



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**In Vitro Μελέτη της Επίδρασης του TNF $\alpha$  στον κυτταροσκελετό  
σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (ποδοκυττάρων)**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Ελευθερία Α. Βαρδάκη**

***ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002***

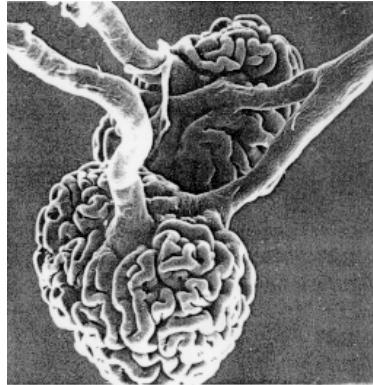


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**In Vitro Μελέτη της Επίδρασης του TNF $\alpha$  στον κυτταροσκελετό  
σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (ποδοκυττάρων)**



**Διδακτορική Διατριβή**

**Ελευθερία Α. Βαρδάκη**

***ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002***

### **Επιβλέπων Καθηγητής**

Νικόλαος Τσαπάρας (Αναπλ. Καθηγητής Νεφρολογίας)

### **Συμβουλευτική Επιτροπή**

Νικόλαος Τσαπάρας (Αναπλ. Καθηγητής Νεφρολογίας)

Χρήστος Στουρνάρας (Καθηγητής Βιοχημείας)

Αχιλλέας Γραβάνης (Καθηγητής Φαρμακολογίας)

### **Εξεταστική Επιτροπή**

Νικόλαος Τσαπάρας (Αναπλ. Καθηγητής Νεφρολογίας)

Χρήστος Στουρνάρας (Καθηγητής Βιοχημείας)

Αχιλλέας Γραβάνης (Καθηγητής Φαρμακολογίας)

Ηλίας Καστανάς (Καθηγητής Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας)

Γεώργιος Ηλιόπουλος (Καθηγητής Αιματολογίας)

Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος (Επικ. Καθηγητής Βιοχημείας)

Δημήτριος Μπούμπας (Καθηγητής Παθολογίας - Ρευματολογίας)

**Αφιερώνεται ιδιαίτερα στη μνήμη του ανθρώπου που είχε όλα τα προσόντα που ψάχνουμε σήμερα σε κάποιον για να τον έχουμε πρότυπο τον Δημήτρη Εμμανουήλ**

**Στα παιδιά μου Ελένη και Παρασκευή  
Στο σύζυγό μου Μανώλη  
και στους γονείς μου**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η σύλληψη της ιδέας γι' αυτήν τη διατριβή, ο προγραμματισμός και η καθοδήγηση μέχρι λίγο πριν την ολοκλήρωσή της ήταν του ανθρώπου, που δυστυχώς δεν βρίσκεται πια ανάμεσά μας για να νιώσει ανακούφιση και ικανοποίηση από την πραγματοποίηση της επιθυμίας του να «στηθούν και να καλλιεργηθούν τα ποδοκύτταρα».

Η εκπόνηση αυτής της διατριβής άλλαξε σε μένα τον τρόπο σκέψης και διερεύνησης ερευνητικών αλλά και ιατρικών ερωτημάτων, αφού το τι, γιατί και πως συνέβη το κάθε τι, είναι καθημερινός μου προβληματισμός πάνω στα προβλήματα των ασθενών μου. Επιπλέον, η διατριβή αυτή απετέλεσε την αφορμή απόκτησης νέων γνώσεων, εμπειριών και συνεργασιών με νέα πρόσωπα και συνεχή ανταλλαγή απόψεων και προβληματισμών.

Φθάνοντας στο τέλος της συγγραφής της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της. Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αναπλ. Καθηγητή Νίκο Τσαπάρια για το δύσκολο έργο που ανέλαβε να συνεχίσει την καθοδήγησή μου, για την ηθική υποστήριξη, και εμπιστοσύνη που μου έδειξε μετά από την απώλεια του Καθηγητή Δημήτρη Εμμανουήλ, καθώς και για όλες τις ευκαιρίες που μου προσέφερε.

Τον Καθηγητή Χρήστο Στουρνάρα τον ευχαριστώ για την ανεκτίμητη βοήθειά του, τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας, την παρότρυνση και την κριτική στην προσπάθειά μου. Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή Ηλία Λιανό για την προμήθεια της κυτταρικής σειράς των ποδοκυττάρων και για την καθοδήγηση και τις παρατηρήσεις του.

Τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Αχιλλέα Γραβάνη, τον Καθηγητή Ηλία Καστανά, τον Καθηγητή Γεώργιο Ηλιόπουλο, τον Επίκ. Καθηγητή Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο και τον Καθηγητή Δημήτριο Μπούμπα, ευχαριστώ για τις εύστοχες παρατηρήσεις και για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της συγγραφής της διατριβής αυτής. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Σεβαστή Κουκουριτάκη και την Λίτσα Παπακωνσταντή των οποίων η συνεισφορά ήταν σημαντική στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, επίσης την Άννα Τσαπάρια και τον Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο για την

ανεκτίμητη βοήθεια τους σε τμήματα της εργασίας, που ήταν συνέχεια δικής τους δουλειάς σε άλλες κυτταρικές σειρές.

Την Κατερίνα Χατζάκη, τον Άρη Μουστάκα, τον Δημήτρη Καρδάση, τον Μανώλη Ζουμάκη, την Λίνα Βαρδούλη, την Ρένα Δερμιτζάκη, την Γαλάτεια Καλλέργη και την Χαρούλα Πολιουδάκη ευχαριστώ, για την βοήθεια τους και την εκμάθηση μοριακών τεχνικών. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους της Νεφρολογικής Κλινικής Ευγένιο Δαφνή, Κώστα Περάκη, Σπύρο Στρατήγη, Κώστα Στυλιανού, Κώστα Κόρσαββα, Γαρυφαλιά Περισυνάκη και ιδιαίτερα τις γραμματείς της Κλινικής, Αθανασάκη Κατερίνα και Περογαμβράκη Αμαλία, Χριστοφοράκη Μαρία, που με ανέχθηκαν όλες τις δύσκολες στιγμές και έδειξαν υπομονή στις μεμψιμοιρίες και τα παράπονά μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερος τα παιδιά μου, τον σύζυγό μου και τους γονείς μου, για την κατανόηση, την υπομονή και την υποστήριξή τους καθ'όλη τη διάρκεια αυτών των έξι χρόνων. Χωρίς την στήριξή τους είμαι απόλυτα σίγουρη ότι η μελέτη αυτή δεν θα είχε ποτέ ολοκληρωθεί.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1. Τα πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ως δομικό στοιχείο του νεφρώνα

1.1.1. Η λειτουργική μονάδα του νεφρού

1.1.2. Τα επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα

1.1.3. Κυτταροσκελετός των επιθηλιακών κυττάρων

#### 1.2. Κυτταροσκελετός της ακτίνης

1.2.1. Πρωτεΐνες συνδεόμενες με την ακτίνη

#### 1.3. Εστιακές προσφύσεις (Focal Adhesion) και κυτταροσκελετός της ακτίνης

#### 1.4. Παράγον νέκρωσης όγκων (TNF $\alpha$ ) και πειραματική βλάβη

1.4.1. Tumor necrosis factor

1.4.2. Ο TNF $\alpha$  στην παθογένεια της πειραματικής βλάβης

#### 1.5. Ερευνητικά ερωτήματα

### 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. Βιολογικό υλικό

#### 2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Καλλιέργεια των πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων

2.2.2. Προσδιορισμός επιπέδων μονομερούς (G-) και ολικής ακτίνης

2.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών

2.2.4. Άμεσος ανοσοφθορισμός

2.2.5. Ανοσοφθορισμός για την παρατήρηση των μικροϊνιδίων της ακτίνης με μικροσκοπία συνεστίασης

2.2.6. Διπλός ανοσοφθορισμός για την παρατήρηση των μικροϊνιδίων της ακτίνης και της βινκουλίνης

2.2.7. Διπλός ανοσοφθορισμός με αντισώματα κατά της βινκουλίνης και ταλίνης

2.2.8. Φθοριομετρικός προσδιορισμός της πολυμερούς F- ακτίνης

2.2.9. Western blot ανάλυση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών

2.2.9.1. Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων

- 2.2.9.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS αποδιάταξης
- 2.2.9.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης
- 2.2.9.4. Υβριδοποίηση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση τους με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL
- 2.2.10. Ανάλυση πρωτεϊνών φωσφορυλιωμένων σε κατάλοιπα τυροσίνης, με τη μέθοδο αυτοκατακρήμισης
  - 2.2.10.1. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων
  - 2.2.10.2. Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών
  - 2.2.10.3. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων
- 2.2.11. Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης.
- 2.2.12. Μέτρηση του κυτταρικού όγκου
- 2.2.13. Μελέτη της κυτταρικής απόπτωσης

### **2.3. Στατιστική ανάλυση**

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- 3.1. Ο TNF $\alpha$  προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης**
- 3.2. Ο TNF $\alpha$  επάγει τον πολυμερισμό της G- προς F- ακτίνη**
- 3.3. Ο TNF $\alpha$  επάγει την τυροσινοφωσφορυλίωση της FAK και της παξιλλίνης χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασής τους**
- 3.4. Ο TNF $\alpha$  δεν μεταβάλλει την έκφραση των Rho B πρωτεϊνών**
- 3.5. Η αναστολή της τυροσινοφωσφορυλίωσης αναστέλλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TNF $\alpha$**
- 3.6. Η επαγωγή της τυροσινοφωσφορυλίωσης της FAK και της παξιλλίνης από τον TNF $\alpha$  προϋποθέτει την ακεραιότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης**
- 3.7. Ο TNF $\alpha$  προκαλεί αύξηση του κυτταρικού όγκου**
- 3.8. Ο TNF $\alpha$  δεν προκαλεί κυτταρική υπερπλασία ή απόπτωση των ποδοκυττάρων**



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ
7. SUMMARY
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:** Ελευθερία Βαρδάκη  
**ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ:** Ανδρέας  
**ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** Παρανύμφοι Ηρακλείου Κρήτης  
**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** 12/05/1958  
**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** Έγγαμη με 2 παιδιά  
**ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:** Αγγλικά  
**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:** Τερψιχόρης 23, Ηράκλειο Κρήτης  
**ΤΗΛΕΦΩΝΟ:** οικίας: 212813 εργασίας: 392418

### ΥΠΟΧΡΕΩΣΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑΣ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

1987 – 1988 Ροδοβάνι Σελίνου Χανίων

### ΣΠΟΥΔΕΣ

1978- 1981 Τ.Ε.Ι. Νοσηλευτικής Αθηνών  
Ιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

**ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ:** Νεφρολογίας

### ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

Από 17/10/1995 μέχρι 10/07/1996 Επιστημονικός Συνεργάτης  
Ιατρική Σχολή  
Πανεπιστημίου Κρήτης.  
Από 10/07/1996 μέχρι 16/12/1996 Επιμελήτρια Β' ΕΣΥ Νεφρολογίας  
Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου.

### ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ

Από 16/12/1996 μέχρι και σήμερα Επιμελήτρια Β' ΕΣΥ Νεφρολογίας ΠεΠαΓΝΗ

### ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΩΝ

- Ελληνική Νεφρολογική Εταιρεία
- Ιατρικός Σύλλογος Ηρακλείου

### ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Συμμετοχή α) στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Νεφρολογικής Κλινικής και  
β) στα Μαθήματα Ειδικότητας των Νοσηλευτών του ΠΕΠΑΓΝΗ  
1995 – 1996 Τμήμα Νοσηλευτικής των Δημοσίων Ι.Ε.Κ. Ηρακλείου.

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΗ ΔΙΕΘΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Koukouritaki SB, Vardaki EA, Papakonstanti EA, Lianos E, Stournaras C, Emmanouel DS. TNF-alpha induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase. Mol Med 5:382-92, 1999

2. Papakonstanti EA, Vardaki EA, Stournaras C. Actin Cytoskeleton: A Signaling Sensor in Cell Volume Regulation. *Cell Physiol Biochem* 2000, 10: 257-264

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Δαφνής Ε, Παπαστάθη Ε, Περάκης Κ, **Βαρδάκη Ε**, Ζωγραφάκης Ε, Εμμανουήλ Δ: Εμπειρία εφαρμογής θεραπευτικής πλασμαφαίρεσης με συμβατικά μηχανήματα τεχνητού νεφρού. *Ελληνική Νεφρολογία* 1998, 10: 295-297
2. **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Ζωγραφάκης Ε, Παπαστάθη Ε, Περάκης Κ, Δαφνής Ε, Σότσιου Φ, Εμμανουήλ Δ: Ιστοπαθολογία νεφρικών βλαβών στην Κρήτη. *Ελληνική Νεφρολογία* 1998, 10: 347-349
3. **Βαρδάκη Ε**, Κουκουριτάκη Σ, Λιανός Η, Στουρνάρας Χ, Εμμανουήλ Δ. Επιδράσεις Παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα) στον κυτταροσκελετο σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (GEC). *Ελληνική Νεφρολογία* 1998
4. Περάκης Κ, **Βαρδάκη Ε**, Κοπανάκης Κ, Μεραμβελιωτάκης Ν, Τσαπάρας Ν, Εμμανουήλ Δ. Η επίπτωση ηπατίτιδας C σε μονάδα αιμοκάθαρσης μετά από εφαρμογή. απομόνωσης των θετικών φορέων. *Ελληνική Νεφρολογία* 1998
5. Δαφνής Ε, Παπαστάθη Ε, Περάκης Κ, **Βαρδάκη Ε**, Ζωγραφάκης Ε, Εμμανουήλ Δ. Εμπειρία εφαρμογής θεραπευτικής πλασμαφαίρεσης με συμβατικά μηχανήματα Τεχνητού Νεφρού MTN. *Ελληνική Νεφρολογία* 1998

#### ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Χανιά 1-3 Ιουνίου 1988
2. Διαπανεπιστημιακό Μετεκπαιδευτικό Συμπόσιο «Επίκαιρα Ιατρικά Θέματα» Γαστρεντερολογική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης 8-10 Νοεμβρίου 1991
3. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Αλεξανδρούπολη 19-22 Μαΐου 1992
4. Σεμινάριο «Νεώτερες απόψεις σε παιδοουρολογικά θέματα» Ουρολογική Κλινική ΠεΠαΓΝΗ Ηράκλειο 30 Μαΐου 1992
5. 6ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 12-15 Νοεμβρίου 1992
6. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Κέρκυρα 11-13 Μαΐου 1994
7. 7ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-20 Νοέμβριο 1994
8. 7<sup>th</sup> Congress of the International Society of Peritoneal Dialysis, Stockholm, Sweden, June 18-21, 1995
9. Συνέδριο με θέμα: Το Νοσοκομείο του 21ου αιώνα, ΠεΠαΓΝΗ και Ευρωπαϊκή Ένωση – Νέων Managers Υγείας, Ηράκλειο 2-5 Νοεμβρίου 1995
10. 23<sup>rd</sup> Congress of the ERA-EDTA European Renal Association. June 18-21, Amsterdam, 1996
11. 1<sup>st</sup> Congress of the International Association for the History of Nephrology (IAHN) Kos 14-16 October 1996
12. 8ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Αγ. Νικόλαος 24-27 Οκτωβρίου 1996
13. 24<sup>th</sup> Congress of the ERA-EDTA European Renal Association. Geneva, Switzerland 21-24 September 1997
14. 2<sup>nd</sup> International Seminar in Nephrology, Θεσσαλονίκη 4-5 Οκτωβρίου 1997
15. Σεμινάριο Κλινικής Γαστρεντερολογίας, Γαστρεντερολογική Κλινική ΠεΠαΓΝΗ, Ηράκλειο 14 Μαρτίου 1998.
16. Harvard Medical School, Department of Continuing Education «Nephrology

- 1998» Boston, Massachusetts 3-8 May 1998.
17. Πολυθεματικό Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, Χανιά 14 Μαΐου 1998
  18. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας Καβάλα 24-27 Μαΐου 1998
  19. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ηράκλειο-Κρήτη 5-8 Νοεμβρίου 1998
  20. 25<sup>th</sup> Congress of the ERA-EDTA European Renal Association. June 6-9, Rimini Italy, 1998.
  21. 2ο Σεμινάριο Κλινικής Ιατρικής «Πεπτικό ή εκτός;» Αλληλεπίδραση Πεπτικού με άλλα Συστήματα στην Κλινική Πράξη. Γαστρεντερολογική Κλινική ΠεΠαΓΝΗ, Ηράκλειο 3-4 Απριλίου 1999.
  22. 26<sup>th</sup> Congress of the ERA-EDTA European Renal Association Training Course in Nephrology. September 4-5, Madrid Spain, 1999
  23. 26<sup>th</sup> Congress of the ERA-EDTA European Renal Association. September 5-8, Madrid Spain, 1999.
  24. 3<sup>rd</sup> International Seminar in Nephrology, Θεσσαλονίκη 25-26 Σεπτεμβρίου 1999
  25. 3ο Σεμινάριο Κλινικής Ιατρικής «Διλήμματα στην Κλινική Ιατρική». Γαστρεντερολογική Κλινική ΠεΠαΓΝΗ, Ηράκλειο 15 Απριλίου 2000.
  26. Harvard Medical School, Department of Continuing Education «Nephrology 2000» Boston, Massachusetts 7-12 May 2000.
  27. 11ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
  28. 10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. **Vardaki E**, Koukouritaki S, Lianos E, Stournaras C, Emmanouel DS. Effects of TNF $\alpha$  on the cytoskeleton and focal adhesions of glomerular epithelial cells (GEC). 25<sup>th</sup> Congress of the ERA-EDTA European Renal Association. June 6-9, Rimini Italy, 1998.

