγορότερα. Επιπλέον, η επίδραση της RGS9-2 στον ποσοστό ενδοκύττωσης των μ οπιοειδών υποδοχέων μελετήθηκε αρχικά με τη μέθοδο της βιοτινιλίωσης σε PC12 κύτταρα και στη συνέχεια με τη μέθοδο της ELISA τόσο σε PC12 όσο και σε MEF. Οι μελέτες επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των πειραμάτων ανοσοφθορισμού και αποδεικνύουν ότι η RGS9-2 ρυθμίζει τη διάρκεια της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών, όχι μόνο δρώντας ως GTPase, επεμβαίνοντας στο ρυθμό ενδοκύττωσης του MOR. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πρόσθετες δράσεις των RGS πρωτεϊνών όπως ο ανταγωνισμός με μόρια τελεστές των Ga και β

υπομονάδων (Hepler *et al.*, 1997, Yan *et al.*, 1997), ή ακόμη και να λειτουργήσουν σαν τελεστές σε ορισμένα σηματοδοτικά δίκτυα (Diversé-Pierluissi, 1999). Συνεπώς, οι RGS πρωτεΐνες ασκούν σύνθετες δράσεις στην σηματοδότηση των G πρωτεϊνών.

4.2.α. Η RGS9-2 διαμορφώνει τη φωσφορυλίωση της ERK *in vitro*, ανεξάρτητα από τη κατανομή της στο κύτταρο.

Οι ERK (extracellular signal-regulated kinases) πρωτεΐνες είναι από τα πιο καλά μελετημένα μέλη της οικογένειας των MAP (mitogen-activated protein kinase) κινασών και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση των οπιοειδών αγωνιστών στη φωσφορυλίωση τους (Valjent *et al.*, 2004). Πλήθος *in vitro* και *in vivo* αναφορών, υποστηρίζει ότι η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων οδηγεί σε γρήγορη και παροδική αύξηση της ERK (Fukuda *et al.*, 1996, Eitan *et al.*, 2003, Li και Chang, 1996). Πιο συγκεκριμένα, κατόπιν εφάπαξ χορήγησης μορφίνης ή DAMGO, ενεργοποιούνται οι ERK1/2 (Bilecki *et al.*, 2005) στα 3 λεπτά, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή φωσφορυλίωσης στα 5 λεπτά (Clark *et al.*, 2003). Η χρόνια χορήγηση μορφίνης οδηγεί σε προσαρμοστικούς μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν την ERK σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου (Atkins *et al.*, 1998). Αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ERK έχουν ανιχνευθεί στο VTA και στον υπομέλανα τόπο (LC) αρουραίων (Berhow *et al.*, 1996, Ortiz *et al.*, 1995), καθώς και στον επικλινή πυρήνα και στον υπομέλανα τόπο ποντικών (Valjent *et al.*, 2004, ενώ σε άλλες περιπτώσεις χορήγηση μορφίνης έχει οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων της ERK στο VTA (Narita *et al.*, 2004) και στον επικλινή πυρήνα (Eitan *et al.*, 2003).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας σε PC12 κύτταρα, δείχνουν ότι η υπερέκφραση της RGS9-2, οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης της ERK που επάγεται από τη μορφίνη και το DAMGO στα πέντε λεπτά χορήγησης. Η

μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης (DEPless RGS9-2), λόγω της διάχυτης κατανομής της στο κύτταρο, προκαλεί μερική ενεργοποίηση της pERK γρηγορότερα, στο χρονικό διάστημα των τριών λεπτών. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η RGS9-2 παίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης των οπιοειδών αγωνιστών και της κυτταρικής απόκρισης κατόπιν χορήγησής τους.

4.2.β. Η RGS9-2 διαμορφώνει τη φωσφορυλίωση της ERK και της PLCβ3 *in vitro*.

Στο ραχιαίο ραβδωτό (dorsal striatum) η μορφίνη οδηγεί σε ενεργοποίηση της ERK. Αντίθετα, στον επικλινή πυρήνα παρατηρείται μείωση της ERK μετά τη χορήγηση μορφίνης. Στα RGS9^{-/-} ζώα η μείωση της ERK ενισχύεται ακόμα περισσότερο κατά την απουσία της RGS9. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η RGS9 εκφράζεται σε όλους τους νευρώνες του ραβδωτού, είναι αναμενόμενο ότι η σηματοδότηση του MOR, στην οποία συμμετέχει και ο μηχανισμός της ERK, να διαφέρει ανάλογα με τους υποπληθυσμούς των κυττάρων της περιοχής. Συνεπώς τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK διαφέρουν όχι μόνο εξαιτίας των διαφορετικών οπιοειδών που χορηγούνται, αλλά και της ποικιλίας νευρώνων στις περιοχές του ραχιαίου ραβδωτού και του επικλινή πυρήνα.

Επιπλέον, η χορήγηση φαιντανύλης δεν προκαλεί ουσιαστικές αλλαγές στα επίπεδα της PLCβ3 στο ραχιαίο ραβδωτό, ούτε στα αγρίου τύπου ζώα ούτε στα RGS9^{-/-}. Ωστόσο στον επικλινή πυρήνα, στα RGS9^{-/-} ζώα, η φαιντανύλη οδηγεί σε ενεργοποίηση της p-PLCβ3, γεγονός που υποδεικνύει ότι η RGS9-2 ανταγωνίζεται την ενεργοποίηση της PLCβ3 από την Gαq. Παλαιότερες αναφορές (Xie *et al.*, 1999) υποστηρίζουν ότι τα PLCβ3^{-/-} ζώα παρουσιάζουν αυξημένη αναλγησία ως προς τα

οπιοειδή. Συμπεριφορικές μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα RGS9^{-/-} ζώα παρουσιάζουν μικρότερη αναλγητική ανταπόκριση στη φαιτανύλη από ότι τα RGS9^{+/+}ζώα. Με βάση τα ευρήματα αυτά, συμπεραίνουμε ότι στον επικληνή πυρήνα, η απουσία της RGS9-2 ενισχύει τη δράση της PLCβ3 και οδηγεί σε μειωμένη αναλγησία.

4.3. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η RGS9

Τα οπιοειδή χορηγούνται σε περιπτώσεις έντονου οξέως άλγους, όπως ο μεταχειρουργικός πόνος ή ακόμα και σε περιπτώσεις χρόνιου πόνου, όταν ο πόνος συνδέεται με κακοήθεια ή νευροπαθητικές ασθένειες. Ωστόσο συχνά συνδέονται από παρενέργειες όπως ανάπτυξη ανοχής και εξάρτησης. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα και προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης της RGS9-2 στη διάρκεια της σηματοδότησης του μ υποδοχέα, διενεργήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης μετά από εφάπαξ ή χρόνια διέγερση του MOR. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ιστό ραβδωτού σώματος (όπου η RGS9 εμφανίζεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις) ποντικών RGS9^{+/+} και διαγονιδιακών RGS9^{-/-}. Δεδομένου ότι το αντίσωμα για την RGS9-2 πρωτεΐνη δεν ενδείκνυται για μελέτες ανοσοφθορισμού και ανοσοϊστοχημείας, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ακριβείς πληροφορίες για την κυτταρική κατανομή της RGS9-2. Επομένως οι πρώτες πληροφορίες που έχουμε για τη δράση της RGS9-2 στη σηματοδότηση του MOR, προέρχονται από τις μελέτες ανοσοκατακρίμνισης, μέσω των συμπλόκων που συμμετέχει η ίδια.