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Κ. Περάκης **Ε. Βαρδάκη**, Σ. Στρατήγης, Δ. Εμμανουήλ: Οξεία Νεφρική Ανεπάρκεια μετά από βρώση μανιταριών. 6ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 12 - 15 Νοεμβρίου 1992
2. Κ. Περάκης, **Ε. Βαρδάκη**, Σ. Στρατήγης, Δ. Εμμανουήλ: Ραβδομύλυση (PM) λόγω συνδυασμού δηλητηριάσεως από μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και αυτοκαταπλάκωση (AK) του σκέλους. Μια ασυνήθης περίπτωση οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ONA). 6ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 12 - 15 Νοεμβρίου 1992
3. **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Περάκης Κ, Χαρουλάκης Ν, Τζαρδή Μ, Σότσιου Φ, Δαφνής Ε, Παπαστάθη Ε, Εμμανουήλ Δ: Εμπειρία δηλητηριάσεων με Paraquat στο ΠεΠαΓΝΗ. 7ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-20 Νοέμβριο 1994
4. **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Περάκης Κ, Χαρουλάκης Ν, Τζαρδή Μ, Σότσιου Φ, Δαφνής Ε, Παπαστάθη Ε, Εμμανουήλ Δ: Ιστοπαθολογία Νεφρικών Βλαβών στην Κρήτη. 7ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ρέθυμνο 18-20 Νοεμβρίου 1994
5. **Βαρδάκη Ε**, Περάκης Κ, Στρατήγης Σ, Σότσιου Φ και Εμμανουήλ Δ: Ιστοπαθολογία νεφρικών βλαβών στην Κρήτη. 8ο Παγκρήτιο Ιατρικό

- Συνέδριο Αγ. Νικόλαος 24-27 Οκτωβρίου 1996
6. Στρατήγης Σ, **Βαρδάκη Ε**, Περάκης Κ, Κατσανεβάκη Ζ, Νινιράκη Μ, Μεταξάρης Γ, Εμμανουήλ Δ: Η επίπτωση Ηπατίτιδας C σε Μονάδα αιμοκάθαρσης μετά από εφαρμογή απομόνωσης των θετικών φορέων. 8ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Αγ. Νικόλαος 24-27 Οκτωβρίου 1996
  7. Ζωγραφάκης Ε, Δαφνής Ε, Στρατήγης Σ, **Βαρδάκη Ε**, και Εμμανουήλ Δ: Αξιολόγηση της Επάρκειας Κάθαρσης και Θρέψης σε μία μονάδα αιμοκάθαρσης στη Κρήτη. 8ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Αγ. Νικόλαος 24-27 Οκτωβρίου 1996
  8. Κόκορη Ε, **Βαρδάκη Ε**, Φωτουλάκη Μαρία, Τζαγκουρνισάκης Μ, Σμπυράκις Σ: Σύνδρομο Charcot – Marie Tooth με νεφρική προσβολή. 34ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος 31 Μαΐου – 2 Ιουνίου 1996
  9. **Βαρδάκη Ε**, Κουκουριτάκη Σ, Λιανός Η, Στουρνάρας Χ, Εμμανουήλ Δ: Επιδράσεις Παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα) στον κυτταροσκελετο σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (GEC) 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας Καβάλα 24-27 Μαΐου 1998
  10. Περάκης Κ, **Βαρδάκη Ε**, Κοπανάκης Κ, Μεραμβελιωτάκης Ν, Τσαπάρας Ν, Εμμανουήλ Δ: Η επίπτωση ηπατίτιδας C σε μονάδα αιμοκάθαρσης μετά από εφαρμογή απομόνωσης των θετικών φορέων. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας Καβάλα 24-27 Μαΐου 1998
  11. **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Ζωγραφάκης Ε, Παπαστάθη Ε, Περάκης Κ, Δαφνής Ε, Σότσιου Φ, Εμμανουήλ Δ: Ιστοπαθολογία νεφρικών βλαβών στην Κρήτη. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας Καβάλα 24-27 Μαΐου 1998
  12. Δαφνής Ε, Παπαστάθη Ε, Περάκης Κ, **Βαρδάκη Ε**, Ζωγραφάκης Ε, Εμμανουήλ Δ: Εμπειρία εφαρμογής θεραπευτικής πλασμαφαίρεσης με συμβατικά μηχανήματα Τεχνητού Νεφρού MTN. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καβάλα 24-27 Μαΐου 1998
  13. **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Παπαστάθη Ε, Περάκης Κ, Δαφνής Ε, Εμμανουήλ Δ: Εμπειρία εφαρμογής θεραπευτικής πλασμασφαίρεσης με συμβατικά μηχανήματα τεχνητού νεφρού. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Ηράκλειο-Κρήτη 5-8 Νοεμβρίου 1998
  14. Παυλίδης Γ, Καλικάκης Γ, Stefani Hoing, Κατσανούλας Κ, **Βαρδάκη Ε**, Ταμπακάκη Μ, Παπαβασιλείου Ε: Αποτελεσματικότητας πλασμαφαίρεσης σε θυρεοτοξική κρίση ασθενούς με νόσο του Graves. 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Λευκωσία Κύπρος 23-26 Μαρτίου 2000
  15. Δαφνής Ε, **Βαρδάκη Ε**, Παπαστάθη Ε, Σταματάκη Ε, Περάκης Κ, Στρατήγης Σ, Ιωαννίδου Δ, Τόσκα Ν, Σότσιου Φ, Εμμανουήλ Δ†. Σύνδρομο δέρματος-νεφρού στην Κρήτη. 11ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
  16. Δαφνής Ε, Περάκης Κ, Στρατήγης Σ, Παπαστάθη Ε†, **Βαρδάκη Ε**, Σότσιου Φ, Εμμανουήλ Δ†: Αγγειίτιδες μικρών Αγγείων (SVV) με νεφρική συμμετοχή περιγραφή κλινικών συνδρόμων και έκβαση στην Κρήτη. 11ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
  17. Στυλιανού Κ, Στρατήγης Σ, Παπαστάθη Ε†, Δαφνής Ε, **Βαρδάκη Ε**, Περάκης Κ, Καστανάς Η, Εμμανουήλ Δ†: Η αιμοκάθαρση με διάλυμα ελεύθερο γλυκόζης αναφορικά με την αποβολή Καλίου. 11ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό

- Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
18. Περάκης Κ, Παπαστάθη Ε†, **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Δαφνής Ε, Εμμανουήλ Δ†: Συμβολή διαλύματος μακρομοριακής πολυγλυκόζης (Icodextrin 7.5%) στην αντιμετώπιση μυκητιασικής περιτονίτιδος με διατήρηση του περιτοναϊκού καθετήρα. 11ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
  19. **Βαρδάκη Ε**, Παυλίδης Γ, Περάκης Κ, Καλικάκης Γ, Hoing Srefani, Κατσανούλας Κ, Παπαβασιλείου Ε, Εμμανουήλ Δ†. Αποτελεσματικότητα πλασμαφαίρεσης σε θυρεοτοξική κρίση ασθενούς με νόσο του Graves. 11ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
  20. Σότσιου Φ, Καραβάνα Β, Αργυράκος Θ, Παπαστάθη Ε, **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Περάκης Κ, Δαφνής Ε, Εμμανουήλ Δ†. Πρωτεΐνες Stress στη νεφρική Αγγειίτιδα. 11ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα 24-27 Μαΐου 2000
  21. **Βαρδάκη Ε**, Παυλίδης Γ, Περάκης Κ, Καλικάκης Γ, Hoing Srefani, Κατσανούλας Κ, Παπαβασιλείου Ε, Εμμανουήλ Δ†, Τσαπάρας Ν: Αποτελεσματικότητας πλασμαφαίρεσης σε θυρεοτοξική κρίση ασθενούς με νόσο του Graves. 10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000
  22. Δαφνής Ε, **Βαρδάκη Ε**, Παπαστάθη Ε†, Περάκης Κ, Στρατήγης Σ, Ιωαννίδου Δ, Τόσκα Ν, Σότσιου Φ, Εμμανουήλ Δ†, Τσαπάρας Ν.. Σύνδρομο δέρματος-νεφρού στην Κρήτη. 10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000
  23. Στυλιανού Κ, Στρατήγης Σ, Παπαστάθη Ε†, Δαφνής Ε, **Βαρδάκη Ε**, Περάκης Κ, Καστανάς Κ, Εμμανουήλ Δ†, Τσαπάρας Ν: Η αιμοκάθαρση με διάλυμα ελεύθερο γλυκόζης δεν υπερτερεί εκείνης με διάλυμα γλυκόζης αναφορικά με την αποβολή καλίου. 10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000
  24. Δαφνής Ε, Περάκης Κ, Στρατήγης Σ, Παπαστάθη Ε†, **Βαρδάκη Ε**, Σότσιου Φ, Εμμανουήλ Δ†, Τσαπάρας Ν: Αγγειίτιδες μικρών αγγείων (SVV) με νεφρική συμμετοχή. Περιγραφή κλινικών συνδρόμων και έκβαση στην Κρήτη. 10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000
  25. Περάκης Κ, Παπαστάθη Ε†, **Βαρδάκη Ε**, Στρατήγης Σ, Δαφνής Ε, Εμμανουήλ Δ†, Τσαπάρας Ν: Συμβολή διαλύματος μακρομοριακής πολυγλυκόζης (Icodextrin 7,5%) στην αντιμετώπιση μυκητιασικής περιτονίτιδος με διατήρηση του περιτοναϊκού καθετήρα. 10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000
  26. **Ε.Βαρδάκη**, Κ.Στυλιανού, Ε.Δαφνής, Ν.Τσαπάρας, Δ.Εμμανουήλ†, Χ. Στουρνάρας. Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα) στη μεταβολή κυτταρικού όγκου στον κυτταροπολλαπλασιασμό και την απόπτωση των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (GEC). 12ο Πανελλήνιο Νεφρολογικό Συνέδριο, Ιωάννινα 29 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2002

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Τα πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ως δομικό στοιχείο του νεφρώνα

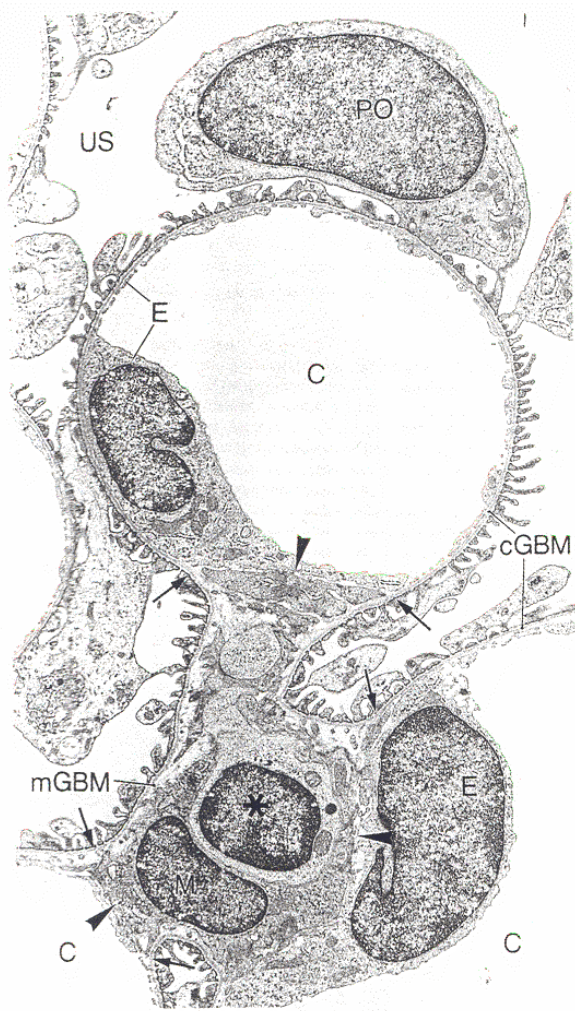
### 1.1.1. Η λειτουργική μονάδα του νεφρού

Η λειτουργική μονάδα του νεφρικού παρεγχύματος είναι ο νεφρώνας. Ο νεφρώνας αποτελείται από δύο κύρια μέρη: i) το αγγειώδες σπείραμα, στο οποίο γίνεται η διήθηση και ii) το νεφρικό σωληνάριο στο οποίο γίνεται η επαναρρόφηση και έκκριση.

Το αγγειώδες σπείραμα, το οποίο έχει μια λοβιώδη μορφή, περιβάλλεται από το τυφλό, ανευρυσμένο, κοίλο άκρο του σωληναριακού συστήματος, την κάψα του Bowman. Πρόκειται για ένα τριχοειδικό πλέγμα, το οποίο εκτείνεται μεταξύ ενός προσαγωγού και ενός απαγωγού αρτηριδίου. Το προσαγωγό αρτηρίδιο εισέρχεται στο αγγειώδες σπείραμα δια του αγγειακού πόλου και διχάζεται σε πέντε περίπου κύριους κλάδους, έκαστος των οποίων διαιρείται στο δικό του τριχοειδικό δίκτυο. Τα τριχοειδή του σπειράματος, τα οποία στηρίζονται στο μεσάγγειο, συγκλίνουν και σχηματίζουν το απαγωγό αρτηρίδιο, το οποίο εξέρχεται και αυτό από τον αγγειακό πόλο, παράλληλα με το προσαγωγό αρτηρίδιο.

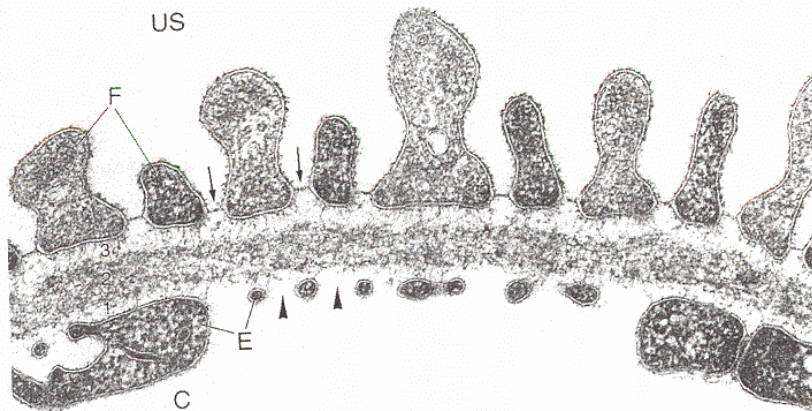
Από το αίμα, που ρέει στο αγγειώδες σπείραμα, παράγεται με υπερδιήθηση το αρχικό ούρο, το οποίο περνά στην ουροφόρο κοιλότητα της κάψας του Bowman και στη συνέχεια στο νεφρικό σωληνάριο. Η διήθηση γίνεται μέσω του τοιχώματος των πειραματικών τριχοειδών, το οποίο απαρτίζεται από (εικόνα 1):

- Το ενδοθήλιο των τριχοειδών
- Τη βασική μεμβράνη
- Τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων (ποδοκυττάρων)



**Εικόνα 1:** Δομή σπειραματικού τριχοειδούς (C). Ενδοθηλιακό κύτταρο (E), επιθηλιακό κύτταρο (PO), μεσαγγειακό κύτταρο (M), περιτροχοειδική βασική σπειραματική μεμβράνη (cGBM), και περιμεσαγγειακή βασική μεμβράνη (mGBM). Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου x 6100

**Εικόνα 1:** Δομή σπειραματικού τριχοειδούς (C). Ενδοθηλιακό κύτταρο (E), επιθηλιακό κύτταρο (PO), μεσαγγειακό κύτταρο (M), περιτροχοειδική βασική σπειραματική μεμβράνη (cGBM), και περιμεσαγγειακή βασική μεμβράνη (mGBM). Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου x 6100



**Εικόνα 2.** Φραγμός διήθησης του σπειραματικού τριχοειδούς. Θυριδωτή ενδοθηλιακή στιβάδα (E), πόδια των επιθηλιακών κυττάρων (F). Διακρίνονται οι τρεις στιβάδες της βασικής σπειραματικής μεμβράνης. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου x 60000



Τα ανατομικά αυτά στοιχεία του σπειράματος συνιστούν το φραγμό μεταξύ αίματος και ουροφόρου κοιλότητας και έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ειδικά προσαρμοσμένα στο διηθητικό τους ρόλο.

#### *Τα ενδοθηλιακά κύτταρα*

Το κυτταρόπλασμα των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων σχηματίζει μια λεπτή στιβάδα, η οποία είναι διάτρητη από πολυάριθμους πόρους ή θυρίδες, από όπου και η ονομασία της, ως θυριδωτής στιβάδας. Η διάμετρος των θυρίδων είναι 70 nm περίπου

#### *Η βασική μεμβράνη*

Η βασική μεμβράνη των σπειραματικών τριχοειδών είναι παχύτερη, σε σύγκριση με τη βασική μεμβράνη άλλων τριχοειδών, με ένα πάχος 310-350 nm. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκαλύπτει ότι αποτελείται από τρεις στιβάδες:

- Μία κεντρική πυκνή στιβάδα (lamina rara densa),
- Μία εσωτερική αραιή στιβάδα (lamina rara interna) σε επαφή με το ενδοθήλιο, προς την πλευρά του τριχοειδικού αυλού.
- Μία εξωτερική αραιή στιβάδα (lamina rara externa) προς την ουροφόρο κοιλότητα, η οποία είναι σε άμεση επαφή με το σπειραματικό επιθήλιο (ποδοκύτταρα), το οποίο εισδύει εντός αυτής με τις ποδοειδείς προσεκβολές του.