Τα εργαλεία για *in vivo* μελέτες της δράσης σηματοδοτικών μορίων είναι αρκετά περιορισμένα. Για το λόγο αυτό η χρήση RGS9 διαγονιδιακών ζώων, συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση της επίδρασης της RGS9 στις δράσεις των οπιοειδών στη σηματοδότηση του MOR. Τα RGS9^{-/-} ζώα αποτέλεσαν επίσης σημαντικά εργαλεία για την διεκπεραίωση των συμπεριφερικών μελετών. Τα RGS9^{-/-} ποντίκια δεν παρουσιάζουν καμία φαινοτυπική ανωμαλία, ούτε παρατηρήθηκαν αλλαγές στην κινητικότητα, στην αναπαραγωγή ή στην ανάπτυξη τους. Εφόσον η RGS9-2 εκφράζεται αποκλειστικά στο ραβδωτό, οι διαφορές που παρουσιάζουν τα RGS9^{-/-} ζώα, συγκριτικά με τα RGS9^{+/+}, κατόπιν χορήγησης D2 αγωνιστών (Rahman *et al.*, 2003), ή οπιοειδών (Zachariou *et al.*, 2003), προέρχονται από την απαλοιφή του γονιδίου της RGS9 στη συγκεκριμένη περιοχή. Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί KO ζώα σε συμπεριφορικές μελέτες στα πλαίσια διερεύνησης της δράση των GPCRs και συγκεκριμένα του MOR. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα β-αρρεστίνη 2^{-/-} (Bohn *et al.*, 1999, Bohn *et al.*, 2003) και τα GRK^{-/-} (Rahagopal *et al.*, 2006). Παρόλο που τα KO μοντέλα έχουν αρκετά μειονεκτήματα και ο φαινότυπος τους μπορεί να σχετίζεται με δράσεις σε διάφορους ιστούς, ο φαινότυπος των RGS9 KO σχετίζεται με τις δράσεις της πρωτεΐνης στο ραβδωτό, εφόσον η RGS9-2 εκφράζεται αποκλειστικά σε αυτή την περιοχή του εγκεφάλου.

4.3.α. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται μετά την εφάπαξ χορήγηση μορφίνης.

Οι μελέτες ανοσοκατακρίμνησης έδειξαν ότι μετά από εφάπαξ χορήγηση μορφίνης ο MOR στρατολογεί την Gai3 υπομονάδα, ενώ αυτό δεν παρατηρείται μετά από χορήγηση άλλων οπιοειδών αγωνιστών. Τόσο η μορφίνη όσο και άλλοι οπιοειδείς αγωνιστές προκαλούν αύξηση της πρόσδεσης του MOR με την Gai2 και με την Gai1,

ενώ μικρότερα επίπεδα αλληλεπίδρασης εμφανίζονται μεταξύ MOR και Gai0 στο ραβδωτό. Προηγούμενες εργασίες αναφέρουν ότι μ υποδοχέας δεσμεύει αποτελεσματικότερα την Gai3 υπομονάδα, σε αντίθεση με τον δ υποδοχέα που δεσμεύει αποτελεσματικότερα την Gai1 (Pasche *et al.*, 2005). Οι μελέτες μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι η RGS9-2 συμμετέχει σε αυτά στα σύμπλοκα που ενεργοποιούνται κάτωθεν του μ υποδοχέα στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS9-2 πρωτεΐνης με την Gai3 έπειτα από χορήγηση μορφίνης και αύξηση του σχηματισμού RGS9-2/Gβ5 συμπλόκου, το οποίο συμβάλλει σημαντικά στη σταθερότητα της RGS9-2 και στην αύξηση του χρόνου ημιζωής της.

Οι μηχανισμοί απευαισθητοποίησης του μ υποδοχέα των οπιοειδών περιλαμβάνουν πρόσδεση της β-αρρεστίνης 2 στο καρβοξυτελικό του άκρο (Ferguson, 2001). Δείξαμε αρχικά σε κύτταρα και έπειτα σε ιστούς ραβδωτού σώματος, ότι η RGS9 δημιουργεί ενισχυμένο σύμπλοκο με την β-αρρεστίνη 2, παρεμβαίνοντας στους μηχανισμούς απευαισθητοποίησης του MOR. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται από συμπεριφορικές μελέτες όπου χορηγήθηκε μορφίνη σε RGS9^{+/+} και RGS9^{-/-} ποντίκια και παρατηρήθηκε αυξημένη αναλγησία και καθυστέρηση ανάπτυξη ανοχής στα ζώα που τους έλειπε το γονίδιο της RGS9. (Zachariou *et al.*, 2003, Psifogeorgou *et al.*, 2007) (εικόνα 3).

4.3.β. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται μετά την εφάπαξ χορήγηση φαιτανύλης.

Η ενεργοποίηση του μ υποδοχέα από την εφάπαξ χορήγηση φαιτανύλης, οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών συμπεριλαμβανομένου της