#### **1.1.2. Τα επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα**

Τα ώριμα επιθηλιακά σπειραματικά κύτταρα ή ποδοκύτταρα, τα οποία αποτελούν το υποκείμενο της παρούσας μελέτης, είναι κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης με πολύπλοκη αρχιτεκτονική δομή. Ονομάζονται ποδοκύτταρα, επειδή το κύριο σώμα του κυττάρου, που ευρίσκεται προς την εξωτερική επιφάνεια των σπειραματικών τριχοειδών (προς την ουροφόρο κοιλότητα) χορηγεί πρωτογενείς κυτταροπλασματικές προσεκβολές, οι οποίες διακλαδίζονται περαιτέρω σε δευτερογενείς προσεκβολές (τα πόδια). Τα πόδια έρχονται σε επαφή με τη βασική μεμβράνη του τριχοειδούς και εισχωρούν εντός αυτής (εικόνα 2).

Οι αποστάσεις μεταξύ των γειτονικών ποδοειδών προσεκβολών, κοντά στη βασική μεμβράνη, σε φυσιολογικό σπείραμα, ποικίλουν από 25-60 μm. Το τμήμα αυτό ονομάζεται σχισμή διήθησης της μεμβράνης ή διηθητική σχισμή.

Οι ποδικές προσεκβολές γειτονικών κυττάρων διαπλέκονται μεταξύ τους σαν «φερμουάρ», αφήνοντας μεταξύ τους τις ελικοειδείς σχισμές διήθησης, οι οποίες γεφυρώνονται με πολύ λεπτές μεμβράνες, τις μεμβράνες σχισμής. Οι μεμβράνες σχισμής έχουν δομική σημασία στην υπερεκλεκτικότητα του φραγμού διήθησης. Όπως έχουν δείξει ανοσοϊστοχημικές μελέτες, στη στεγανότητα της σχισμής συμβάλλει μια ειδική πρωτεΐνη, η ZO-1 (Schnabel et al 1990, Kurihara et al 1992).

Το σώμα των ποδοκυττάρων χαρακτηρίζεται από ευμεγέθη πυρήνα, καλώς ανεπτυγμένη συσκευή Golgi και πλούσιο αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, λυσοσώμια και μιτοχόνδρια (εικόνα 1), ενδεικτικά υψηλής αναβολικής και καταβολικής δραστηριότητας. Σε αντίθεση, οι κυτταρικές προσεκβολές (τα πόδια) περιέχουν ελάχιστα οργανίδια. Εκτός της σημασίας τους για τη δομική ακεραιότητα του αγγειώδους σπειράματος, τα ποδοκύτταρα συνθέτουν το πλείστον, αν όχι το σύνολο, των στοιχείων της βασικής σπειραματικής μεμβράνης (Abrahamson 1987).

Τα ποδοκύτταρα είναι πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα με μία αυλική (κορυφαία) και άπω-αυλική (βασική) κυτταρική μεμβράνη. Το βασικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης αντιστοιχεί στα «πέλματα» των ποδικών προσεκβολών, τα οποία, όπως αναφέρθηκε, εμβυθίζονται στην εξωτερική αραιή στιβάδα (lamina rara externa) της βασικής σπειραματικής μεμβράνης, περίπου 60 nm. Η σχισμή διήθησης αποτελεί το όριο μεταξύ αυλικής και άπω-αυλικής (βασικής) κυτταρικής μεμβράνης. Η αυλική κυτταρική μεμβράνη αφορίζει το τμήμα του κυττάρου άνωθεν της κυτταρικής σχισμής.

Η αυλική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σχισμής) καλύπτεται από έναν αρνητικά φορτισμένο γλυκοκάλυκα, πλούσιο σε σιαλογλυκοπρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν την ποδοκαλυξίνη (Kerjaschki et al 1984, Sawada et al 1986), την πεδοεντίνη (Huang and Langlois 1985), την SGP115/107 (Mendrick and Rennke 1988) και άλλες (Mundel and Kriz 1995).

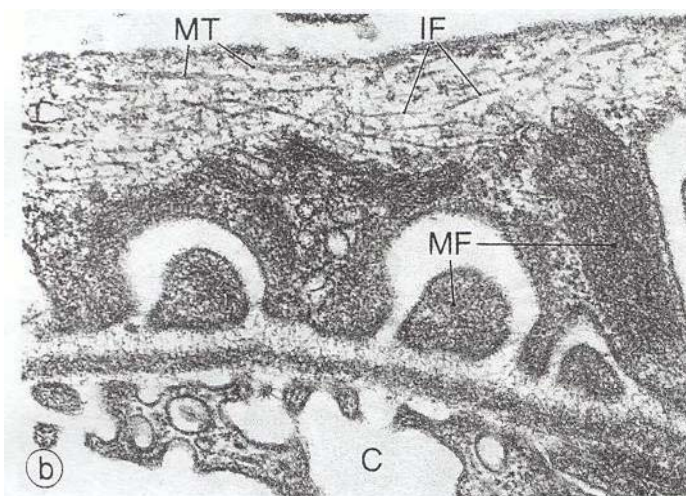
Δύο ειδικές πρωτεΐνες ανευρίσκονται στο άπω-αυλικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης, και τέλος ο υποδοχέας του C3b (Kazatchkine et al 1982) και η πρωτεΐνη gp330/μεγαλίνη, ένα μείζον αντιγόνο της νεφρίτιδας Heymann (Kerjaschki and

Farquhar 1983), ανιχνεύονται σε όλη την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του ποδοκυττάρου.

Επιπλέον, στην κυτταρική μεμβράνη του ποδοκυττάρου εκφράζονται ένας σημαντικός αριθμός υποδοχέων για ορμόνες και αγγειοκινητικές ουσίες, που περιλαμβάνουν την αγγειοτενσίνη II, την βραδυκινίνη, κατεχολαμίνες, το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο, την παραθορμόνη, τον TGF- $\beta$ , την IL-1 και τον FGF-2 (Kazatchkine et al 1982, Kerjaschki and Farquhar 1983, Seiler et al 1975, Kanwar and Farquhar 1980, Striker and Striker 1985, Foidart et al 1980, Rollason and Brewer 1984, Allegri et al 1986).

### **1.1.3. Κυτταροσκελετός των επιθηλιακών κυττάρων**

Τα πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα περιέχουν έναν καλώς ανεπτυγμένο κυτταροσκελετό. Τα κύρια δομικά στοιχεία του κυτταροσκελετού είναι τα μικροϊνίδια, τα ενδιάμεσα ινίδια και οι μικροσωληνίσκοι. Τα μικροϊνίδια, διαμέτρου περίπου 6 nm, ευρίσκονται κυρίως με τη μορφή δικτύου ή σχηματίζουν χαρακτηριστικά δεμάτια, που ονομάζονται ινίδια του stress (stress fibres). Σχηματίζονται από μόρια μονομερούς G-ακτίνης, τα οποία, κάτω από ειδικές συνθήκες, πολυμερίζονται σε ινίδια F-ακτίνης. Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν μια ομάδα αδιάλυτων ινιδίων με διάμετρο 7-11 nm. Είναι τα σταθερότερα στοιχεία του κυτταροσκελετού και ανευρίσκονται κυρίως στα σημεία του κυττάρου όπου ασκείται έντονη μηχανική πίεση. Στα σπονδυλωτά έχουν αναγνωριστεί πέντε διαφορετικοί τύποι ενδιάμεσων ινιδίων (Lazarides 1982). Το τρίτο δομικό στοιχείο του κυτταροσκελετού, οι μικροσωληνίσκοι, έχουν τη μεγαλύτερη διάμετρο (24 nm) και χαρακτηρίζονται από ταχύ πολυμερισμό και αποπολυμερισμό. Το σώμα και οι πρωτογενείς ποδικές προσεκβολές του ποδοκυττάρου περιέχουν εξελίξιμους μικροσωληνίσκους και ενδιάμεσα ινίδια, κυρίως βιμεντίνης και δεσμίνης (Andrews 1988, Vasmant et al 1984). Δέσμες μικροϊνιδίων, που περιέχουν ακτίνη, μυοσίνη και  $\alpha$ -ακτινίνη, ανευρίσκονται τόσο στις πρωτογενείς, όσο και στις δευτερογενείς ποδικές προσεκβολές.



**Εικόνα 3.** Κυτταροσκελετός του σπειραματικού επιθηλιακού κυττάρου. Ενδιάμεσα ινίδια (IF), μικροσωληνίσκοι (MT) και πυκνές δέσμες μικροϊνιδίων των ποδιών (MF). Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου x 46000

Οι δέσμες των μικροσωληνίσκων και ενδιάμεσων ινιδίων εκτείνονται από το σώμα του κυττάρου μέχρι το τελικό άκρο των πρωτογενών προσεκβολών. Σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου τα μικροϊνίδια, που περιέχουν ακτίνη, δημιουργούν ένα λεπτό στρώμα κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (Drenckhahn and Franke 1988). Στις δευτερογενείς (ποδικές) προσεκβολές ανευρίσκονται πυκνές δέσμες μικροϊνιδίων, οι οποίες εκτείνονται κατά μήκος τους. Οι μικροϊνιδιακές αυτές δέσμες σχηματίζουν αγκύλες, κατά προσέγγιση παράλληλες προς το σημείο καμπής της σχισμής διήθησης, εκτείνονται προς την παρακείμενη ποδική προσεκβολή του ίδιου κυττάρου και φαίνεται να αγκυροβολούν στο πυκνό κυτταρόπλασμα που συνορεύει με την κυτταρική μεμβράνη (Andrews 1988) (εικόνα 3).

Τα «πέλματα» των ποδικών προσεκβολών και τα τμήματα των πρωτογενών προσεκβολών, από τα οποία προέρχονται, είναι στερεά συνδεδεμένα με τη βασική σπειραματική μεμβράνη. Η προσκόλληση των κυττάρων σε εξωκυτταρικά στοιχεία περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενες ενότητες. Σε γενικές γραμμές, η προσκόλληση γίνεται με τη διαμεσολάβηση μορίων της κυτταρικής επιφάνειας, τόσο της οικογένειας των ιντεγρινών, όσο και μη-ιντεγρινικών υποδοχέων (Albelda and Buck 1990). Οι ιντεγρίνες είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από  $\alpha$  και  $\beta$  υποομάδα, οι οποίες συνδέονται με μη-ομοιοπολικό δεσμό. Οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες ταλίνη και βινκουλίνη διαμεσολαβούν στην προσκόλληση των μικροϊνιδίων με την ενδοκυττάρια (κυτταροπλασματική) περιοχή των ιντεγκρινών. Η σύνδεση ποδικών προσεκβολών και βασικής σπειραματικής μεμβράνης, η οποία έχει μελετηθεί σε επιθηλιακά σπειραματικά κύτταρα αρουραίου, γίνεται μέσω της οικογένειας  $\beta 1$  ιντεγρινών και

ειδικότερα της α3β1 ιντεγρίνης, η οποία έχει σημεία σύνδεσης με το τύπου IV κολλαγόνο και τη λαμινίνη (Drenckhahn and Franke 1988, Adler 1992, Cybulsky et al 1992).

Στον άνθρωπο, ο πολλαπλασιασμός των ποδοκυττάρων συμπληρώνεται κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής (Fries et al 1989, Nagata and Kriz 1992). Στη μετέπειτα ζωή, μετά από παρατεταμένη διέγερση με ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα, μπορεί να παρατηρηθεί μιτωτική διαίρεση των πυρήνων, η οποία όμως δεν καταλήγει σε πλήρη διαίρεση και παραγωγή νέων κυττάρων. Η μιτωτική αυτή διαίρεση των πυρήνων (διπύρηνα κύτταρα) θεωρείται ακραία έκφραση τύπου κυτταρικής υπερπλασίας (Kriz et al 1995).

Από λειτουργικής πλευράς, η μορφολογία των ποδοκυττάρων και η στενή τους σύνδεση με τη βασική σπειραματική μεμβράνη παραπέμπουν, κατ' αρχήν, σε μια λειτουργία στήριξης και ελαστικής αντίστασης στη διατοιχωματική πίεση του τριχοειδούς (Welling et al 1995). Ωστόσο, επειδή περιέχουν ένα συστατικό σύστημα ακτίνης, το οποίο μπορεί να υπόκειται σε διάφορες επιδράσεις, θεωρείται ότι ρυθμίζουν και τον τόνο του αγγείου, ανάλογα με τις μεταβολές της σπειραματικής πίεσης (Kriz et al 1994). Υπέρ αυτής της άποψης συνηγορεί και η παρουσία υποδοχέων, για διάφορες αγγειοκινητικές ουσίες, στην κυτταρική τους μεμβράνη.

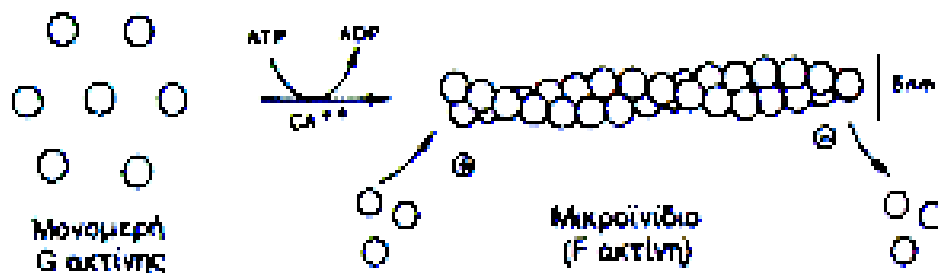
Εξίσου λειτουργικά σημαντική είναι η συμβολή τους στο φραγμό διήθησης. Σε σύγκριση με άλλα τριχοειδικά πλέγματα, το αγγειώδες σπείραμα χαρακτηρίζεται από μια υψηλή διαπερατότητα για το νερό, τα ιόντα και μικρομοριακές ουσίες, ενώ παρουσιάζει ελάχιστη διαπερατότητα για μόρια του μεγέθους της αλβουμίνης ή μεγαλύτερα.

Η εκλεκτικότητα του φραγμού για τα μακρομόρια αφορά σε μέγεθος, ηλεκτρικό φορτίο και στερεοδομή (Brenner et al 1978, Farquhar 1961). Τα σπειραματικά τριχοειδή δημιουργούν ένα διπλό φραγμό μεγέθους και φορτίου. Η κρίσιμη περιοριστική περιοχή μεγέθους εντοπίζεται στη μεμβράνη των σχισμών διήθησης, οι οποίες επιτρέπουν διέλευση μορίων με «δραστική» διάμετρο 4 nm. Στο φραγμό φορτίου συμμετέχει το σύνολο των δομικών στοιχείων του τριχοειδούς: τόσο η βασική σπειραματική μεμβράνη, η οποία είναι πλούσια σε αρνητικά φορτισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες (Foidart et al 1980), όσο και τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία

επικαλύπτονται με τον αρνητικά φορτισμένο γλυκοκάλυκα. Δεδομένου ότι η αρνητικά φορτισμένη αλβουμίνη του πλάσματος έχει μια δραστική διάμετρο 3,8 nm, η περιορισμένη διήθησή της προϋποθέτει την ακεραιότητα, τόσο του φραγμού μεγέθους, όσο και του φραγμού φορτίου (Deen et al 1979).

## 1.2 Κυτταροσκελετός της ακτίνης

Η μονομερής G- ακτίνη (globular) είναι η πρωτεΐνη που κυριαρχεί στα μικροϊνίδια. Τα μόρια αυτά πολυμερίζονται σχηματίζοντας μακρά νημάτια F-ακτίνης (filamentous), τα οποία στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζονται ως διπλό, δεξιόστροφο, αγκαθωτό μόριο (εικόνα 4). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 42 KDa, καλά διατηρημένη κατά την φυλογενετική εξέλιξη. Αποτελείται από 374-375 αμινοξέα, είναι εξαιρετικά σταθερή και υπόκειται σε μικρές μόνο αλλαγές, από είδος σε είδος. Κάθε μόριο ακτίνης διαθέτει 6-10 θέσεις πρόσδεσης για κατιόντα, από τις οποίες μια είναι υψηλής συγγένειας για  $Mg^{2+}$  ή  $Ca^{2+}$  (Gershman et al 1986, Pollard 1990). Επίσης κάθε μόριο ακτίνης συνδέεται με μεγάλη συγγένεια με ένα μόριο ATP ή ADP (Freiden and Patane 1988) και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού ένα γραμμομόριο ATP υδρολύεται σε ADP και  $P_i$ , για κάθε γραμμομόριο G-ακτίνης που μετατρέπεται σε νηματοειδή F μορφή. Εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα, σε πολλά από τα οποία αποτελεί το 10% του συνόλου των πρωτεϊνών. Στα μη μυϊκά κύτταρα η ακτίνη υπάρχει σε πολυμερισμένη (F-ακτίνη) και μη πολυμερισμένη μορφή (G-ακτίνη) σε ίση περίπου αναλογία.



**Εικόνα 4.** Διαγραμματική απεικόνιση του πολυμερισμού των υπομονάδων ακτίνης και δημιουργία μικροϊνιδίου

Στα σπονδυλωτά η ακτίνη απαντάται σε έξι τουλάχιστον διαφορετικούς τύπους, που ο κάθε ένας κωδικοποιείται από ανεξάρτητο γονίδιο: ένας τύπος ανευρίσκεται στους σκελετικούς μυς, ένας στον καρδιακό μυ, δύο στα λεία μυϊκά κύτταρα και δύο στα μη μυϊκά κύτταρα (Vandekerckhove and Weder 1978). Η ποικιλομορφία των μορίων ακτίνης αυξάνεται εξαιτίας της διαφορετικής ωρίμανσης των mRNA (RNA splicing), καθώς και λόγω μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων, κυρίως στο αμινοτελικό άκρο. Οι ισομορφές της ακτίνης κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες (Herman 1993). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η β- και γ- ακτίνη των μη μυϊκών κύτταρων και η γ- ακτίνη των λείων μυϊκών ινών. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα τρία διαφορετικά είδη της α- ακτίνης: των σκελετικών, των καρδιακών και των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τις συγγενεύουσες προς την ακτίνη πρωτεΐνες (actin related proteins) ορισμένες από τις οποίες απαντώνται σε κύτταρα σπονδυλωτών (Schwob and Martin 1992). Μια από αυτές είναι η ακτίνη RPV (actin- related protein vertebrate), που αποτελεί το κύριο στοιχείο του συμπλέγματος δυνακτίνης του εγκεφάλου (Less Miller et al 1992b), ενώ η κεντρακτίνη (centractin) αλληλεπιδρά με το κεντρόσωμα (Clark and Meyer 1992). Θεωρείται ότι οι ακτίνες της τρίτης κατηγορίας λειτουργούν ως «άγκυρα» για τα κεντροσώματα ή ότι συνδέουν τις ακτίνες της πρώτης κατηγορίας με το κυτταροπλασματικό πλέγμα μικροσωληνίσκων (Herman 1993). Πρέπει να σημειωθεί ότι μια ισομορφή της ακτίνης δεν μπορεί να αντικατασταθεί από άλλη, ενώ πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι τα πολυμερή που σχηματίζουν οι ισομορφές ακτίνης του κυτταροσκελετού είναι λιγότερο σταθερά, από τα πολυμερή της ακτίνης των σκελετικών μυών (Khaitlina 2001).

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο ο πολυμερισμός της ακτίνης περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

- ενεργοποίηση του μονομερούς και σχηματισμό πυρήνων
- επιμήκυνση του ινιδίου
- επίτευξη σταθερής κατάστασης

Η αλλαγή της διαμόρφωσης των μονομερών ακτίνης, μετά από σύνδεσή τους με ιόντα  $Mg^{2+}$ , οδηγεί στη δημιουργία τριμερών, τα οποία σχηματίζουν ένα αρχικό «πυρήνα» (Zimmerle and Frieden 1986).

Η αύξησή τους συνεχίζεται με την προσθήκη ATP-ακτίνης, η οποία μετά την ενσωμάτωσή της, μετατρέπεται σε ADP-Pi ακτίνη και τελικά σε ADP-ακτίνη (Korn et al 1987). Η άμεση αποδέσμευση του Pi από το σύμπλοκο ADP-Pi ακτίνης έχει σταθεροποιητική σημασία, επειδή η κρίσιμη συγκέντρωση της ADP-Pi ακτίνης είναι πολύ μικρότερη από αυτήν της ADP ακτίνης. Η λειτουργική σημασία της υδρόλυσης του ATP μετά την ενσωμάτωση μορίων ακτίνης στο ολιγομερές είναι ότι διευκολύνει αργότερα τον αποπολυμερισμό τους, δεδομένου ότι τα ινίδια ADP-ακτίνης αποπολυμερίζονται ευκολότερα από της ATP-ακτίνης, λόγω της διαφορετικής κρίσιμης συγκέντρωσής στα άκρα των ινιδίων τους (Carlier 1989).

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

Η δυναμική του πολυμερισμού της ακτίνης στα κύτταρα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες και κυρίως από πρωτεΐνες, που συνδέονται με τη μονομερή ή πολυμερή ακτίνη. Ο όρος κυτταροσκελετός της ακτίνης δεν αναφέρεται μόνο στην ακτίνη, αλλά και σε αυτή την μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέονται με την ακτίνη και ρυθμίζουν τον πολυμερισμό ή αποπολυμερισμό των μικροϊνιδίων, καθώς και την οργάνωσή τους. Η ενεργοποίηση των συνδεομένων με την ακτίνη πρωτεϊνών, προς την μια ή την άλλη κατεύθυνση, εξαρτάται από τις ενδοκυττάριας συνθήκες που διαμορφώνονται μετά από κάθε εξωκυττάρικο ερέθισμα.



### 1.2.1 Πρωτεΐνες συνδεόμενες με την ακτίνη (Actin Binding proteins).

Ένας τρόπος κατάταξης των πρωτεϊνών αυτών είναι ως προς το αποτέλεσμα της δράσης τους στην ενδοκυττάρια οργάνωση της μονομερούς και πολυμερούς ακτίνης. Σύμφωνα με το κριτήριο αυτό διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες (Stossel et al 1985, Pollard and Cooper 1986):

- i. *Πρωτεΐνες συνδεόμενες με τη μονομερή ακτίνη (actin binding protein)*: Οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής, συνδεόμενες με τη μονομερή ακτίνη, σχηματίζουν σύμπλοκο, το οποίο δεν δύναται να πολυμεριστεί και επομένως συμβάλλουν στη μετατόπιση της ισορροπίας προς τη μη πολυμερισμένη μορφή της. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι προφιλίνες, η DNase I και η συνδεόμενη με τη βιταμίνη D πρωτεΐνη.
- ii. *Πρωτεΐνες κάλυψης των άκρων των μικροινιδίων (capping proteins)*: Οι πρωτεΐνες της δεύτερης κατηγορίας συνδέονται στο ένα από τα δύο άκρα των ινιδίων ακτίνης (οι περισσότερες στο «ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο»), εμποδίζοντας την περαιτέρω προσθήκη μονομερούς ακτίνης. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής, που συνδέονται πλευρικά στα ινίδια, έχουν την ικανότητα να εισχωρούν ανάμεσα σε δύο γειτονικά μόρια ακτίνης, διασπώντας έτσι τη συνέχεια των ινιδίων και ονομάζονται πρωτεΐνες κατάτμησης της ακτίνης (actin severing proteins). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η φραγμίνη, σεβερίνη, γελσολίνη και η βαλλίνη.
- iii. *Πρωτεΐνες διασύνδεσης και δεματοποίησης των μικροινιδίων (cross-linking and bundling proteins)*: Οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής συνδέονται πλευρικά στα ινίδια της ακτίνης, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίησή τους ή τη διασύνδεσή τους σε δέσμες ινιδίων. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η βαλλίνη (η οποία δρα και ως πρωτεΐνη κατάτμησης της ακτίνης) και η φιμπρίνη.
- iv. *Πρωτεΐνες σύνδεσης της ακτίνης στην κυτταρική μεμβράνη (membrane attachment proteins)*: Στις πρωτεΐνες αυτές, οι οποίες μεσολαβούν στη σύνδεση των ινιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, ανήκουν η βινκουλίνη, η α-ακτινίνη, η ταλίνη, η σπεκτρίνη, η ζώνη 4.1 και μια πρωτεΐνη M.B. 110 Kda. Η α-ακτινίνη συνδέεται με την ακτίνη μέσω της βινκουλίνης (Wachsstock et al 1987), η δε ταλίνη συνδέεται με την ακτίνη, είτε με απευθείας πρόσδεσή της στο πλάι του ινιδίου (Pavalko et al

1991), είτε με σύνδεσή της με την βινκουλίνη (Burr ridge and Mangeat 1984), η οποία επίσης προσδένεται στο πλάι των ινιδίων.

Οι πρωτεΐνες σύνδεσης της ακτίνης αλληλεπιδρούν με πλήθος άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες επίσης εντοπίζονται στις εστίες πρόσφυσης. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των πρωτεϊνών αυτών είναι η παξιλλίνη, η FAK (Focal Adhesion Kinase) και η VASP (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein), της οποίας πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο ρόλος στη συσσωμάτωση και πρόσδεση των ινιδίων της ακτίνης κατά το σχηματισμό των κυτταρικών επαφών, τόσο με το υπόστρωμα, όσο και με τα γειτονικά κύτταρα (Price and Brindle 2000).

### **1.3. Εστιακές προσφύσεις (Focal adhesions) και κυτταροσκελετός της ακτίνης**

Η προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία συντελείται, όπως ήδη αναφέρθηκε, μέσω ετεροδιμερών υποδοχέων της οικογένειας των ιντεγκρινών (Burr ridge et al 1988, Burr ridge and Chrzanowska-Wodnicka et al 1996, Calderwood et al 2000). Σε κυτταρικές καλλιέργειες, τα σημεία προσκόλλησης, τα οποία καλούνται «εστιακές προσφύσεις» (focal adhesions), φαίνονται ως περιοχές στενής σύνδεσης με την κυτταρική μεμβράνη, όπου «αγκυροβολεί» ένα καλά δεματοποιημένο και διασταυρούμενο δίκτυο ινιδίων ακτίνης (Burr ridge et al 1988, Craig and Johnson 1996). Εκτός από το ρόλο τους ως «αγκυροβολητών», οι δομές των εστιών πρόσφυσης είναι σημαντικές για τη μεταβίβαση σημάτων στον κυτταροσκελετό και στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών (Schwartz et al 1995, Burr ridge and Chrzanowska-Wodnicka 1996, Schlaepfer and Hunter 1996). Η οργάνωση των δομών πρόσφυσης περιλαμβάνει κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (βινκουλίνη, ταλίνη, α-ακτινίνη) και αρκετές κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες, όπως η κινάση πρωτεϊνικών προσφύσεων (FAK-focal adhesion kinase), οι οποίες επάγουν τη φωσφορυλίωση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Η διαδικασία σχηματισμού και αναδιοργάνωσης των εστιών πρόσφυσης ρυθμίζεται από τις πρωτεϊνικές αυτές κινάσες, καθώς και από τις μικρές GTPάσες της οικογένειας Rho (Burr ridge and Chrzanowska-Wodnicka et al 1996, Horwitz and Parsons 1999).

Η πρωτεΐνη FAK, μοριακού βάρους 125 KDa, αποτελεί μια από τις χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των εστιών πρόσφυσης, η οποία υφίσταται φωσφορυλίωση σε τυροσίνη

κατά τη συσσώρευση (clustering) ιντεγκρινών (Guan et al 1991, Kornberg et al 1992, Lipfert et al 1992, Schaller et al 1992). Η FAK, μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης, εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και κυτταρικούς τύπους και είναι καλά συντηρημένη κατά τη φυλογενετική εξέλιξη (Schaller et al 1992, Fox et al 1999, Palmer et al 1999). Το καρβοξυλικό της άκρο, η μη καταλυτική περιοχή, περιλαμβάνει θέσεις για πολλαπλές πρωτεϊνικές συνδέσεις, εκφράζεται αυτόνομα σε συγκεκριμένα κύτταρα και μπορεί να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ενεργότητας της FAK (Richardson and Parsons 1996, Xiong et al 1998, Nolan et al 1999). Η φωσφορυλίωση της σε κατάλοιπα τυροσίνης (Parsons and Parsons 1997) είναι σημαντική για την τυροσινοφωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών των εστιών πρόσφυσης, όπως η παξιλλίνη και η Cas, καθώς και στη ρύθμιση καθοδικών μονοπατιών μεταβίβασης σήματος σε καθοδικούς τελεστές (downstream effectors) (Calalb et al 1995, Owen et al 1999).

Η εντόπιση της FAK στις εστίες πρόσφυσης γίνεται από μια περιοχή, που ευρίσκεται εντός του καρβοξυτελικού της άκρου, η οποία ονομάζεται περιοχή FAT (Focal Adhesion Targeting) και είναι ουσιαστική για τη μεταβίβαση σήματος από τη FAK (Sieg et al 1999, Thomas et al 1999, Shen et al 1999). Η μόνη πρωτεΐνη των εστιών πρόσφυσης που έχει ταυτοποιηθεί, μέχρι σήμερα, να προσδένεται στη FAT περιοχή είναι η παξιλλίνη (Turner 1998). Η παξιλλίνη προσδένεται άμεσα στις κυτταροπλασματικές περιοχές των υποδοχέων ιντεγκρίνης (Liu et al 1999, Schaller et al 1995), αλλά και στην πρωτεΐνη των εστιακών προσφύσεων βινκουλίνη, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως «συνεργός ελλιμενισμού» (docking partner) της FAK στα σύμπλοκα πρόσφυσης. Η παξιλλίνη διαθέτει δύο περιοχές πρόσδεσης της FAK, τα οποία εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου (Brown et al 1996). Η ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της FAK και της παξιλλίνης, ως απόκριση σε ένα μεγάλο αριθμό ερεθισμάτων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση της παξιλλίνης είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργότητα της FAK (Bellis et al 1995). Εκτός, όμως, της FAK και της βινκουλίνης, η παξιλλίνη προσδένεται και σε άλλες πρωτεΐνες, που συμμετέχουν σε μεταβολές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και είναι απαραίτητες για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών αυτών με την παξιλλίνη, μέσω αλληλοεπιδράσεων με τη FAK, θεωρείται ότι έχουν σημαντικό

ρόλο στη ρύθμιση σημάτων, που οδηγούν στη GTPαση Rac και την PI-3 κινάση, δύο πρωτεΐνες που συμμετέχουν στενά στη ρύθμιση της φλοιώδους ακτίνης (Parsons et al 2000).

Επαγωγή της φωσφορυλίωσης της FAK σε κατάλοιπα τυροσίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί, όχι μόνο μέσω συσσωμάτωσης των ιντεγκρινών, αλλά και μέσω άλλων μεμβρανικών υποδοχέων πρόσφυσης και συγκεκριμένα: α) ανοσοσφαιρίνης, β) νευροπεπτιδίων, γ) κατεχολαμινών, δ) νευροδιαβιβαστών, ε) νευροτοξινών, στ) αυξητικών παραγόντων ζ) βιοδραστικού λιπιδίου και άλλων (Anfosso et al 1998, Rodriguez-Fernandez 1999, Schlaepfer et al 1999, Guan et al 1992).

Αν και τα ερεθίσματα, που προκαλούν φωσφορυλίωση της FAK, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ρυθμίζονται από ένα κοινό παράγοντα, την πρωτεΐνη Rho της οικογένειας των GPTασεων (Rodriguez-Fernandez 1999), ο οποίος αποτελεί τον κυριότερο ρυθμιστή των εστιών πρόσφυσης (Ridley and Hall 1992). Από τη μελέτη αρκετών συστημάτων που έχουν μελετηθεί, με εκτενέστερα μελετημένο το σύστημα κυττάρων Swiss 3T3, έχει διαπιστωθεί ότι η προσθήκη α) διαφόρων αυξητικών παραγόντων, β) νευροπεπτιδίων, γ) βιοδραστικών λιπιδίων και δ) βακτηριακών νευροτοξινών, μπορεί να προκαλέσει ανασχηματισμό των εστιών πρόσφυσης και φωσφορυλίωση της FAK σε τυροσίνη (Rodriguez-Fernandez 1999). Επιπλέον, η αναστολή της Rho με C3 εξωτρανσφεράση, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δράση των παραγόντων αυτών εξαρτάται από την ενεργότητα της Rho. Εφόσον, η FAK δεν είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των εστιών πρόσφυσης (Burrige et al 1997), είναι πιθανό η Rho να επάγει πρωταρχικά το σχηματισμό των δομών, πριν τη φωσφορυλίωση της FAK (Rozengurt and Rodriguez-Fernandez 1998).

#### **1.4. Παράγων νέκρωσης όγκων (TNFα) και σπειραματική βλάβη**

##### **1.4.1. Tumor Necrosis Factor**

Ο παράγων νέκρωσης όγκων (TNFα), γνωστός και ως καχεκτίνη, είναι μια από τις περισσότερο μελετημένες κυτταροκίνες, ο οποίος απελευθερώνεται αρκετά γρήγορα και σε άφθονες ποσότητες, ως απάντηση σε μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων (Jaattela 1991).

Οι κυτταροκίνες παράγονται από ποικίλα κύτταρα. Ο TNFα παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα μονοκύτταρα του πνεύμονα και του περιτοναίου, τα κύτταρα Kupffer του ήπατος, τα κύτταρα φυσικούς φονείς, τα μεσαγγειακά και τα σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα (Mellors et al 1991).

Η πρώτη περιγραφή του TNFα έγινε το 1975. Πρόκειται για ένα πεπτιδίο με M.B. 17 KD, το οποίο περιέχει 157 αμινοξέα (Pennica et al 1984). Η αλληλουχία των αμινοξέων του ανθρώπινου TNFα είναι παρόμοια με αυτήν του TNFα των ζώων (Jaattela 1991).

Το υπεύθυνο για την παραγωγή του ανθρώπινου TNFα γονίδιο εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 6 (Nedwin et al 1985, Taverner et al 1987). Συντίθεται αρχικά σαν προορμόνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται, με αποτέλεσμα την παραγωγή του πεπτιδίου με M.B. 17 KD. In vitro διαπιστώθηκε ότι τα μόρια του TNFα αθροίζονται και σχηματίζουν ποικίλου μεγέθους πρωτεΐνες (διμερείς, τριμερείς, πενταμερείς ίσως και πολυμερείς). Η τριμερής μορφή του TNFα πιστεύεται ότι είναι και η βιολογικά δραστική. Είναι οκτώ φορές πιο δραστική από τα μονομερή, όσον αφορά την σύνδεση της με τους υποδοχείς (Smith και Baglioni 1987) και είναι αυτή η οποία συνδέεται με τους υποδοχείς των κυττάρων στόχων, προκειμένου να εκφραστούν οι βιολογικές του δράσεις (DeForge et al 1990).