PKA και της φωσφολιπάσης C (PLC/PI). Η ενεργοποίηση διαφόρων ισομορφών της PLCβ (1 και 3 στον εγκέφαλο) είναι συνέπεια της στρατολόγησης της Gαq υπομονάδας από τον MOR. Και σε αυτήν την περίπτωση, όπως και με τις άλλες Gα υπομονάδες, η RGS9-2 αποτελεί τμήμα του συμπλόκου που σχηματίζεται από την Gαq, τον MOR και τη GRK2. Η χορήγηση φαιντανύλης έχει πολύ μικρό αποτέλεσμα στην αλληλεπίδραση RGS9-2/β-αρρεστίνη 2 σε αντίθεση με τη μορφίνη. Επίσης ενώ η μορφίνη οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS9-2 με τη Gβ5 υπομονάδα, η φαιντανύλη δεν επάγει το σχηματισμό τέτοιων συμπλόκων. Η PLCβ3 είναι τελεστής της Gαq υπομονάδας, στην οποία δρα και σαν GAP (Mukhopadhyay και Ross, 1999), επιταχύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη λήξη της σηματοδότησης. Επιπλέον, παλαιότερες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια PLCβ3^{-/-} αναφέρουν ότι τα συγκεκριμένα ζώα παρουσίασαν ενισχυμένη ευαισθησία ως προς την αναλγητικές ιδιότητες των οπιοειδών (Xie *et al.*, 1999). Επομένως η ανταγωνιστική δράση της RGS9-2 στην ενεργοποίηση της PLCβ3 μετά από χορήγηση φαιντανύλης, έχει θετική ρυθμιστική επίδραση, περιορίζοντας τη διάρκεια της σηματοδότησης της και αυξάνοντας το αναλγητικό αποτέλεσμα. Επίσης η αυξημένη αλληλεπίδραση μεταξύ RGS9-2 και GRK2 συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές που υποστηρίζουν ότι η ρύθμιση των GPCRs από τις GRK συσχετίζεται άμεσα με την αποτελεσματικότητα των οπιοειδών αγωνιστών (Konoor *et al.*, 1998). Τα οπιοειδή υψηλής ενεργότητας (efficacy) όπως η φαιντανύλη, ενεργοποιούν περισσότερο τις GRK κινάσες (Terman *et al.*, 2004), συγκριτικά με τα χαμηλότερης ενεργότητας, όπως η μορφίνη. Η στρατολόγηση της GRK2 στη μεμβράνη παρέχει ένα θεμελιώδες βήμα στη διαδικασία της απευαισθητοποίησης που ελέγχει τους GPCRs. Συμπεριφορικές μελέτες που ολοκληρώθηκαν στο εργαστήριό μας, έδειξαν ότι τα RGS9^{-/-} ζώα

παρουσιάζουν μειωμένη αναλγησία ως προς την φαιτανύλη και καθυστέρηση ανάπτυξης ανοχής σε σχέση με τα άγριου τύπου ζώα (εικόνα 3).

4.3.γ. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται μετά την εφάπαξ χορήγηση μεθαδόνης είναι όμοιες με εκείνες που ευνοούνται κατόπιν χορήγησης φαιτανύλης.

Η μεθαδόνη όπως και η φαιτανύλη είναι συνθετικά οπιοειδή και έχουν γρηγορότερο έναρξη δράσης από ότι η μορφίνη (Hansen, 1994) αλλά μικρότερη αναλγητική ισχύ. Προκειμένου να εξακριβώσουμε εάν και άλλα αναλγητικά φάρμακα προκαλούν τις ίδιες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που προκαλεί η φαιτανύλη, χρησιμοποιήσαμε μεθαδόνη τόσο σε συμπεριφορικές μελέτες όσο και σε μελέτες ανοσοκατακρίμνισης. Όπως και στη περίπτωση ενεργοποίησης του MOR από τη φαιτανύλη, η διέγερση του υποδοχέα από τη μεθαδόνη οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκων με την RGS9-2/Gαq και PLCβ3. Επίσης σε συμφωνία με τα ευρήματα που αφορούσαν τη χορήγηση φαιτανύλης, η χορήγηση μεθαδόνης δεν προκαλεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποδοχέα και της RGS9-2 με την Gai3 υπομονάδα.

4.4.α. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται μετά τη χρόνια χορήγηση μορφίνης.

Γνωρίζοντας τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δημιουργούνται κατά την εφάπαξ χορήγηση οπιοειδών, οι μελέτες ανοσοκατακρίμνισης επεκτάθηκαν προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η χρόνια χορήγηση αγωνιστών οδηγεί σε αναδιοργάνωση των σηματοδοτικών συμπλόκων μέσα στο κύτταρο. Στη σηματοδότηση που ξεκινά μετά τη χρόνια χορήγηση μορφίνης, η RGS9-2 εξακολουθεί να παρουσιάζει αυξημένη συγγένεια για τον MOR και τη Gβ5 υπομονάδα, αλλά αλληλεπιδρά σε πολύ μεγάλο βαθμό με την Gαq υπομονάδα. Η πιθανότητα ρύθμισης *in vivo* τόσο των Gai/ο όσο

και των Gαq υπομονάδων από το σύμπλοκο RGS9-2/Gβ5, αναφέρθηκε πρώτη φορά σε παλαιότερες μελέτες στο *C. Elegans* (Chase *et al.*, 2001). Ωστόσο η ισχυρή πρόσδεση της RGS9-2 με τη Gβ5 δεν επιτρέπει την πρόσδεση της πρώτης στην PLCβ3, επομένως και τη συμμετοχή της στη σηματοδοτική ακολουθία που ξεκινά από την PLCβ3. Το σταθερό σύμπλοκο RGS9-2/MOR εμποδίζει τη σηματοδότηση του υποδοχέα και οδηγεί σε μειωμένη αναλγητική ανταπόκριση. Συμπεριφορικές μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα RGS9^{-/-} ζώα, συγκριτικά με τα RGS9^{+/+}, παρουσιάζουν αυξημένη αναλγησία και μικρότερη ανάπτυξη ανοχής ως προς τη μορφίνη (εικόνα 3.5. πίνακας Β).

4.4.β. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται μετά τη χρόνια χορήγηση φαιντανύλης.

Η χρόνια χορήγηση φαιντανύλης ωθεί στην αλληλεπίδραση της RGS9-2 με τη β-αρρεστίνη 2, αλλά όχι με την Gβ5. Αυτό οδηγεί σε μικρό χρόνο ημιζωής της RGS9-2 αφού πλέον δε μπορεί να σταθεροποιηθεί από την Gβ5 και επομένως καλύτερη ανταπόκριση του υποδοχέα. Συμπεριφορικά πειράματα δείχνουν ότι τόσο τα RGS9^{+/+} ζώα όσο και τα KO, παρουσιάζουν βραδεία ανάπτυξη ανοχής ως προς τη φαιντανύλη (εικόνα 3.5. πίνακας Α).

4.4.γ. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται μετά τη χρόνια-διαδοχική χορήγηση φαιντανύλης και μορφίνης.

Στο παρελθόν έχουν υπάρξει κλινικές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες έχουν συγχορηγηθεί σε ασθενείς αναλγητικά προκειμένου να επιτευχθεί η μείωση της αίσθησης του πόνου. Για παράδειγμα μικρές δόσεις κεταμίνης ενίσχυσαν την αναλγητική δράση της φαιντανύλης μετά από αυχενική χειρουργική επέμβαση

(Yamauchi *et al.*, 2008). Επίσης έχει προταθεί ότι η συγχορήγηση μορφίνης και ενός οπιοειδούς αγωνιστή ο οποίος προκαλεί ενδοκύττωση του MOR, όπως η φαιντανύλη, μπορεί να εφαρμοστεί κλινικά προκειμένου να επιτευχθεί κάποιος βαθμός αναλγησίας, χρησιμοποιώντας μικρότερη συγκέντρωση μορφίνης (Hashimoto *et al.*, 2006). Συμπεριφορικές μελέτες που ολοκληρώθηκαν στο εργαστήριο μας, έδειξαν ότι η διαδοχική χορήγηση οπιοειδών (αρχικά φαιντανύλη και μισή ώρα αργότερα μορφίνη) συνέβαλε σε σημαντική καθυστέρηση ανάπτυξης ανοχής (εικόνα 3.5. πίνακας Γ).