Ο TNFα αποδομείται γρήγορα στους περιφερειακούς ιστούς του σώματος, χωρίς ανιχνεύσιμα ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα. Παρά το μικρό μοριακό του βάρος, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (περίπου 10%) της χορηγούμενης ραδιοσημασμένης ποσότητας ανιχνεύεται στα ούρα, ως προϊόν αποδόμησης και όχι ως κυτταροκίνη TNFα, πιθανόν γιατί τα μονομερή του συναθροίζονται σε μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο της αλβουμίνης, ή γιατί ο TNFα συνδέεται με άλλα μόρια (Beutler et al 1985).

Ο TNFα συνδέεται με δύο υποδοχείς με την ίδια περίπου συγγένεια: τον P60, ο οποίος ονομάζεται και P55 ή τύπου I και τον P80, που επίσης ονομάζεται και P75 ή τύπου II με μοριακό βάρος 60 KD και 80 KD αντίστοιχα. Ο P60 υποδοχέας έχει 426 αμινοξέα: το εξωκυττάριο τμήμα αποτελείται από 182 αμινοξέα, το διαμεμβρανικό από 21 και το ενδοκυττάριο από 221 αμινοξέα. Ο P80 υποδοχέας έχει 439 αμινοξέα: 235 στο εξωκυττάριο τμήμα, 30 στο διαμεμβρανικό και 174 στο ενδοκυττάριο τμήμα. Στο ενδοκυττάριο τμήμα των δύο υποδοχέων διαφέρει σημαντικά για παράδειγμα τα 80

τελευταία αμινοξέα, με το καρβοξυλικό άκρο, του P60 (τύπου I) υποδοχέα, το οποίο ονομάζεται «περιοχή θανάτου» (death domain), απουσιάζει από τον υποδοχέα P80 (τύπου II). Η περιοχή αυτή απαιτείται για την αντιϊκή δράση, την απόπτωση και την επαγωγή της σύνθεσης του νιτρικού οξειδίου από τον TNFα (Smith et al 1990, Aggarwal 2000).

Ο τύπου I (TNFR-1) υποδοχέας εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων, ενώ ο τύπου II (TNFR-2) εκφράζεται μόνο στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα επιθηλιακά κύτταρα. Στο πλάσμα φυσιολογικών ατόμων ανιχνεύονται σε διαλυτή μορφή και σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε φλεγμονώδη νοσήματα και νεφρική ανεπάρκεια οι συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα υψηλές. Διαλυτοί υποδοχείς του TNFα έχουν βρεθεί και στα ούρα ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Chouaid et al 1991).

Η σύνδεση του TNFα με τον υποδοχέα του προκαλεί σημαντικές βιοχημικές μεταβολές. Αυξάνει την διαμεμβρανική διαπερατότητα των κυττάρων, η οποία ακολουθείται από αυξημένη είσοδο εξωκυττάριου  $Ca^{++}$  στον ενδοκυττάριο χώρο και ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2, με συνέπεια την ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης αραχιδονικού οξέος και προσταγλανδίνης E2 (PGE<sub>2</sub>), ενός ισχυρού αναστολέα της πρωτεϊνικής C-κινάσης (Dayer et al 1985).

Ο TNFα και οι υποδοχείς του συγγενεύουν με μια υποομάδα πρωτεϊνών (TNF/TNFRSFPs) των οποίων είναι καλά μελετημένη και καθορισμένη η γονιδιακή τους θέση, όπως και ο φαινότυπος που προκαλείται από τις μεταλλάξεις τους (Idriss and Naismith 2000, Locksley et al 2001).

Οι υποδοχείς του TNFα και οι συνδέσεις τους με την υπεροικογένεια αυτών των πρωτεϊνών έχουν μοναδικές δομικές ιδιότητες, διότι μέσω αυτών μεταφέρονται μηνύματα προς τις οδούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, κυτταρικής επιβίωσης, αναγέννησης ιστών, όπως και μεταφορών στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων (Locksley et al 2001).

Ο TNFα είναι μια κυτταροκίνη, η οποία έχει αντικαρκινική δράση με πρωταγωνιστικό ρόλο στη φλεγμονή και την ανοσία, ενώ συγχρόνως αποτελεί τοξικό παράγοντα (Broxmeyer et al 1986). Αποτελεί προεξάρχουσα ανταπόκριση πολλών οργανισμών και κυτταρικών σειρών (στους οποίους έχει μελετηθεί) ως απάντηση στις επιπτώσεις

του πυρετού, του shock, της ιστικής βλάβης, της νέκρωσης όγκων, ενώ προκαλεί επαγωγή άλλων κυτταροκινών και ανοσορρυθμιστικών μορίων, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης και απόπτωσης των κυττάρων (Paradakis and Targan 2000a).

Η τοπική και παροδική παραγωγή TNFα είναι ωφέλιμη για τον ξενιστή, όσον αφορά τον έλεγχο και τη ρύθμιση της ανοσίας και της φλεγμονής, αλλά και όσον αφορά στην ανάπλαση των ιστών που έχουν υποστεί τις συνέπειες της φλεγμονής. Αντίθετα, η παρατεταμένη και συστηματική παραγωγή του είναι βλαπτική (Beutler και Cerami 1988).

Η διαδικασία της παραγωγής TNFα έχει μελετηθεί, *in vitro*, σε μακροφάγα, μετά έκθεσή τους σε ενδοτοξίνη. Η ενδοτοξίνη (lipopolysaccharide – LPS) αποτελεί τοιχωματική πρωτεΐνη αρκετών gram(-) μικροοργανισμών και είναι ο ισχυρότερος από τους μέχρι σήμερα γνωστούς παράγοντες, που διεγείρουν τα μακροφάγα για την παραγωγή TNFα, αλλά και ιντερλευκίνης-1 (Bucala et al 1991 και Conti et al 1991). Η παρουσία mRNA του TNFα στο εσωτερικό των μακροφάγων διαπιστώνεται σε ελάχιστο χρόνο, μετά την έκθεση τους σε LPS. Ανιχνεύσιμες ποσότητες του TNFα, διαπιστώνονται μέσα σε 20-30 λεπτά, ενώ το mRNA του TNFα φτάνει στο ανώτερο επίπεδο του σε 2-3 ώρες μετά την χορήγηση του LPS.

Η LPS, εκτός από τη διέγερση της παραγωγής TNFα από τα μακροφάγα, διεγείρει και την παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>). Φαίνεται ότι ή PGE<sub>2</sub> δρα ως ρυθμιστής απελευθέρωσης του TNFα. Η παραγωγή TNFα από καλλιέργειες μακροφάγων, μετά διέγερση με LPS, αυξάνει όταν στις καλλιέργειες προστίθεται αναστολέας των προσταγλανδινών. Συνεπώς, φαίνεται ότι η PGE<sub>2</sub> δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής απελευθέρωσης του TNFα. Η δράση αυτή γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο και επιτυγχάνεται δια μέσου της αύξησης των ενδοκυτταρίων επιπέδων του cAMP (DeForge et al 1990).

Η κυκλοσπορίνη επίσης αναστέλλει τη βιοσύνθεση του TNFα από τα μακροφάγα σε ένα μετα-μεταγραφικό επίπεδο, αλλά το ακριβές σημείο και ο μηχανισμός δράσης της δεν είναι επαρκώς γνωστά (Remick et al 1989).

Πάντως η ανεξέλεγκτη παραγωγή TNFα μετά χορήγηση LPS, έχει σαφώς βλαπτικές συνέπειες. Η χορήγηση αντι-TNFα αντισωμάτων, πριν από τη χορήγηση LPS σε

ποντικούς και ασθενείς με βαρύ σηπτικό shock, βελτιώνει την αρτηριακή πίεση και τη διατηρεί σταθερή, χωρίς ινότροπα (Exley et al 1990).

Ο TNFα έχει σημαντικές ανοσορυθμιστικές δράσεις, πολλές από αυτές δυνητικά ευεργετικές. Προκαλεί ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, τόσο ως προς τον αριθμό, όσο και ως προς την φαγοκυτταρική και κυτταροτοξική τους δραστηριότητα έναντι ορισμένων μικροοργανισμών και διεγείρει την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Bevilacqua et al 1987). Επίσης, διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα για την παραγωγή μορίων, που βοηθούν στην προσκόλληση ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων στο τοίχωμά τους (DeForge et al 1990).

Ο TNFα προάγει τη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων. Επίσης, διεγείρει τα Τ-λεμφοκύτταρα και αυξάνει την κυτταροτοξική τους δράση. Ακόμα, αυξάνει τον αριθμό των μακροφάγων και την παραγωγή των PAF (platelets activating factor), (DeForge et al 1990). Επιπλέον, διεγείρει την παραγωγή IL-6 (ιντερλευκίνη-6) και IF-γ (ιντερφερόνη-γ) και των αυξητικών παραγόντων, που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και της ανοσολογικής απάντησης (Jaatela 1991).

#### **1.4.2. Ο TNFα στην παθογένεια της σπειραματικής βλάβης**

Ο TNFα και γενικότερα οι κυτταροκίνες ενοχοποιούνται στην παθογένεια ή/και τη χρόνια εξέλιξη πολλών νοσημάτων, όπως στα αυτοάνοσα νοσήματα (ρευματοειδή αρθρίτιδα, νόσο Crohn κ.α.), στην καχεξία που σχετίζεται με κακοήθειες και σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, στην αντίσταση στην ινσουλίνη, στη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, την αθηροσκλήρωση και τη σπειραματική βλάβη (Papadakis and Targan 2000b).

Ειδικότερα ως προς την σπειραματική βλάβη, κλινικές και πειραματικές παρατηρήσεις παρέχουν ενδείξεις για ενεργό συμμετοχή του TNFα στην διαταραχή της λειτουργίας του σπειραματικού ηθμού και της οργάνωσης της ακτίνης, η οποία σε κλινικό επίπεδο εκδηλώνεται ως λευκωματουρία.

Οι Suranyi et al (1993) προσδιόρισαν με ανοσομέτρηση τα επίπεδα ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), ιντερλευκίνης-2 (IL-2), ιντερφερόνης-α (IFNα), ιντερφερόνης-γ (IFNγ) και του TNFα στο πλάσμα, τα ούρα και σε καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων του



αίματος ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο. Σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων, σημαντικά υψηλά επίπεδα TNFα προσδιορίστηκαν στο πλάσμα και τα ούρα ασθενών με εστιακή τμηματική σκλήρυνση και μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Η αύξηση αυτή δεν φάνηκε να σχετίζεται με το βαθμό της υπολευκωματιναιμίας και την απώλεια μυϊκής μάζας. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τους Ozen et al (1994). Τα επίπεδα TNFα στα ούρα ασθενών με μη-υπερπλαστικές νεφροπάθειες (όπως νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων, εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση ή μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα) παρουσίαζαν, σε σχέση με τους μάρτυρες, μια μέτρια αύξηση, η οποία σε υπερπλαστικές νεφροπάθειες ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Επιπλέον, σε ασθενείς με «ενεργό» νόσο και κυτταρική υπερπλασία ανευρέθη σημαντική συσχέτιση των συγκεντρώσεων TNFα στα ούρα με τον βαθμό της κλινικής δραστηριότητας. Μάλιστα, σε 2 από 4 ασθενείς με μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα η ύφεση της νόσου συνοδεύτηκε από ελάττωση των επιπέδων του TNFα στα ούρα.

Τέλος, από τους Neale et al (1995) με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και ανοσοηλεκτρομικροσκοπία, ο TNFα ανιχνεύθηκε τοπικά στα ποδοκύτταρα και στη βασική μεμβράνη του σπειράματος (και κυρίως σε ανοσοεναποθέσεις) ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, εύρημα λιγότερο συχνό σε άλλες μορφές σπειραματονεφρίτιδας.

Άλλες ενδείξεις εμπλοκής του TNFα στην σπειραματική βλάβη προέρχονται από πειραματικά δεδομένα. Η έκθεση απομονωμένων σπειραμάτων ποντικού σε TNFα αυξάνει τη διαπερατότητά τους για την αλβουμίνη. Τη μεταβολή της διαπερατότητας μπορεί να προκαλέσει TNFα τόσο σπειραματικής, όσο και εξωσπειραματικής προέλευσης και καταργείται με χορήγηση αντισωμάτων αντι-TNFα (McCarthy et al, 1998).

Σε μοριακό επίπεδο, οι διαταραχές της διαπερατότητας συνδέονται με επιδράσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Σε μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων αύξηση της διαπερατότητας συνοδεύεται από ποσοτικές αλλαγές της ακτίνης των κυττάρων, της δεξαμενής της και της de novo σύνθεσης (Stolpen et al 1986, Clark et al 1988, Goldblum et al 1989, Brett et al 1989, Goldblum and Sun 1990, Molony and Armstrong 1991, Camussi et al 1991).

Πολλοί παράγοντες, των οποίων η παραγωγή ενεργοποιείται από τον TNF $\alpha$ , διασπύν τα νημάτια της ακτίνης και αυξάνουν την διαπερατότητα του ενδοθηλίου. Προηγούμενη σταθεροποίηση της ακτίνης προστατεύει την διαπερατότητα (Shasby et al 1982). Χαρακτηριστικά ο PAF, του οποίου η ενδοθηλιακή βιοσύνθεση διεγείρεται από τον TNF $\alpha$ , αυξάνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα και προκαλεί αναδιοργάνωση της ακτίνης (Bussolino et al 1987), μια δράση η οποία παρεμποδίζεται, εάν ανασταλεί η πρωτεϊνική σύνθεση ή η σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα του.

Συμπερασματικά, το σύνολο των κλινικών και πειραματικών παρατηρήσεων παρέχει σοβαρές ενδείξεις εμπλοκής του TNF $\alpha$  στη σπειραματική βλάβη, η οποία, παρά τις ασάφειες τόσο ως προς τον μηχανισμό, όσο και ως προς το μοριακό επίπεδο δράσης του, φαίνεται να είναι σημαντική.

### **1.5. Ερευνητικά ερωτήματα**

Η διατήρηση σταθερού του σχήματος και της μορφολογίας των κυττάρων οφείλεται σε μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία, η οποία εξαρτάται από δυναμικές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των δομικών στοιχείων του κυτταροσκελετού. Επιπλέον όμως, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης λειτουργεί ως ανιχνευτής και μεταφορέας μηνυμάτων, τα οποία ρυθμίζουν και τροποποιούν πολλές φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, μια διαδικασία που συνεπάγονται ταχεία αναδιοργάνωση του πολυμερισμού των μικροϊνιδίων.

Τέτοιες μορφολογικές μεταβολές, ως απάντηση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, προκαλούνται από ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και ιόντα (Koukouritaki et al 1996, Koukouritaki et al 1997, Papakonstanti et al 1996, Papakonstanti et al 1998, Moustakas et al 1998). Οι μηχανισμοί ρύθμισης της δυναμικής ισορροπίας του κυτταροσκελετού μπορεί να περιλαμβάνουν: ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης (Kreis and Vale 1993) και των πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών (Craig and Johnson 1996, Papakonstanti et al 2000, Koukouritaki et al 1999), μεταβολές της συγκέντρωσης του cAMP (Koukouritaki et al 1996) και ενεργοποίηση των μικρών GTPασών της οικογένειας Rho (Ridley and Hall 1992, Tapon and Hall 1997, Moustakas and Stournaras 1999).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην προσκόλληση των ποδοκυττάρων στο υπόστρωμά τους (τη βασική μεμβράνη) συμμετέχουν ο κυτταροσκελετός της ακτίνης και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Gumbiner 1993, Burridge et al 1988). Οι ποδικές προσεκβολές των επιθηλιακών κυττάρων, οι οποίες εισδύουν στην βασική μεμβράνη, μαζί με τη μεμβράνη των σχισμών διήθησης και τους πόρους της, αποτελούν μέρος του φυσιολογικού φραγμού, ο οποίος παρεμποδίζει τη διέλευση μακρομορίων. Διαταραχές της σύνδεσης ποδοκυττάρων – βασικής μεμβράνης θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένη διαπερατότητα του σπειραματικού τριχοειδούς για τις πρωτεΐνες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε ορισμένες σπειραματοπάθειες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από λευκωματουρία, όπως η νόσος των ελαχίστων αλλοιώσεων, η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση και η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα. Σε αυτές τις μορφές σπειραματικής βλάβης η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκαλύπτει διαταραχές της σύνδεσης ποδοκυττάρων – βασικής μεμβράνης, οι οποίες περιγράφονται ως εξάλειψη, σύντηξη ή επιπέδωση των ποδικών προσεκβολών (Kashgarian 1997).

Η μοριακή βάση των διαταραχών της σύνδεσης ποδοκυττάρων – βασικής μεμβράνης δεν είναι γνωστή και είναι πιθανόν να αφορά σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Σχετικά πρόσφατα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις ότι κυτταροκίνες κινητοποιούν διάφορες μετά τον υποδοχέα βιοχημικές διαδικασίες, οι οποίες επηρεάζουν την δεματοποίηση του κυτταροσκελετού και την έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της σύνδεσης ποδοκυττάρων – υποστρώματος (Camussi et al 1993, Wardle 1993, Savin et al 1996).

Στις κυτταροκίνες αυτές περιλαμβάνεται και ο TNF $\alpha$  (Tabibzadeh et al 1995, Liu et al 1997), του οποίου αυξημένη σύνθεση και απελευθέρωση έχει διαπιστωθεί σε λευκωματινουργικές σπειραματοπάθειες (Neale et al 1995). Είναι, συνεπώς, πιθανόν ο TNF $\alpha$  να αποτελεί το ερέθισμα (μήνυμα), στο οποίο οφείλονται οι μορφολογικές διαταραχές των σπειραματοπαθειών αυτών.

Στην παρούσα εργασία, με μορφολογικές, βιοχημικές και μοριακές προσεγγίσεις, μελετήσαμε την επίδραση του TNF $\alpha$  στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των εστιακών συνδέσεων.

Ειδικότερα, επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε σε ποδοκύτταρα τα αποτελέσματα της δράσης του TNFα:

- Στη ρύθμιση της δυναμικής ισορροπίας του πολυμερισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της οργάνωσης των μικροϊνιδίων
- Στην ανίχνευση και ανάλυση του μοριακού μηχανισμού, ο οποίος ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού
- Στη διερεύνηση της βιολογικής σημασίας της επίδρασης του TNFα στην παθοφυσιολογία των ποδοκυττάρων.

Αναλυτικότερα μελετήθηκαν

- Οι ποσοτικές μεταβολές του πολυμερισμού – αποπολυμερισμού των μικροϊνιδίων της ακτίνης.
- Η έκφραση, ενεργοποίηση και αλληλοεπιδράσεις των πρωτεϊνών παξιλίνης, κινάσης εστιακών προσφύσεων (FAK) και βινκουλίνης
- Η ανάλυση των μεταβολών του όγκου και της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων.

Η σημασία της παρούσας διδακτικής διατριβής ευρίσκεται στην χρησιμοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν από αυτήν, στην ερμηνεία των μορφολογικών και παθοφυσιολογικών διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζουν τις σπειραματοπάθειες, με κύρια κλινική εκδήλωση τη λευκωματουρία.

## **2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Βιολογικό υλικό**

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων αρουραίου, η οποία αναπτύχθηκε από τους Drs W. Couser και K. Bomszyk και μας παραχωρήθηκε από τον Dr C. Richardson του νεφρολογικού εργαστηρίου του Medical College of Wisconsin. Η ταυτοποίησή τους ως σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων βασίζεται στην έκφραση του αντιγόνου Fx1A και της πρωτεΐνης ποδοκαλυξίνης επί της επιφάνειάς τους, όπως και από την απουσία έκφρασης του αντιγόνου Thy 1.1 (δείκτη μεσαγγειακών κυττάρων) και του παράγοντα von Willebrandt (δείκτης ενδοθηλιακών κυττάρων).

### **2.2 Μέθοδοι**

#### **2.2.1. Καλλιέργεια των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων**

Υλικά

DME low glucose: Dulbecoss Modified Eagle Medium (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Ham's F12 (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

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

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

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

ITS: insulin – transferin – selenium (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

Penicillin/Streptomycin: πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

BSA: bovine serum albumin (Sigma, MO, USA)

Collagen I: κολλαγόνο τύπου I (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

TNF $\alpha$  (R & D Systems, MN, USA)

Τρυβλία καλλιέργειας 60 mm

### **Καλλιεργητικό υλικό K1**

Το καλλιεργητικό υλικό K1 περιέχει: 47% Ham's F12, 47% DME χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, 1% Hepes, 1.5% NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% ITS, 1% L-γλουταμίνη, 1% αντιβιοτικό-αντιμυκητιασικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 100 IU/ml πενικιλίνης σε 100  $\mu$ g/ml στρεπτομυκίνης.

### **Μέθοδος**

Τα GEC καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε 37 °C και σε υγρή ατμόσφαιρα 95% αέρος και 5% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 60 mm, τα οποία είχαν επιστρωθεί με λεπτή στιβάδα κολλαγόνου τύπου I, σε καλλιεργητικό υλικό K1 εμπλουτισμένο με 2% BSA .

Το θρεπτικό υλικό των καλλιεργείων ανανεώνονταν ανά 3-4 ημέρες. Την όγδοη περίπου ημέρα και ένα 24ωρο πριν από την έναρξη των πειραμάτων, σε καλλιέργειες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας, μετά από διπλή έκπλυση, γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με υλικό K1 χωρίς ορό. Συνεπώς, όλες οι μορφολογικές και βιοχημικές αναλύσεις που ακολούθησαν έγιναν σε κύτταρα συρρέοντα και ευρισκόμενα σε φάση ηρεμίας (G<sub>0</sub>). Για τις μορφολογικές αναλύσεις, τα κύτταρα καλλιεργούνταν πάνω σε καλυπτρίδες επενδυμένες με κολλαγόνο τύπου I.

Η προσθήκη ανασυνδυασμένου TNF $\alpha$ , ανθρώπειου και αρουραίου, σε καλλιέργειες GEC γινόταν μετά διάλυση σε K1 μέσο, το οποίο περιείχε 0.1% BSA. Στις κυτταροκαλλιέργειες ελέγχου γινόταν προσθήκη μόνο K1 με 0.1% BSA. Σε προκαταρκτικά πειράματα, η βέλτιστη δόση του TNF $\alpha$ , η οποία είχε τη μέγιστη δράση στη μικροϊνιδιακή διάταξη της ακτίνης, προσδιορίστηκε στα 10 ng/ml. Η δόση αυτή χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα και οι χρόνοι επώασης (στα περισσότερα πειράματα) ήταν 2', 5', 15', 2, 4, 24 ώρες.

### **2.2.2. Προσδιορισμός επιπέδων μονομερούς (G-) και ολικής ακτίνης**

Υλικά και συσκευές

Τρυβλία καλλιέργειας 60 mm (Costar Europe LTD, The Netherlands)

Ανυδρο διβασικό φωσφορικό κάλιο:  $K_2HPO_4$  (Sigma, USA)

Φθοριούχο νάτριο (Sigma, MO, USA)

Χλωριούχο κάλιο: KCl (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

Χλωριούχο μαγνήσιο:  $MgCl_2$  (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

EGTA (Sigma, MO, USA)

DTT (Sigma, MO, USA)

Triton X – 100 (Sigma, MO, USA)

Σουκχρόζη (Sigma, MO, USA)

DNase I (Sigma, MO, USA)

DNA από σπέρμα σολωμού (Sigma, MO, USA)

Υδροχλωρική γουανιδίνη (Sigma, MO, USA)

Tris/HCl (Bio – Rad Labs, USA)

Χλωριούχο ασβέστιο:  $CaCl_2$  (Sigma, MO, USA)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merk, Germany)

Οξικό νάτριο (Merk, Germany)

ATP (Sigma, MO, USA)

PMSF (SERVA, Germany)

Καθαρή G-ακτίνη από μύες κουνελιού (Απομονώθηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με τους Faulstich et al 1984)

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Perkin – Elmer Lambda 15)

## **Διαλύματα**

### **Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων**

$K_2HPO_4$  10 mM

NaF 100 mM

KCl 50 mM

MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EGTA	1 mM
DTT	0,2 mM
Triton X – 100	0,5%
Σακχαρόζη	1 M

Ρυθμίζεται το pH σε 7,0 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C. Το DTT και το TritonX-100 προστίθενται τελευταία, την ημέρα του πειράματος. Κατά τη διάρκεια του πειράματος το διάλυμα λύσης κυττάρων διατηρείται στους 0 °C.

#### ***Διάλυμα DNase I***

DNase I	0,1 mg/ml
Tris/HCl	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,5 mM
PMSF	10 mM

Ρυθμίζεται το pH σε 7,5 και το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C για 1 εβδομάδα. Το PMSF προστίθεται τελευταίο, την ημέρα του πειράματος. Κατά τη διάρκεια του πειράματος το διάλυμα της DNase I διατηρείται στους 0 °C.

#### ***Διάλυμα DNA***

DNA	40 μg/ml
Tris/HCl	100 mM
MgSO <sub>4</sub>	4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM

Κατάλληλη ποσότητα DNA ζυγίζεται και τεμαχίζεται με ψαλίδι. Το διάλυμα αφήνεται να αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου διαλυθεί πλήρως το DNA (12-16 ώρες περίπου). Στη συνέχεια φιλτράρεται σε διηθητικό χαρτί, ρυθμίζεται το pH σε 7,5 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, το διάλυμα DNA διατηρείται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 30 °C.



### *Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης*

Υδροχλωρική γουανιδίνη	1,5 M
Οξικό νάτριο	1 M
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
ATP	1 mM
Tris/HCl	20 mM

Ρυθμίζεται το pH σε 7,5 και το διάλυμα φυλάσσεται στον πάγο, μόνο κατά τη διάρκεια του πειράματος.

### **Μέθοδος**

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μονομερούς G και ολικής T (total)-ακτίνης βασίζεται στην αναστολή από τη μονομερή ακτίνη της ενεργότητας του ενζύμου DNase I να αποδομεί το DNA και καθιερώθηκε το 1978 από τους Blikstad et al. Έτσι, όταν ένα κυτταρικό εκχύλισμα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα μονομερούς ακτίνης από ένα άλλο, τότε η αναστολή της ενεργότητας της DNase I θα είναι μεγαλύτερη άρα και το τεμαχισμένο DNA και επομένως οι ελεύθερες βάσεις θα είναι λιγότερες, με αποτέλεσμα η οπτική πυκνότητα του δείγματος αυτού να είναι μικρότερη και αντίστροφα. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: μετά τη λύση των κυττάρων με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, δείγμα (10 μl) του προϊόντος κυτταρόλυσης προστίθεται ταχύτατα σε μείγμα που περιέχει 10 μl διαλύματος DNase I και 1 ml διαλύματος DNA. Η ενεργότητα του ενζύμου καταγράφεται συνεχώς στα 260 nm (μήκος κύματος που απορροφούν οι ελεύθερες βάσεις του DNA) έως ότου η ελευθέρωση των βάσεων να είναι σταθερή με το χρόνο.

Η αναστολή της ενεργότητας της DNase I του κυτταρικού δείγματος υπολογίζεται ως προς ένα δείγμα μάρτυρα (το οποίο μετράται με τον ίδιο τρόπο σε τακτά χρονικά διαστήματα) που δεν περιέχει κυτταρικό εκχύλισμα και έτσι θεωρείται ότι η ενεργότητα του ενζύμου σε αυτό είναι 100%. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μονομερούς ακτίνης κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβανόταν από την μέτρηση δειγμάτων γνωστών ποσοτήτων ακτίνης. Στην καμπύλη αυτή τοποθετείται στον άξονα x η ποσότητα των γνωστών δειγμάτων της ακτίνης σε μg και στον άξονα y η αναστολή της ενεργότητας της DNase I που λαμβάνονταν από τη

μέτρηση κάθε δείγματος. Η σχέση που προκύπτει είναι γραμμική για το εύρος 25%-70% της ενεργότητας της DNase I και οι τιμές των δειγμάτων μας ρυθμίζονται ώστε να βρίσκονται κάθε φορά στο τμήμα της καμπύλης από 30% έως 60%.

Για τον προσδιορισμό της ολικής ακτίνης, δείγμα κυτταροδιαλύματος αραιώθηκε 2-3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και στη συνέχεια επώασθηκε για 10 λεπτά με ίσο όγκο διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης, ώστε να προκληθεί αποπολυμερισμός της πολυμερούς F-ακτίνης σε μονομερή ακτίνη. Η ολική ακτίνη προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω, ενώ η ενδοκυττάρια ποσότητα της πολυμερούς ακτίνης υπολογίζεται από τη διαφορά μεταξύ ολικής και μονομερούς ακτίνης.

Τόσο το ποσοστό της μονομερούς όσο και της πολυμερούς ακτίνης συσχετίζεται με το ποσό των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών και εκφράζεται τελικά σε  $\mu\text{g}$  ακτίνης /  $\text{mg}$  ολικής πρωτεΐνης.

### **2.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών**

#### **Υλικά και συσκευές**

Bio-Rad DC (Detergent – Compatible, Bio-Rad Labs, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός: BSA (Sigma, MO, USA)

Φωτόμετρο (Perkin – Elmer)

#### **Μέθοδος**

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

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

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

#### **2.2.4. Άμεσος ανοσοφθορισμός**

##### **Υλικά**

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

Καλυπτρίδες 22 x 22 mm

Κολλαγόνο τύπου I: Collagen Type I (GIBCO –BRL Co, MD, USA)

Ροδαμίνη – Φαλλοϊδίνη: Rhodamin – Phalloidin (Molecular Probes Inc, USA)

Φορμαλδεΰδη 3,7% (Merck, Germany)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών – φυσιολογικού ορού (PBS)

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

Ακετόνη (Riedel de Haen, Germany)

Γλυκερόλη (Merck, Germany)

##### **Μέθοδος**

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός με χρήση ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης είναι μια τεχνική που μπορεί να εφαρμοσθεί για την παρατήρηση μόνο της πολυμερούς ακτίνης, εξαιτίας της ειδικής σύνδεσης της φαλλοϊδίνης με αυτήν, ενώ η ροδαμίνη είναι η φθορίζουσα ουσία.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Έκπλυση των κυττάρων μία φορά με PBS στο οποίο έχει προστεθεί 1,5% FBS (PBS – 1,5% FBS) για 3 λεπτά (Η προσθήκη του FBS γίνεται για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων).
2. Μονιμοποίηση των κυττάρων με 2 ml διαλύματος φορμαλδεΰδης 3,7% σε PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
3. Έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS – 1,5% FBS για 3 λεπτά κάθε φορά.
4. Επίδραση ψυχρής (-20 °C) ακετόνης για 4 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ανάδευση με σκοπό, η κυτταρική μεμβράνη να γίνει διαπερατή στη ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη.

5. Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS 1,5% FBS για 3 λεπτά κάθε φορά
6. Επώαση των κυττάρων με διάλυμα ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης αραιωμένη (2 μl + 98 μl PBS – 1,5% FBS) 2% για 40 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χώρο υγρό και σκοτεινό.
7. Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS – 1,5% FBS για 3 λεπτά κάθε φορά.
8. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες έχουν τοποθετηθεί 20 μl διαλύματος γλυκερόλης 50% σε PBS. Τα μικροϊνίδια της ακτίνης παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (Leitz Dialux 2 OEB) εφοδιασμένο με φακούς μεγέθυνσης 40 x και 100 x, συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας και κάμερα 35 mm. Για τη φωτογράφιση χρησιμοποιήθηκαν φιλμ Kodak 3200 ASA.

#### **2.2.5. Ανοσοφθορισμός για την παρατήρηση των μικροϊνιδίων της ακτίνης με μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal)**

##### **Υλικά**

PIPES (Merk, Germany)

EGTA (Sigma, USA)

Χλωριούχο μαγνήσιο ένυδρο: MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O (Merk, Germany)

Φορμαλδεΰδη 37% (Merk, Germany)

Γλουταραλδεΰδη (Merk, Germany)

Triton X – 100 (Sigma, USA)

Βοροϋδρίδιο του νατρίου: NaBH<sub>4</sub> (Sigma, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός: BSA (Sigma USA)

Χλωριούχο αμμώνιο NH<sub>4</sub>Cl (Merk, Germany)

Vectashield

Γλυκερόλη (Merk, Germany)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών – φυσιολογικού ορού (PBS)

## **Διαλύματα**

### ***Ρυθμιστικό διάλυμα PEM***

PIPES	100 mM
EGTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM

Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

### ***Διάλυμα E***

50% Vectashield 50% γλυκερίνη /1x PBS (pH: 8,9)

## **Μέθοδος**

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίζεται στην ίδια αρχή με αυτή του άμεσου ανοσοφθορισμού, με μόνη διαφορά, τη χρήση μικροσκοπίου συνεστίασης (Confocal) με το οποίο είναι δυνατή η παρατήρηση των πρωτεϊνικών δομών σε διαφορετικά επίπεδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρακολούθηση μεταβολών της οργάνωσης και της κατάστασης πολυμερισμού των πρωτεϊνών σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Η όλη διαδικασία αποτελείται από τα επόμενα στάδια:

### ***Μονιμοποίηση***

- Έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PEM για 3 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα που αποτελείται από 3,7% Φορμαλδεΰδη/0,02%, γλουταραλδεΰδη/0,2% Triton X – 100 σε PEM για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS (pH 7,4) για 3 λεπτά κάθε φορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Αναγωγή με διάλυμα 0,1% NaBH<sub>4</sub> σε PBS (pH 8,0). Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται δύο φορές για 10 λεπτά κάθε φορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS (pH 7,4) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### ***Σύνδεση ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης***

- Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με 0,5% BSA σε PBS (pH 7,4) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Επώαση των κυττάρων με διάλυμα ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης αραιωμένο (1:8 v/v) σε PBS – 0,5% BSA για 40 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χώρο υγρό και σκοτεινό.
- Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS (pH 7,4) για 3 λεπτά κάθε φορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### ***Μεταμονιμοποίηση***

- Επώαση των κυττάρων σε διάλυμα 3,7% φορμαλδεΰδης σε PBS (pH 7,4) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα NH<sub>4</sub>Cl (50 mM σε PBS pH 7,4) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS (pH 7,4) για 3 λεπτά κάθε φορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### ***Τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο***

- Αρχικά επάνω στην αντικειμενοφόρο τοποθετούνται παράλληλα δύο ταινίες διαχωρισμού (spacers) στο κέντρο των οποίων βρίσκονται 20 μl διαλύματος E. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάστροφα επάνω στις άκρες των spacers αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων. Τα δείγματα φυλάσσονται στους – 20 °C.