Στις μελέτες ανοσοκατακρίμνησης, στα πλαίσια της ανίχνευσης τυχόν αλλαγών στις αλληλεπιδράσεις κατά τη σηματοδότηση του MOR, χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός δύο αναλγητικών, με πρώτη να γίνεται η χορήγηση φαιντανύλης και μισή ώρα αργότερα να ακολουθεί η χορήγηση μορφίνης. Οι αναλύσεις από τα εκχυλίσματα των ιστών ραβδωτού έδειξαν ότι η σταδιακή χορήγηση οδηγεί σε ενισχυμένη πρόσδεση της RGS9-2 με την β-αρρεστίνη2, σχηματισμοί οι οποίοι παρατηρήθηκαν και μετά τη χρόνια χορήγηση φαιντανύλης. Από την άλλη, οι μελέτες ανοσοκατακρίμνησης κατόπιν διαδοχικής χρόνιας χορήγησης οπιοειδών, έγιναν συνολικά μία ώρα μετά την παροχή φαιντανύλης. Επομένως το σύμπλοκο RGS9-2/Gα_q εξασθενεί και η σηματοδότηση του μ υποδοχέα γίνεται χωρίς τη συμμετοχή της RGS9-2. Η υπόθεση αυτή οδήγησε στην ανίχνευση αυξημένης αλληλεπίδρασης του MOR με την Gα_{i3} και πιθανώς με άλλες Gα υπομονάδες και την β-αρρεστίνη2.

Ουσιαστικά η μεγαλύτερη διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στην εφάπαξ και χρόνια χορήγηση μορφίνης, είναι η δυνατότητα του υποδοχέα να «ανταλλάσσει» την Gα υπομονάδα με την οποία προσδέεται. Η αυξημένη συγγένεια που δείχνει για τις Gα_i στην εφάπαξ χορήγηση μορφίνης, μετατρέπεται σε αυξημένη συγγένεια για την

Gαq κατά τη χρόνια χορήγηση και στη δημιουργία συμπλόκου με την Gβ5. Θεωρούμε ότι αυτή η αλλαγή συμβάλλει στη γρήγορη ανάπτυξη ανοχής κατά τη θεραπεία του χρόνιου πόνου με μορφίνη. Όπως προαναφέρθηκε, η διαδοχική χορήγηση φαιντανύλης και μορφίνης, οδηγεί σε σχηματισμό μη σταθερών συμπλόκων μεταξύ RGS9-2 και Gαq, γεγονός που επιτρέπει τη σηματοδότηση μέσω Gαi3 (και άλλων Ga υπομονάδων). Η φαιντανύλη η οποία χορηγείται μισή ώρα πριν τη μορφίνη, οδηγεί σε πρόσδεση των Gαq υπομονάδων από ένα μέρος των μ υποδοχέων, με αποτέλεσμα κατά τη χορήγηση μορφίνης οι διαθέσιμοι υποδοχείς να αλληλεπιδρούν με τις Gαi. Η όλη διαδικασία συντελεί στη διαφοροποίηση της σηματοδότησης μέσα στο κύτταρο. Με βάση την υπόθεση αυτή ακολούθησαν συμπεριφορικές μελέτες στο εργαστήριο μας. Τα ευρήματα υπέδειξαν ότι τα ζώα στα οποία έγινε η σταδιακή χορήγηση, συγκριτικά με εκείνα που είχαν λάβει μόνο μορφίνη, δεν παρουσίασαν ανοχή στις αναλγητικές δράσεις της μορφίνης.

4.5. Συμπεράσματα

Η RGS9-2 είναι σημαντικός ρυθμιστής των αναλγητικών δράσεων των οπιοειδών, παρεμβαίνοντας στα σηματοδοτικά σύμπλοκα που ακολουθούν την ενεργοποίηση του μ υποδοχέα. Δεδομένου ότι η RGS9-2 αλληλεπιδρά με τις βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση και απευαισθητοποίηση του MOR, οι μελέτες μας κατευθύνθηκαν ως προς την καλύτερη κατανόηση αυτών των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ότι η RGS9-2 αλληλεπιδρά απευθείας με μόρια κλειδιά της ενδοκύττωσης του MOR, όπως η β -αρρεστίνη 2, ή ότι μπορεί να προσδεθεί και με άλλες Ga υπομονάδες πέρα των Gai, στον εγκέφαλο. Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης μια επιπλέον δράση της RGS9-2 εκτός από την GAP ενέργεια της, σαν ανταγωνιστή τελεστών της Gaq υπομονάδας. Η RGS9-2 μπορεί να είναι θετικός ή αρνητικός διαμορφωτής των αναλγητικών αποκρίσεων του μ υποδοχέα των οπιοειδών, ανάλογα με τον αγωνιστή που χορηγείται. Επιπλέον ταυτοποιήσαμε τα σύμπλοκα που περιέχουν την RGS9-2 και ενεργοποιούνται μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση μορφίνης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη αναλγητικής ανοχής.

Σε αυτή τη μελέτη παρέχουμε αποδείξεις ότι η ρύθμιση των αποκρίσεων στα οπιοειδή από την RGS9-2, αφορά ένα πολύπλοκο μηχανισμό και εξαρτάται: 1) από τον αγωνιστή που χορηγείται, 2) τη κατανομή της πρωτεΐνης στο κύτταρο και 3) τις αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες σύνδεσης που συμμετέχουν ενεργά στα σηματοδοτικά μονοπάτια, κάτωθεν του μ υποδοχέα.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η χειραγώγηση των επιπέδων της RGS9-2 μπορεί να βελτιώσει μια θεραπευτική αγωγή περιορίζοντας κάποιες παρενέργειες. Για

παράδειγμα, σε ασθενείς με Parkinson παρατηρείται δυσκινησία που προκαλείται από την L-dopa, η οποία και χορηγείται για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η υπερέκφραση της RGS9-2 στο ραβδωτό πιθήκων, αναστέλλει τη δράση των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων, και μπλοκάρει τη δυσκινησία χωρίς να περιορίζει τις ευεργετικές δράσεις του φαρμάκου. (Gold *et al.*, 2007).