### ***Παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο συνεστίασης***

- Απόκτηση των απεικονίσεων συνεστίασης (confocal images) με χρησιμοποίηση ενός εμβαπτιζόμενου σε έλαιο φακού 63/1.25 και κατάλληλου λογισμικού (software) (CLMS).
- Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με κατάλληλο λογισμικό (AVS) (Sheehan et al 1996) running on a Silicon Graphics Indigo 2 workstation.
- Βελτιστοποίηση των εικόνων φθορισμού σε φωτεινότητα και αντίθεση, μεταφορά τους σε προσωπικό υπολογιστή και εκτύπωσή τους σε laser (Lexmark Optra C laser printer) χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό (Corel Photo Paint 5.0 software)

## **2.2.6. Διπλός ανοσοφθορισμός για την παρατήρηση των μικροϊνιδίων της ακτίνης και της βινκουλίνης**

### **Υλικά**

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

Καλυπτρίδες 22 x 22 mm

Κολλαγόνο τύπου I: Collagen type I (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της βινκουλίνης (Sigma, USA)

Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος, σημασμένων με φλουορεσκίνη (FITC) από ορό αίγας (Molecular Probes Inc, USA)

Ροδαμίνη – Φαλλοϊδίνη: Rhodamin – Phalloidin (Molecular Probes Inc, USA)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών – φυσιολογικού ορού (PBS)

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

Ακετόνη

Μεθανόλη

Γλυκερόλη

### **Μέθοδος**

Οι βασικές αρχές της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι παρόμοιες με αυτές του Western Blot: οι πρωτεΐνες αναγνωρίζονται στα κύτταρα από τα αντίστοιχα αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από τις αντίστοιχες ανοσοσφαιρίνες προσημασμένες με κάποια φθορίζουσα ουσία, όπως είναι η φλουορεσκίνη (FITC).

Το σύμπλοκο πλέον πρωτεΐνη – αντίσωμα – ανοσοσφαιρίνη-φθορίζουσα ουσία, μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στο υπεριώδες, εκπέμπει μέσω της φθορίζουσας ουσίας σε άλλο μήκος κύματος στο ορατό. Η διαδικασία αποτελείται από τα επόμενα στάδια:

1. Επώαση των κυττάρων με 2 ml διαλύματος ακετόνη: μεθανόλη (9:1) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με σκοπό η κυτταρική μεμβράνη να γίνει

διαπερατή στο αντίσωμα κατά της βινκουλίνης και να μονιμοποιηθούν οι κυτταρικές δομές.

2. Έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS – 1,5% FBS για 3 λεπτά κάθε φορά.
3. Επώαση των κυττάρων με 50 μl αραιωμένου (1:100 v/v) σε PBS – 1,5% FBS αντισώματος κατά της βινκουλίνης, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Έκπλυση των κυττάρων 4 φορές με PBS – 1,5% FBS για 3 λεπτά κάθε φορά.
5. Επώαση των κυττάρων με 50 μl αραιωμένου (1:50 v/v) σε PBS – 1,5% FBS αντισώματος κατά ανοσοσφαιρινών σημασμένων με φλουορεσκίνη, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS – 1,5% FBS διάρκειας 3 λεπτών.
7. Επώαση των κυττάρων με διάλυμα ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης αραιωμένο (2% 2:98 v/v) σε PBS – 1,5% FBS, για 40 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χώρο υγρό και σκοτεινό.
8. Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS – 1,5% FBS για 3 λεπτά κάθε φορά.
9. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες έχουν τοποθετηθεί 20 μl γλυκερόλης 50% σε PBS. Τα μικροϊνίδια ακτίνης και βινκουλίνης παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (Leitz Dialux 2 OEB) εφοδιασμένο με φακούς μεγέθυνσης 40 x και 100 x, συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας και κάμερα 35 mm. Για τη φωτογράφιση χρησιμοποιήθηκαν φιλμ Kodak 3200 ASA.

#### **2.2.7. Διπλός ανοσοφθορισμός με αντισώματα κατά της βινκουλίνης και ταλίνης.**

Όπως και στο 2.2.6.

#### **2.2.8. Φθοριομετρικός προσδιορισμός της πολυμερούς F – ακτίνης**

##### **Υλικά και συσκευές**

Τρυβλία καλλιέργειας 24 οπών (Costar Europe LTD, The Netherlands)

Ροδαμίνη – Φαλλοϊδίνη: Rhodamine – Phalloidin (Molecular Probes Inc., USA)

Φορμαλδεΰδη 37% (Merk, Germany)



Triton X – 100 (Sigma, USA)

Καυστικό νάτριο: NaOH (Merk, Germany)

PBS: Διάλυμα φωσφορικών – φυσιολογικού ορού

Φθοριόμετρο Perkin – Elmer

### **Διαλύματα**

#### ***Διάλυμα φωσφορικών – φυσιολογικού ορού (PBS)***

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

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

NaCl                             100 mM

Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### ***Διάλυμα ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης: 1,5 μM σε PBS***

Η ροδαμίνη – φαλλοϊδίνη διαλύεται αρχικά σε μεθανόλη ώστε να προκύψει ένα συγκεντρωμένο διάλυμα το οποίο φυλάσσεται στους –20 °C. Στη συνέχεια λαμβάνεται τέτοια ποσότητα ώστε στο τελικό διάλυμα να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 1,5 μM και ξηραίνεται (για την απομάκρυνση της μεθανόλης) με τη βοήθεια αερίου αζώτου.

### **Μέθοδος**

Η μέθοδος φθοριομετρικού προσδιορισμού της πολυμερούς ακτίνης με χρήση της ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης, βασίζεται στην ειδική σύνδεση της φαλλοϊδίνης με τα μικροϊνίδια της ακτίνης (Faulstich et al 1983) με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης. Ο φθορισμός της ροδαμίνης αυξάνεται κατά 9 φορές με τη σύνδεση της ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης με την πολυμερή ακτίνη και το φαινόμενο ολοκληρώνεται σε 20 μόλις λεπτά (Huang et al 1992). Όταν η συγκέντρωση της ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης είναι σημαντικώς μεγαλύτερη από τη σταθερά αποσύνδεσής της ( $4 \times 10^{-8}$  M) για την ακτίνη, η αύξηση του φθορισμού συσχετίζεται γραμμικά με τη συνδεδεμένη ακτίνη και επομένως, περισσότερο πολυμερισμένη ακτίνη μεταφράζεται σε μεγαλύτερες τιμές φθορισμού. Η μέθοδος πρωτοεφαρμόσθηκε από τους Wu et al 1992 και Cable et al 1995 και περιλαμβάνει τα παρακάτω:

1. Μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη 0,3 ml διαλύματος Φορμαλδεΐδη 3,7% σε PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  2. Απομάκρυνση του παραπάνω διαλύματος και προσθήκη 0,3 ml διαλύματος Triton X – 100 0,2% σε PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό τη δημιουργία περατής μεμβράνης.
  3. Απομάκρυνση του προηγούμενου διαλύματος και προσθήκη 0,5 ml διαλύματος ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό χώρο.
  4. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος της ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης, το οποίο περιέχει πλέον τη μη συνδεδεμένη ροδαμίνη – φαλλοϊδίνη, γίνεται έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με 1 ml κάθε φορά διαλύματος PBS.
  5. Λύση των κυττάρων με 0,5 ml διαλύματος NaOH 0,1 N και μηχανική απόξυση τους από το τρυβλίο καλλιέργειας.
  6. Μέτρηση του φθορισμού κάθε δείγματος στο φθοριόμετρο, χρησιμοποιώντας ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 550 nm και 580 nm αντίστοιχα.
- Οι τιμές εκφράζονται ως αυθαίρετες μονάδες φθορισμού.

## **2.2.9. Western blot ανάλυση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών**

### **2.2.9.1. Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων**

#### **Υλικά και συσκευές**

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

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-φυσιολογικού ορού (PBS)

Hepes (Sigma, MO, USA)

Χλωριούχο νάτριο: NaCl (Merck, Germany)

Χλωριούχο μαγνήσιο: MgCl<sub>2</sub> (GIBCO-BRL, MD, USA)

EGTA (Sigma, MO, USA)

Γλυκερόλη: Glycerol (Merck, Germany)

TritonX-100 (Sigma, MO, USA)

PMSF (SERVA, Germany)

Leupeptin (Sigma, MO, USA)

Aprotinin (Sigma, MO, USA)

Συσκευή υπερήχων

### **Διαλύματα**

#### ***Διάλυμα λύσης με TritonX-100***

Hepes, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
EDTA	1 mM
Γλυκερόλη	10%
TritonX-100	1%
Aprotinin	1 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
PMSF	1 mM

### **Μέθοδος**

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Έκπλυση των κυττάρων με κρύο PBS, δύο φορές για 5 λεπτά κάθε φορά, στους 0 °C.
2. Λύση των κυττάρων με 1,0ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης στους 0 °C.
3. Μηχανική απόξυση των κυττάρων από τις φιάλες καλλιέργειας χρησιμοποιώντας κυτταρικούς "ξύστες" (cell scrapers) και μεταφορά του προϊόντος κυτταρόλυσης σε πλαστικό σωλήνα (ependorf).
4. Περαιτέρω λύση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε συσκευή υπερήχων (sonication), στους 0 °C, 3 φορές για 10 δευτερόλεπτα κάθε φορά.
5. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στην παράγραφο 2.5.

Η μετέπειτα προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση περιγράφεται παρακάτω.

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

### **Υλικά και συσκευές**

Ακρυλαμίδιο (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

N, N'-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο: Bis-Ακρυλαμίδιο (GIBCO – BRL Co, MD, USA)

SDS (Bio – Rad Labs, USA)

Tris-HCl (Bio – Rad Labs, USA)

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

TEMED (Sigma, USA)

$\beta$  – μερκαπτοαιθανόλη (Sigma, USA)

DTT (Sigma, USA)

Γλυκερόλη (Merk, Germany)

Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA)

Γλυκίνη (Bio-Rad Labs, USA)

Protein markers (Bio-Rad Labs, USA)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (LKB, Bromma, Sweden)

### **Διαλύματα**

#### ***Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%***

Ακρυλαμίδιο 29,2% (w/v)

Bis-ακρυλαμίδιο 0,8% (w/v)

Το διάλυμα φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,45 ή 0,20  $\mu\text{m}$  και φυλάσσεται στους 4 °C.

#### ***Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού***

Tris HCl 1,5 M

SDS 0,4% (w/v)

Το pH ρυθμίζεται σε 8,8 και το διάλυμα αφήνεται να αναδευτεί για 1 ώρα επιπλέον. Μετά την ανάδευση επαναλαμβάνεται η μέτρηση του pH και, αν είναι διαφορετική,

διορθώνεται με διάλυμα HCl (ποτέ με NaOH). Το διάλυμα στη συνέχεια φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm και φυλάσσεται στους 4 °C.

#### ***Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης***

Tris HCl	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 και το διάλυμα αφήνεται να αναδευτεί για 1 ώρα επιπλέον. Μετά την ανάδευση επαναλαμβάνεται η μέτρηση του pH και, αν είναι διαφορετική, διορθώνεται με διάλυμα HCl (ποτέ με NaOH). Το διάλυμα στη συνέχεια φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm και φυλάσσεται στους 4 °C.

#### ***Συγκεντρωμένο διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS)***

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

Παρασκευάζονται 10 ml διαλύματος το οποίο διατηρείται στους 4 °C για μια εβδομάδα.

#### ***Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2 x (sample buffer 2 x)***

Tris HCl	0,125 M
SDS	4% (w/v)
β – μερκαπτοαιθανόλη	4% (w/v)
Γλυκερόλη	10% (v/v)
Κυανού της βρωμοφαινόλης	0,02% (w/v)

Εναλλακτικά η β – μερκαπτοαιθανόλη είναι δυνατό να αντικατασταθεί με DTT τελικής συγκέντρωσης 100 mM, το οποίο όμως προστίθεται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος. Για την παρασκευή διαλύματος 1 x ή 4 x ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, οι ποσότητες των συστατικών του, διαφοροποιούνται ανάλογα. Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 πριν από την προσθήκη του κυανού της βρωμοφαινόλης και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

### ***Πήκτωμα διαχωρισμού (8% ακρυλαμίδα, 30 ml)***

Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%	8,0 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού	7,5 ml
Δισαπεσταγμένο νερό	14,5 ml
10% APS	300 μl
TEMED	15 μl

### ***Πήκτωμα επιστοιβαξης (10 ml)***

Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%	1,5 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβαξης	1,5 ml
Δισαπεσταγμένο νερό	6,0 ml
10% APS	100 μl
TEMED	10 μl

### ***Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10 x (1 λίτρο)***

Tris HCl	30,3 g
Γλυκίνη	144,2 g
SDS	10 g

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι χωρίς διόρθωση περίπου 8,3. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Μέθοδος**

Στη SDS – ηλεκτροφόρηση σαν αποδιατακτικός παράγοντας χρησιμοποιείται το ανιοντικό απορρυπαντικό SDS.

Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται, ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος, με SDS σε καθορισμένα ποσά κατά βάρος (14 g SDS/g πρωτεΐνης), σχηματίζοντας επιμήκη σύμπλοκα με καθορισμένη δευτεροταγή δομή. Η δέσμευση είναι υδρόφοβη, ανεξάρτητη από την ιονική ισχύ και προσδίδει στα μόρια αρνητικό φορτίο.

Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού μήκους, η ηλεκτροφοριστική

κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι συνάρτηση κυρίως του μοριακού τους βάρους.

### ***Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδης***

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη μέθοδο του Laemmli (1970), με διαφορά στη χρήση επίπεδου (16 cm x 18 cm x 1,5 mm) αντί κυλινδρικού πηκτώματος. Μετά τη συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης, προστίθεται πρώτα το διάλυμα διαχωρισμού σε ύψος 11 cm περίπου από τη βάση της συσκευής. Όταν έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (η πηκτή έχει πήξει), προστίθεται το διάλυμα επιστοίβαξης μέσα στο οποίο τοποθετείται το «κτένι» για το σχηματισμό των θέσεων (πηγάδια) όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα των πρωτεϊνών.

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

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

Τα δείγματα τα οποία πρόκειται να τοποθετηθούν στην πηκτή πολυακρυλαμίδης απομονώνονται από τα κύτταρα σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω.

Στη συνέχεια, προστίθεται σε αυτά ίσος όγκος διαλύματος μετουσίωσης 2 x (ή ¼ του τελικού όγκου διάλυμα μετουσίωσης 4 x) και θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται διατηρώντας μόνο την πρωτοταγή τους δομή.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή και του διαλύματος ηλεκτροφόρησης στη συσκευή (περίπου 2,5 λίτρα) εφαρμόζεται σταθερή τάση 150 V έως ότου τα δείγματα να εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, οπότε και εφαρμόζεται τάση 280 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 3 ώρες περίπου.

### **2.2.9.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης**

#### **Υλικά και συσκευές**

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham, USA)

Χαρτί Whatman 3MM (Amersham, USA)

Μεθανόλη (Riedel de Haën, Germany)

Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, Sweden)

#### **Διαλύματα**

##### ***Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών***

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x 500 ml

Μεθανόλη (Riedel de Haen, Germany) 1000 ml

Προστίθεται νερό μέχρι 5 λίτρα

#### **Μέθοδος**

Η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, επιτελείται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και με την βοήθεια κατασκευής που έχει τη μορφή «σάντουιτς». Συγκεκριμένα, επάνω στο σφουγγάρι της συσκευής τοποθετείται ένα χαρτί Whatman 3 MM, επάνω από αυτό η πηκτή και στη συνέχεια η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (ιδίων διαστάσεων με την πηκτή). Ακολουθεί τοποθέτηση ενός επιπλέον φύλλου Whatman 3 MM και του δευτέρου σφουγγαριού. Πριν τη δημιουργία της κατασκευής όλα τα υλικά έχουν διαβραχεί με το διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών, το οποίο είναι τοποθετημένο μέσα στη συσκευή. Το «σάντουιτς» στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή με το πήκτωμα προς την κάθοδο και η μεταφορά επιτελείται στους 4°C για 1,5 ώρες.