Παρομοίως, παρεμβαίνοντας στα σύμπλοκα που συμμετέχει η RGS9-2 με την Gαq και την Gβ5, περιορίσαμε την ανάπτυξη ανοχής που προκλήθηκε από τη μορφίνη, σε ποντίκια. Οι προσαρμοστικές αποκρίσεις στη χρόνια χορήγηση οπιοειδών εξαρτώνται και από τον αγωνιστή που χρησιμοποιείται. Η γνώση της προσαρμογής των συμπλόκων που σχηματίζονται στο ραβδωτό, μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των αλλαγών που συνδέονται με την ανάπτυξη ανοχής. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής αποκαλύπτουν τον ξεχωριστό ρόλο της RGS9-2 στη ρύθμιση του μ οπιοειδή υποδοχέα. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα, η RGS9 μπορεί να αποτελέσει καινούριο φαρμακευτικό στόχο για ουσίες που μπορούν να συγχωρηγηθούν με τη μορφίνη για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού αναλγητικού αποτελέσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen, P. B., Ouimet, C. C. & Greengard, P. (1997) Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9956-9961
- Alzheimer C, ten Bruggencate G. (1990) Nonopioid actions of the kappa-opioid receptor agonists, U 50488H and U 69593 on electrophysiologic properties of hippocampal CA3 neurons in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 255(2),900-5.
- Arden, J.R., Segredo, V., Wang, Z., Lamah, J. and Sadee, W., (1995) Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged μ -opioid receptor expressed in HEK293 cells. *J Neurochem.* 65, 1636–1645.
- Arshavsky VY. (2003) The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neuroscience.*, 23,10175–10181
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci.* 1,602-609.
- Attramadal, H., ArrizaJ.L. Aoki, C et al (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J.Biol Chem.* 267,17882-90
- Ballon D.R, Flanary P.L, Gladue D.P, Konopka J.B, Dohlman H.G, Thorner J.(2006) DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. *Cell.* 22,126(6):1079-93.
- Berhow M, Hiroi N, Nestler EJ (1996). Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci.* 16, 4707–4715.
- Berhow MT, Russel DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM *et al.* (1995). Influence of neurotrophic factor on morphine-and cocaine induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neurosc.* 68, 969–979.

- Berman DM, Gilman AG. (1998) Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem.* 16,273(3):1269-72. Review
- Betty, M., Harnish, S.W., Rhodes, K.J., and Cockett, M.I. (1998) Distribution of heterotrimeric G-protein beta and gamma subunits in the rat brain. *Neuroscience.* 85, 475–486
- Benovic, J.L (1995) Chromosomal mapping of the genes GPRK5 and GPRK6 encoding G protein-coupled receptor kinases GRK5 and GRK6. *Cytogenetic and Genome Research.* 70, No. 3-4
- Bilecki, W, Zapart, G, Ligęza, A, Wawrzczak-Bargiela, A, Urbaniski, MJ, and Przewlocki, R. (2005) Regulation of the extracellular signal regulated-kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci.* 62,2369–2375.
- Bohn L. M., Belcheva M. M., and Coscia C. J. (1998) Evidence for k and m-opioid receptor expression in C6 glioma cells. *J. Neurochem.* 70,1819–1825.
- Bohn, L. M., Dykstra, L. A., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. & Barak, L. S. (2004) Relative opioid efficacy is determined by the complements of the G protein-coupled receptor desensitization machinery. *Mol. Pharmacol.* 66,106-112
- Bohn, L M, Gainetdinov, R R, Lin, F T, Lefkowitz, R J, Caron, M. G. (2000) Mu-opioid receptor desensitisation by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature.* 408,720-3.
- Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D, Medvedev, I.O, Lefkowitz, R.J., Dykstra, L.A., Caron, M.G. (2003) Enhanced Rewarding Properties of Morphine, but not Cocaine, in β arrestin-2 Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience.* 23(32),10265-10273.
- Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R, Peppel, K., Caron, M,G., Lin, F.T. (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin2. *Science.* 286,2495-8.

- Bot, G., Blake, A.D., Li, S., Reisine, T. (1998) Fentanyl and its Analogs Desensitize the Cloned *Mu* Opioid Receptor, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*.285(3),1207-18.
- Bouhamdan, M., Michelhaugh, S.K., Calin-Jageman, I., Ahern-Djamali, S., Bannon, M.J. (2004) Brain-specific RGS9-2 is localized to the nucleus via its unique proline-rich domain. *Biochim. Biophys. Acta*.1691, 141–150,
- Boulton, T.G., and Cobb, M.H (1991) "Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies" *Cell Regulation*., 2, 357-571,
- Boyer, C., Schikorski, T. & Stevens, C. F. (1998) Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J. Neuroscience*. 18, 5294-5300
- Bradaia, A., Berton, F., Ferrari, S. and Lüscher, C. (2005) β -Arrestin2, interacting with phosphodiesterase 4, regulates synaptic release probability and presynaptic inhibition by opioids. *Neuroscience*. 102(8), 3034–3039
- Burack WR, Shaw AS. (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol*.12(2),211-6.
- Burford N.T, Tolbert L.M, Sadee W.(1998) specific G protein activation and mu-opioid receptor internalization caused by morphine, DAMGO and endomorphin I. *Eur J Pharmacol*. 19,342(1),123-6.
- Burns, M.E, Wensel, T.G. (2003) From molecules to behavior: new clues for RGS function in the striatum. *Neuron*. 19,38(6),853-6.
- Burchett, S. A. (2003) In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling. *J Neurochem*. 87(3),551-9.
- Cabrera, J.L., de Freitas, F., Satpaev, D.K., Slepak, V.Z. (1998) Identification of the Gbeta5-RGS7 protein complex in the retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 249, 898–902
- Calderon SN, Rothman RB, Porreca F, Flippen-Anderson JL, McNutt RW, Xu H, Smith LE, Bilsky EJ, Davis P, Rice KC (1994). "Probes for narcotic

receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist". *J. Med. Chem.* 37 (14), 2125–8

- Calderon SN, Rice KC, Rothman RB, Porreca F, Flippen-Anderson JL, Kayakiri H, Xu H, Becketts K, Smith LE, Bilsky EJ, Davis P, Horvath R (1997). "Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 23. Synthesis, opioid receptor binding, and bioassay of the highly selective delta agonist (+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]- N,N-diethylbenzamide (SNC 80) and related novel nonpeptide delta opioid receptor ligands". *J. Med. Chem.* 40 (5),695–704
- Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman, A. G., Benovic, J. L. and Kozasa, T. (1999) Selective regulation of $G\alpha_{q11}$ by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* 274, 34483–34492
- Castellone, M.D., Teramoto, H., Wlilliams, B.O., Druey, K.M. and Gutkind, J.S. (2005) Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science.* 310, 1504-1510
- Charlton JJ, Allen PB, Psifogeorgou K, Chakravarty S, Gomes I, Neve RL, Devi LA, Greengard P, Nestler EJ, Zachariou V.(2008) Multiple actions of spinophilin regulate mu opioid receptor function. *Neuron.*24,58(2),238-47.
- Chase D. L., Patikoglou G. A. and Koelle M. R. (2001)Two RGS proteins that inhibit Gao and Gaq signaling in *C. elegans* neurons require a Gb5-like subunit for function. *Curr. Biol.* 11, 222–231.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol.* 44(1),8-12.
- Cheng ZJ, Yu QM, Wu YL, Ma L, Pei G. (1998) Selective interference of beta-arrestin 1 with kappa and delta but not mu opioid receptor/G protein coupling. *J Biol Chem.* 273,24328–24333.
- Childers SR (1991) Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci.* 48,1991–2003.

- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog.Neurobiol.* 66,61-79
- Clapham, D.E., Neer, E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 167–203
- Clark M.J, Harrison C, Zhong H, Neubig, R.R and Traynor, J. (2003) Endogenous RGS protein action modulates μ -opioid signaling through $G_{\alpha o}$: Effects on adenylyl cyclase, extracellular signal-regulated kinases, and intracellular calcium pathways. *J Biol Chem.* 278,9418–25
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Déry, O., Mullins, R. D., Bunnett, N. W. (2000) β -Arrestin-Dependent Endocytosis of Proteinase-Activated Receptor 2 Is Required for Intracellular Targeting of Activated ERK1/2. *The Journal of Cell Biology.* 148, 1267-1281
- Drenan RM, Doupnik CA, Boyle MP, Muglia LJ, Huettner JE, Linder ME, Blumer KJ. (2005) Palmitoylation regulates plasma membrane-nuclear shuttling of R7BP, a novel membrane anchor for the RGS7 family. *J Cell Biol.* 169,623–633.
- De Vries, L., Zheng, B., Fisher, T., Elenko, E. and Farquhar, M.G. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40,235-271
- Diversé-Pierluissi, MA, Fischer, T, Jordan, JD, Schiff, M, Ortiz, DF, Farquhar, MG, De Vries L. (1999) Regulators of G protein signaling proteins as determinants of the rate of desensitization of presynaptic calcium channels. *J Biol Chem.* 14,274(20),14490-4.
- Dohlman HG, Thorner J.(1997) RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *Biol Chem.* 14,272(7),3871-4
- Downes GB, Gautam N. (1999)The G protein subunit gene families. *Genomics.* 15,62(3),544-52
- Druey, K.M., Blumer, K.J., Kang, V.H. and Kehrl, J.H. (1996) Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature.* 379, 742-746.

- Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D Jr, Polakiewicz R, Evans CJ. (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine-induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J Neurosci.* 10,23(23),8360-9.
- Emmerson PJ, Liu MR, Woods JH, Medzihradsky F. (1994) Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther.*271(3),1630-7.
- Evans, CJ. (2004) Secrets of the opium poppy revealed.*Neuropharmacology.* 47,293–9.
- Evans CJ, Keith Jr DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science.* 258,1952-1955
- Ferguson, S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis:the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol.Rev.*53,1-24
- Ferguson S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1–24
- Fletcher JE, Lindorfer, MA, DeFilippo, JM, Yasuda, H, Guilnard, M,Garrison JC (1998) The G protein b5 subunit interacts selectively with the Gq a subunit. *J Biol Chem.* 273,636–644.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. & Matus, A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20, 847-854
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH2-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* 271, 20024-20028.

- Gold, S. J., Ni, Y. G., Dohlman, H. G., Nestler, E. J. (1997) Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain, *J. Neurosci.* 17, 8024
- Gold SJ, Hoang CV, Potts BW, Porras G, Pioli E, Kim KW, Nadjar A, Qin C, LaHoste GJ, Li Q, Bioulac BH, Waugh JL, Gurevich E, Neve RL, Bezar E. (2007) RGS9-2 negatively modulates L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease *J Neurosci.* 26,27(52),14338-48.
- Goldsmith, G. and Dhanasekaran, D.N. (2007) G protein regulation of MAPK networks, *Oncogene.* 26, 3122–3142.
- Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, and Benovic JL (1996) β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature (Lond).* 383, 447-450
- Granneman, J.G., Zhai, Y., Zhengxian, Z., Bannon, M.J., Burchett, S.A., Schmidt, C.J., Andrade, R., Cooper. J. (1998) Molecular characterization of human and rat RGS 9L, a novel splice variant enriched in dopamine target regions, and chromosomal localization of the RGS 9 gene, *Mol. Pharmacol.* 54, 687– 694.
- Greengard, P., Allen, P. B. & Nairn, A. C. (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron.* 23, 435-447
- Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. (2002) Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience.* 109, 421-36
- Handa BK, Lane AC, Lord JAH, Morgan BA, Rance MJ, Smith CFC (1981) Analogues of β -LPH, possessing selective agonist activity at μ -opiate receptors. *Eur J Pharmacol.* 70,53 1-540.
- Hanks, S., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification *FASEB J.* 9, 576–596

- Hansen, B. D., (1994) Analgesic therapy. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 16, 868-874.
- Harris, K. M. & Kater, S. B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371
- Harvey, R.A., Champe, P.C. (1997) *Book of Pharmacology*, 2nd edition, Lippincott Williams and Wilkins
- Hashimoto, T, Saito, Y, Yamada, K, Hara, N, Kirihara, Y, Tsuchiya, M. (2006) Enhancement of Morphine Analgesic Effect with Induction of [mu]-Opioid Receptor Endocytosis in Rats. *Pain and Regional Anesthesia Anesthesiology.* 105(3),574-58.
- Hepler, J., Berman, D., Gilman, A. and Kozasa, T. (1997) RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for G_{qα} and block activation of phospholipase Cβ by γ-thio-GTP-G_{qα}, *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 428–432
- Hollinger S, Hepler JR. (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev.* 54,527–59.
- Hommel, J.D., Sears, R.M., Georgescu, D., Simmons, D.L., and DiLeone, R.J. (2003). Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat. Med.* 9, 1539–1544.
- Hu G, Wensel TG. (2002) R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99,9755–9760
- Johansson, B.B., Minsaas, L., Aragay, A.M. (2005) Proteasome involvement in the degradation of the Gq family of Ga subunits. *FEBS J.* 272(20),5365-77.
- Jones, T.L. (2004) Role of palmitoylation in RGS protein function. *Methods Enzymol.* 389, 33-55

- Jones, P.G., Lombardi, S.J., Cockett, M.I. (1998) Cloning and tissue distribution of the human G protein beta 5 cDNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1402, 288–291
- Jordan B and Devi LA (1998) Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth.* 81,12–19
- Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature.* 395(6703),713-6
- Keith D, Anton B, Murray S, Zaki P, Chu P, Lissin D, Monteilet-Agius G, Stewart P, Evans C, Von Zastrow M (1998) μ -Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism *in vitro* and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol.* 53,377-384
- Kieffer, B.L. (1995) Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15, 615–635
- Kieffer BL. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci.* 20(1),19-26
- Kieffer BL, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89,12048-12052
- Koelle M.R, Horvitz H.R. (1996) EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell.* 12,84(1),115-25.
- Koch T., Widera A., Bartzsch K., Schulz S., Brandenburg L. O., Wundrack N., Beyer A., Grecksch G. and Holt V. (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol. Pharmacol.* 67, 280–287.
- Koob G.F., Sanna P.P., Bloom F.E. (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron.* 21(3),467-76.

- Koovor A, Celver JP, Wu A, Chavkin C. (1998) Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol Pharmacol.*54(4),704-11.
- Liang, Q. and Molkenin, J.D.(2003) Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: Dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35,1385–1394.
- Li, L.Y., Chang, K.J. (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol.* 50(3),599-602.
- Liu J.G, Prather P.L. (2001) Chronic exposure to mu-opioid agonists produces constitutive activation of mu-opioid receptors in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment. *Mol Pharmacol.*60(1),53-62.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature.*9,267(5611),495-9.
- Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*193,265-75.
- Luttrell, L.M. (2002) Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G protein coupled receptors. *Can.J.Physiol.Pharm.* 80,375-382
- Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein coupled receptor signals. *J.Cell.Sci.* 115,455-465.
- Luttrell, L.M. (2003) G protein coupled receptor signaling in neuro-endocrine systems.” Location, location, location”: activation and targeting of MAP kinases by G protein coupled receptors. *J.Mol. Endocrinol.*30,117-126
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R. & Svoboda, K. (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science.* 283, 1923-1927

- Mansour A, Fox C.A, Akil H, Watson S.J (1995). "Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications". *Trends Neurosci.* 18 (1), 22–9.
- Martemyanov KA, Arshavsky VY. (2002) Noncatalytic domains of RGS9-1G β 5L play a decisive role in establishing its substrate specificity. *JBiol Chem* 277,32843–8.
- Martemyanov, K.A., Hopp, J.A., Arshavsky, V.Y. (2003) Specificity of G protein-RGS protein recognition is regulated by affinity adapters. *Neuron.* 38,857–862.
- Martemyanov KA, Lishko PV, Calero N, Keresztes G, Sokolov M, Strissel KJ, Leskov IB, Hopp JA, Kolesnikov AV, Chen CK, Lem J, Heller S, Burns M.E. (2003) The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neurosci.* 23,10175–81.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouysségur J, Brambilla R. (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron.* 34,807-820.
- McKinney, R. A., Capogna, M., Durr, R., Gähwiler, B. H. & Thompson, S. M. (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 2, 44-49
- Metzger TG, Ferguson DM. (1995) On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* 13,375(1-2),1-4
- Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P. (2001) Disease specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 6, 293–301.
- Moore, R.H., Tuffaha, A., Millman, E.E., Dai, W., Hall, H.S., Dickey, B.F., Knoll, B.J. (1999) Agonist-induced sorting of human β 2-adrenergic receptors to lysosomes during downregulation. *J. Cell Science.* 112, 329-338

- Morimoto, B.H., and Koshland, D.E. Jr. (1994) Conditional Activation of cAMP Signal Transduction by Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry.*, 269,6, 4065-4069.
- Mukhopadhyay, S., and E. M. Ross. (1999) Rapid GTP binding and hydrolysis by G(q) promoted by receptor and GTPase-activating proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96,9539–9544
- Murphy, D. D. & Segal, M. (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* 16, 4059-4068
- Narita, M., Ioka, M., Suzuki, M., Suzuki, T. (2002) Effect of repeated administration of morphine on the activity of extracellular signal regulated kinase in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* 324,97-100.
- Narita, M., Suzuki, M., Imai, S., Narita, M., Ozaki, S., Kishimoto, Y., Oe, K., Yajima, Y., Yamazaki, M., Suzuki, T. (2004) Molecular mechanism of changes in the morphine-induced pharmacological actions under chronic pain-like state: Suppression of dopaminergic transmission in the brain. *Life Sci.* 9;74(21),2655-73.
- Nebreda, A.R. and Porras, A. (2000) p38 MAP kinases: Beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* 25,257–260.
- Nestler, E.J. and Aghajanian, G.K. (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science.* 278,58-69.
- Neubig RR, Siderovski DP.(2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 1(3),187-97.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G. and Barak, L.S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201–17210.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S. and Caron, M.G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G

protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis *J. Biol. Chem.* 276, 19452–19460.

- Oltmanns U, Issa R, Sukkar M, John M, Chung K (2003). Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 139 (6),1228-34.
- Ortiz J, Fitzgerald LW, Charlton M, Lane S, Trevisan L, Guitart X, Shoemaker W, Duman RS, Nestler EJ. (1995) Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 21,289-298.
- Owen VJ, Burton PBJ, Mullen AJ, Birks EJ, Barton P, Yacoub MH. (2001) Expression of RGS3, RGS4 and Gi alpha 2 in acutely failing donor hearts and end-stage heart failure. *Eur Heart J.* 22,1015–20.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere F., Auberge P., and Pouyssegur J. (1999) "Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice" in *Science*. 286, 1374-1377.
- Paronis CA, Holtzman SG.(1992) Development of tolerance to the analgesic activity of mu agonists after continuous infusion of morphine, meperidine or fentanyl in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 262(1),1-9.
- Pasternak, G.W. (1988) *The Opiate Receptors*. Humana Press, Totowa, NJ. 520 pp.
- Paulette A. Zaki, Duane E. Keith, Jr., George A. Brine, F. Ivy Carroll and Christopher J. Evans (2000) Ligand-Induced Changes in Surface μ -Opioid Receptor Number: Relationship to G Protein Activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 292,1127–1134.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocr. Rev.* 22 (2),153–83.
- Piñeyro G, Archer-Lahlou E. (2007) Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cell Signal.* 19(1),8-19.

- Pogozheva ID, Lomize AL, Mosberg HI. (1998) Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints *Biophys. J.* 75,612–34.
- Przewłocki, R., Przewłocka, B. (2001) Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol.* 19,429(1-3),79-91.
- Psifogeorgou K, Papakosta P, Russo SJ, Neve RL, Kardassis D, Gold SJ, Zachariou V (2007) RGS9-2 is a negative modulator of mu-opioid receptor function. *J Neurochem.* 103(2),617-25.
- Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehlert FJ, Roeske WR, Yamamura HI (1999). "The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy". *Pharmacol. Rev.* 51 (3),503–32.
- Rachel, KM, Bohn, LM. (2005) Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS. J* 7,E587–91.
- Rajagopal K, Whalen EJ, Violin JD, Stiber JA, Rosenberg PB, Premont RT, Coffman TM, Rockman HA, Lefkowitz RJ.(2006) Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31,103(44),16284-9.
- Rahman, Z., Gold, S.J., Potenza, M.N., Cowan, C.W., Ni, Y.G., He, W., Wensel, T.G., Nestler, E.J.. (1999) Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene *J Neurosci.* 15,19(6),2016-26.
- Rahman, Z., Schwarz, J., Gold, S. J., Zachariou, V., Wein, M. N., Choi, K. H., Koor, A., Chen, C. K., DiLeone, R. J., Schwarz, S. C., *et al.* (2003) RGS9 modulated dopamine signaling in basal ganglia. *Neuron.* 38, 941–952.
- Raynor, K., Kong, H., Hines, J., Kong, G., Benovic, J., Yasuda, K., Bell, G.I., Reisine, T. (1994) Molecular mechanisms of agonist-induced desensitization of the cloned mouse kappa opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 270(3),1381-6.

- Reisine T, Bell GI. (1993) Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci.* 16(12),506-10. Review.
- Ross, E.M. and Wilkie, T.M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu.Rev.Biochem.*69, 795-827.
- Sallèse M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L, De Blasi A (2000) Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated Gαq. *Mol Pharmacol.* 57, 826–831.
- Sakurada, T., Komatsu T., Sakurada, S. (2005). Mechanisms of nociception evoked by intrathecal high-dose morphine. *Neurotoxicology.* 26,801–9.
- Schmidt N, Brune K, Geisslinger G. (1992) Stereoselective determination of the enantiomers of methadone in plasma using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 2,583(2),195-200.
- Schulz S, Höllt V. (1998) Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats in vivo. *Eur J Neurosci.* 10(3),1196-201.
- Schwienbacher I, Fendt M, Richardson R, Schnitzler HU (2004). "Temporary inactivation of the nucleus accumbens disrupts acquisition and expression of fear-potentiated startle in rats". *Brain Res.* 1027 (1-2), 87–93.
- Seger R, Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*9(9),726-35.
- Shah, B.H. and Catt, K.J. (2004) GPCR-mediated transactivation of RTKs in the CNS: mechanisms and consequences. *Trends Neurosci.* 27, 48-53.
- Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J. (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J.* 1,375(Pt 3),503-15.
- Siderovski DP, Willard FS. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci.* 1,51–66.

- Sim-Selley LJ, Selley DE, Vogt LJ, Childers SR, Martin TJ. (2000) Chronic heroin self-administration desensitizes mu opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *J Neurosci.* 5,20(12),4555-62.
- Simon MI, Strathmann MP., Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 252, 802–808.
- Snow BE, Krumins AM, Brothers GM, Lee SF, Wall MA, Chung S, Mangion J, Arya S, Gilman AG, Siderovski DP. (1998) A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13307–13312
- Sondek, J., Siderovski, D.P. (2001) Ggamma-like (GGL) domains: Newfrontiers in G-protein signaling and beta-propeller scaffolding. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1329–1337
- Sterne-Marr, R. and Benovic, J.L. (1995) Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam Horm.* 51,193-234.
- Sternini, C Spann, M Anton, B Keith, DE Bunnett, NW von Zastrow, M Evans, C Brecha, NC (1996) Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93 (17), 9241-6.
- Szekeres, P.G, Koenig, J.A, Edwardson, J.M.(1998)The relationship between agonist intrinsic activity and the rate of endocytosis of muscarinic receptors in a human neuroblastoma cell line. *Mol Pharmacol.* 53(4),759-65.
- Takemori AE, Portoghese PS. (1992) Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32,239–69.
- Terman, GW, Jin, W, Cheong, YP, Lowe, J, Caron, MG, Lefkowitz, RJ, Chavkin C. (2004). G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal. *Br J Pharmacol.* 141,55–64.
- Tekumalla, P.K., Calon, F., Rahman, Z., Birdi, S., Rajput, A.H., Hornykiewicz, O., DiPaolo, T., Bedard, P.J., E.J. Nestler, E.J. (2001) Elevated levels of DeltaFosB and RGS9 in striatum in Parkinson's disease, *Biol. Psychiatry.* 50, 813–816.

- Tsang SH, Burns ME, Calvert PD, Gouras P, Baylor DA, Goff SP, Arshavsky VY. (1998) Role for the target enzyme in deactivation of photoreceptor G protein *in vivo*. *Science*. 282,117–21.
- Varga EV, Navratilova E, Stropova D, Jambrosic J, Roeske WR, Yamamura HI (2004). "Agonist-specific regulation of the delta-opioid receptor". *Life Sci*. 76 (6),599–612.
- Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J.(2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain.*Eur J Neurosci*. 19(7),1826-36.
- Varrault, A., Pena, M.S, Goldsmith, P.K, Mithal, A., Brown, E.M, Spiegel, A.M. (1995) Expression of G protein alpha-subunits in bovine parathyroid. *Endocrinology*. 136(10),4390-6.
- 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*. 304,1940–1944,
- 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*. 7,405–411
- Watson, A.J., Aragay, A.M., Slepak, V.Z., Simon, M.I. (1996).A novel form of the G protein beta subunit Gbeta5 is specifically expressed in the vertebrate retina. *J. Biol. Chem*. 271, 28154–28160.
- Watson, A.J., Katz, A., and Simon, M.I. (1994). A fifth member of the mammalian G-protein beta-subunit family. Expression in brain and activation of the beta 2 isotype of phospholipase C. *J. Biol. Chem*. 269, 22150–22156
- Weiss, E.R., D. Raman, S. Shirakawa, M.H. Ducceschi, P.T. Bertram, F. Wong, T.W. Kraft, and S. Osawa. (1998) The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol. Vis*. 4,27.

- Wise RA. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 5(6),483-94.
- Wilkie TM (2000) G-protein signaling: satisfying the basic necessities of life. *Curr Biol.* 30,10(23),R853-6.
- Willars, G.B. (2006) Mammalian RGS proteins: Multifunctional regulators of cellular signalling. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 17,363–376 Review
- Xie W, Samorski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D. (1999) Genetic alteration of phospholipase beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids. *Proc Natl Acad Sci USA.*96,10385–10390.
- Yan.L., Carr, J., Ashby, P.R., Murry-Tait, V., Thompson, C., C Arthur, J.C. (2003) Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development *BMC Developmental Biology.*16,3,11.
- Yan, Y., Chi, P.P., and Bourne, H.R. (1997) RGS4 inhibits Gq-mediated activation of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide synthesis, *J Biol Chem.* 272, 11924–11927
- 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.* 11,100(23),13656-61.
- Zachariou, V., Bolanos, C.A., Selley, D.E., Theobald, D., Cassidy, M., Kelz, M., Shaw-Lutchman, T., Berton, O., Sim-Selley, L.J., Dileone, R.J., et al. (2006). An essential role for DFosB in the nucleus accumbens in morphine action. *Nat. Neurosci.* 9, 205–211.
- Zhang, J.H., Barr, V.A., Mo, Y., Rojkova, A.M., Liu, S. and Simonds, W.F. (2001). Nuclear localization of G protein beta 5 and regulator of G protein

signaling 7 in neurons and brain. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 10284–10289.

- Zadina, JE. (2002) Isolation and distribution of endomorphins in the central nervous system. *Jpn J Pharmacol*. 89,203–8.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