#### **2.2.9.4. Υβριδοποίηση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης και ανίχνευσή τους με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL (Enhanced Chemminescence)**

##### **Υλικά και συσκευές**

Tris HCl (Bio-Rad Labs, USA)

NaCl (Merk, Germany)

Tween-20 (Merk, Germany)

Ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά των πρωτεϊνών:

- Ακτίνης επίμυος (Amersham, USA)
- Παξιλλίνης (Transduction Laboratories, NM, USA)
- FAK (Upstate Biotechnology, NY, USA).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κατά πρωτεΐνης Rho-B (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Vinculin και της Talin (Sigma, USA, St Louis MO)
- Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοφαιρινών (IgG) επίμυος και κουνελιού (ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα) προσημασμένο με το ένζυμο υπεροξυδάση. (Amersham Corp. USA)
- Φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας ECL (Amersham Corp. USA)
- Κασέτα εμφάνισης φιλμ (Amersham Corp. USA)
- Αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL (Amersham Corp. USA)
- P.C. based Image Analysis (Image Analysis Inc. Canada)
- Stripping solution (Chemicon, USA)

##### **Διαλύματα**

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

Tris HCl      20 mM

NaCl          137 mM

Tween-20 0,1% ή 0,05% (v/v)

Ρυθμίζεται το pH σε 7,6 και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **Διάλυμα «αφαίρεσης» (stripping solution)**

β-μερκαπτοαιθανόλη 100 mM

Tris HCl 62,5 mM

SDS 2%

Ρυθμίζεται το pH σε 6,7 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

#### **Μέθοδος**

Η διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Επώαση της μεμβράνης με TBS-T στο οποίο έχει προστεθεί 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά, με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Η επώαση διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη τη νύχτα στους 4 °C, υπό ανάδευση.
2. Έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T, 1 φορά για 15 λεπτά και 2 φορές για 5 λεπτά.
3. Επώαση, υπό ανάδευση, με το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης-στόχου, το οποίο έχει διαλυθεί σε TBS-T με ή χωρίς 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά. Ο χρόνος επώασης καθορίζεται από την εταιρεία προέλευσής του ή από βιβλιογραφικά δεδομένα ή ακόμα και μετά από δοκιμαστικά πειράματα.
4. Έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T, 1 φορά για 15 λεπτά και 2 φορές για 5 λεπτά.
5. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (που θα πρέπει να είναι συμβατό με το πρώτο), το οποίο έχει διαλυθεί σε TBS-T με ή χωρίς 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά. Ο χρόνος επώασης καθορίζεται από την εταιρεία προέλευσής του ή από βιβλιογραφικά δεδομένα ή ακόμα και μετά από δοκιμαστικά πειράματα.
6. Έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T, 1 φορά για 15 λεπτά και 4 φορές για 5 λεπτά.
7. Επώαση της μεμβράνης για 1 έως 3 λεπτά με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL.
8. Έκθεση σε φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας ECL για διάφορα χρονικά διαστήματα και επανάληψη της διαδικασίας που περιγράφεται παραπάνω.

Συγκεκριμένα, οι συνθήκες επώασης της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με τα διάφορα αντισώματα είναι οι ακόλουθες:

- Για το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ακτίνης, η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,1% Tween-20) και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1:400. Η επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος προσημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 1 ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,1% Tween-20) και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1:10000.
- Για το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της FAK η επώαση γίνεται στους 4°C για μια νύχτα υπό ανάδευση και με συγκέντρωση αντισώματος 1 μg/ml. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,1% Tween-20). Η επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 90 λεπτά. Το δεύτερο αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,1% Tween-20) και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1:5000.
- Για το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της παξιλλίνης η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα υπό ανάδευση και με συγκέντρωση αντισώματος 1:4000. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,1% Tween-20) στο οποίο έχει προστεθεί 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά. Η επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) επίμυος συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 1 ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,1 % Tween-20) στο οποίο έχει προστεθεί 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1:2500.
- Για το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της Rho-B η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα υπό ανάδευση και με συγκέντρωση αντισώματος 1 μg/ml. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,05% Tween-20) στο οποίο έχει προστεθεί 5% ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά. Η επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) κουνελιού συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 1 ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι διαλυμένο σε TBS-T (0,05% Tween-20) στο οποίο έχει

προσθεθεί 5% ξηρό γάλα και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1 :2000.

Στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες επιβάλλεται η ανίχνευση διαφορετικών πρωτεϊνών πάνω στην ίδια μεμβράνη, πραγματοποιείται απομάκρυνση των αντισωμάτων με επώαση της μεμβράνης με διάλυμα "αφαίρεσης" (stripping solution) στους 50 °C για 30 λεπτά, υπό ανάδευση. Μετά από έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T (2 φορές για 10 λεπτά η κάθε μία) ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό ένα ειδικό αντιδραστήριο (Chemicon) που επιτρέπει την απομάκρυνση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη σε πιο ήπιες συνθήκες (επώαση με το αντιδραστήριο για 10 έως 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου).

## **2.2.10. Ανάλυση πρωτεϊνών φωσφορυλιωμένων σε κατάλοιπα τυροσίνης, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης**

### **2.2.10.1 Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων**

#### **Υλικά και συσκευές**

Φιάλες καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup> (Costar Europe LTD, The Netherlands) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-φυσιολογικού ορού (PBS)

Hepes (Sigma, MO, USA)

Χλωριούχο νάτριο: NaCl (Merck, Germany)

Χλωριούχο μαγνήσιο: MgCl<sub>2</sub> (GIBCO-BRL, MD, USA)

EGTA (Sigma, MO, USA)

Γλυκερόλη: Glycerol (Merck, Germany)

TritonX-100 (Sigma, MO, USA)

PMSF (SERVA, Germany)

Leupeptin (Sigma, MO, USA)

Aprotinin (Sigma, MO, USA)

Ορθοβαναδικό νάτριο: Sodium orthovanadate, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma, MO, USA) Ψυχόμενη φυγόκεντρος

## Διαλύματα

### Διάλυμα εκχύλισης με TritonX-100

Hepes, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
EDTA	1 mM
Γλυκερόλη	10%
TritonX-100	1%
Aprotinin	1 μg/ml
Leupeptin	1 μg/ml
PMSF	1 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	200 μM

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τις φιάλες καλλιέργειας και έκπλυση των κυττάρων με κρύο PBS, δύο φορές για 5 λεπτά κάθε φορά, στους 0 °C.
2. Επώση των κυττάρων με 1000 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης για 5 λεπτά στους 0 °C.
3. Μηχανική απόξυση των κυττάρων από τις φιάλες καλλιέργειας χρησιμοποιώντας κυτταρικούς "ξύστες" (cell scrapers) και μεταφορά του προϊόντος κυτταρόλυσης σε πλαστικό σωλήνα (ependorf).
4. Περαιτέρω λύση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με ανάδευσή τους για 30 λεπτά στους 4 °C.
5. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε 14000 x g, στους 4 °C, για την απομάκρυνση στερεών υπολειμμάτων (πιθανόν πυρηνικά συστατικά ή μεμβράνες).
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα.
7. Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.8. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (500 μg) από κάθε κλάσμα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για ανοσοκατακρήμιση.

## **2.2.10.2. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών**

### **Υλικά**

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά των FAK, παξιλλίνης (PAX) και βινκουλίνης (Vinculin) (Upstate Biotechnology Inc., NY, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά φωσφορυλιωμένων σε τυροσίνη πρωτεϊνών (Upstate Biotechnology Inc., NY, USA)

Σεφαρόζη συνδεδεμένη με πρωτεΐνη G (Sigma, MO, USA)

### **Διαλύματα**

#### ***Διάλυμα 50% σεφαρόζης συνδεδεμένης με πρωτεΐνη G***

Μεταφέρεται μια ποσότητα σεφαρόζης συνδεδεμένης με πρωτεΐνη G σε καθαρό σωλήνα και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 7000 x g στους 4 °C. Στη συνέχεια, αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, ακολουθεί έκπλυση των σφαιριδίων σεφαρόζης με κρύο διάλυμα εκχύλισης ή PBS, 3 φορές για 3 λεπτά κάθε φορά. Η έκπλυση γίνεται με φυγοκέντρηση σε 14000 x g στους 4 °C. Ακολουθεί επαναδιάλυση των σφαιριδίων σεφαρόζης με ίσο όγκο διαλύματος εκχύλισης.

#### ***Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2X (Sample buffer 2X)***

Tris-HCl	0.125 M
SDS	4% (w/v)
β-μερκαπτοαιθανόλη	4% (w/v)
Γλυκερόλη	10% (w/v)
Κυανούν της βρωμοφαινόλης	0.02% (w/v)

Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 πριν από την προσθήκη του κυανού της βρωμοφαινόλης και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

### **Μέθοδος**

Η μέθοδος διαχωρισμού με ανοσοκατακρήμνιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από το κυτταρικό εκχύλισμα βασίζεται: α) στη σύνδεση του αντισώματος με την πρωτεΐνη-

στόχο και β) στη σύνδεση της πρωτεΐνης G, που είναι ήδη συνδεδεμένη με σεφαρόζη, με το αντίσωμα. Η πρωτεΐνη G είναι εύκολο να διαχωριστεί με φυγοκέντρηση λόγω της σημαντικής διαφοράς βάρους της σεφαρόζης από τις πρωτεΐνες. Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Επώαση του κυτταρικού εκχυλίσματος με το αντίστοιχο αντίσωμα (4 μg αντισώματος για 500 μg κυτταρικών πρωτεϊνών), όλη νύχτα υπό ήπια ανάδευση στους 4 °C.
2. Προσθήκη 100 μl διαλύματος (50%) σεφαρόζης συνδεδεμένης με πρωτεΐνη G και επώαση υπό ήπια ανάδευση για 2 ώρες στους 4 °C.
3. Συλλογή των σφαιριδίων σεφαρόζης με φυγοκέντρηση σε 14000 x g για 5 δευτερόλεπτα.
4. Έκπλυση των σφαιριδίων σεφαρόζης με κρύο διάλυμα εκχύλισης ή PBS, με φυγοκέντρηση σε 14000 x g, 3 φορές για 3 λεπτά η κάθε φορά.
5. Προσθήκη 40 μl διαλύματος μετουσίωσης πρωτεϊνών 2x και βρασμός στους 95 °C για 10 λεπτά.
6. Απομάκρυνση των σφαιριδίων σεφαρόζης με φυγοκέντρηση σε 14000 x g για 5 δευτερόλεπτα και συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο αφού επαναθερμανθεί στους 95 °C για 5 λεπτά θα χρησιμοποιηθεί σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης

### **2.2.10.3. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων**

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι ακριβώς εκείνη που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.9.2.

### **2.2.10.4. Western blot ανάλυση των δειγμάτων**

#### **Υλικά και συσκευές**

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της FAK (Upstate Biotechnology Inc., NY, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της PAX επίμυος (Transduction Laboratories, NM, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της βινκουλίνης (Vinculin) (Upstate Biotechnology Inc., NY, USA)

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

Ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS T (παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.Δ)

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

Κασέτα εμφάνισης φιλμ (Amersham Corp., USA)

Αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL (Amersham Corp., USA)

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

### **Μέθοδος**

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι ακριβώς εκείνη που περιγράφεται στην παράγραφο 2.8. (Δ). Οι συνθήκες επώασης της μεμβράνης με τα αντισώματα κατά των πρωτεϊνών FAK, παξιλλίνης (PAX) και βινκουλίνης (Vinculin) περιγράφονται επίσης στην ίδια παράγραφο.

### **2.2.11. Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης**

#### **Υλικά και συσκευές**

Μεθυλ- $H^3$ -θυμιδίνη (ειδ. δραστ. 20 Ci/mmol) (Amersham, USA)

Συσκευή μεταφοράς κυττάρων επωασμένων με ραδιοσημασμένη θυμιδίνη σε χάρτινο φίλτρο: minimach 2000 (Westart, England)

Scintillation fluid: υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)

Μετρητής (υγρός σπινθηριστής) β-ακτινοβολίας (Packard, USA)

### **Μέθοδος**

Η διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλία των 60 mm τα οποία έχουν επιστρωθεί με κολλαγόνο τύπου I.
2. Αντικατάσταση θρεπτικού υλικού με θρεπτικό χωρίς FCS 24 ώρες πριν το πείραμα.



3. Ένα 24h πριν το πείραμα, τα κύτταρα εκθέτονται σε TNF $\alpha$  10 ng/ml και τριτιωμένη θυμιδίνη 1 Ci/τροβλία.
4. Ξύσιμο των κυττάρων με ξέστρο και λήψη του κυτταροδιαλύματος.
5. Φυγοκέντρηση του κυτταροδιαλύματος για 10 λεπτά σε 1500 rpm.
6. Το κυτταρικό ίζημα διατηρείται σε πάγο και επαναδιαλύεται σε 300  $\mu$ l ενέσιμο νερό.
7. Λύση των κυττάρων με συσκευή υπερήχων (Sonication) 2x10 λεπτά.
8. 100  $\mu$ l του ομογενοποιημένου διαλύματος κρατούνται για μέτρηση των πρωτεϊνών με Bradford και 100  $\mu$ l του ομογενοποιημένου διαλύματος τοποθετούνται σε φίλτρο GF/C x 2
9. Κάθε φίλτρο (αριθμημένο) μπαίνει διαδοχικά στα ακόλουθα διαλύματα  
1ο διάλυμα: 5% TCA +1% Sodium Pyrophosphate για 5-6 λεπτά  
2ο διάλυμα: 5% TCA για 5-6 λεπτά  
Τα αδιάλυτα στο οξύ DNA μένουν στο φίλτρο. Ακολουθεί ξήρανση με:  
3ο διάλυμα: αιθανόλη εμπορίου  
4ο διάλυμα: απόλυτη αιθανόλη
10. Τα φίλτρα τοποθετούνται πάνω σε διηθητικό χαρτί Hood για 30-60 λεπτά
11. Κάθε φίλτρο μπαίνει σε ειδικό φιαλίδιο με σπινθηριστικό υγρό  $\approx$  3 ml
12. Μέτρηση σε υγρό σπινθηριστή β-ακτινοβολίας (β-counter) (Packard USA)
13. Αναγωγή σε cpm ενσωματωμένης θυμιδίνης ανά mg πρωτεΐνης

### **2.2.12. Μέτρηση του κυτταρικού όγκου**

#### **Υλικά και συσκευές**

[ $^3$ H] inulin: ραδιοσημασμένη ινουλίνη (Amershad Life Science, USA)

[ $^{14}$ C] urea: ραδιοσημασμένη ουρία (Amershad Life Science, USA)

Scintillation fluid: υγρό σπινθηρισμού (Sigma, USA)

Μετρητής (υγρός σπινθηριστής) β-ακτινοβολίας (Packard, USA)

#### **Μέθοδος**

Η μέθοδος προσδιορισμού του κυτταρικού όγκου βασίζεται στη μέτρηση ραδιενέργειας στο κυτταρικό εκχύλισμα και στο υπερκείμενο, μετά επώαση των κυττάρων με [ $^{14}\text{C}$ ] ουρία και [ $^3\text{H}$ ] ινουλίνη. Τα στάδια της διαδικασίας είναι τα ακόλουθα:

1. Επίστρωση της επιφάνειας των τρυβλίων με κολλαγόνο τύπου I.
2. Καλλιέργεια των κυττάρων  $\approx$  7-8 ημέρες.
3. 24 ώρες πριν το πείραμα, εκθέτουμε τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς BSP (ορό πρωτεΐνη αγελάδας).
4. Επώαση με TNF $\alpha$  για 15 λεπτά – 2 ώρες – 4 ώρες και 24 ώρες.
5. Επώαση για 5 λεπτά με [ $^{14}\text{C}$ ] ουρία και [ $^3\text{H}$ ] ινουλίνη.
6. Μέτρηση των κρούσεων στο υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και στο κυτταροδιάλυμα που παίρνουμε αφού λύσουμε τα κύτταρα με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης SF (παράγραφος 2.2.)

Η επώαση γινόταν με 20 K Bq/ml [ $^3\text{H}$ ] ινουλίνη και [ $^{14}\text{C}$ ] ουρία. Το υπερκείμενο ήταν 1000  $\mu\text{l}$  και τα κύτταρα λύθηκαν σε 1000  $\mu\text{l}$  SF. Κάθε δείγμα μετρήθηκε για 2 λεπτά και καταγράφηκαν οι κρούσεις. Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος έγινε με αναγωγή στις κρούσεις του υπερκείμενου. Ξεχωριστό δείγμα κυτταρικού εκχυλίσματος, από το ίδιο τρυβλίο καλλιέργειας κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ολικών πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ολικής πρωτεΐνης.

### **2.2.13. Μελέτη της κυτταρικής απόπτωσης**

#### **Υλικά και συσκευές**

Χρωστική DAPI: 4,6 Diamino-ephnylindole (Biochemicals and Reagents, USA)

TUNEL assay kit (Boehringer, Germany)

#### **Μέθοδος**

Η μέθοδος βασίζεται στη χρώση του DNA με DAPI και ενσωμάτωση σημασμένης dUPT από την τελική δεοξυνουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση (TdT) στα «άκρα» κατετημένου DNA (TUNEL assay). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν

ποδοκύτταρα, τα οποία επώστηκαν επί 20 λεπτά με DNAση. Η διαδικασία ακολουθεί τα επόμενα στάδια:

1. Μονιμοποίηση των κυττάρων με 3,7% Φορμαλδεΰδη σε PBS σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά.
2. Έκπλυση με PBS.
3. Επώση για 2,5 λεπτά, με 0,5% Triton X-100 σε PBS ώστε να γίνουν περατές οι μεμβράνες.
4. Επώση μόνο του θετικού μάρτυρα για 20 λεπτά με 10 mM Tris – HCl pH 8,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> και 1 mg/ml DNase I.
5. Έκπλυση με PBS.
6. Επώση όλων των δειγμάτων με χρωστική DAPI για 15 λεπτά (50 ml για κάθε δείγμα από 8 μl DAPI σε 1 ml PBS).
7. Έκπλυση 2 φορές από 5 λεπτά με το διάλυμα A (25 mM Tris – HCl pH 6,6, 20 mM Potassium Cacodylate, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>).
8. Επώση όλων των δειγμάτων, εκτός του αρνητικού μάρτυρα, για 60 λεπτά με το kit του TUNEL.
9. Έκπλυση 2 φορές με PBS.
10. Έκπλυση 3 φορές από 5 λεπτά με PBS.
11. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο των κυττάρων (η καλυπτρίδα τοποθετείται ανάστροφα πάνω στην αντικειμενοφόρο).

### **2.3. Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ανάλυσης της μεταβλητότητας (ANOVA), απλή (one-way) και παραγοντική (factorial), καθώς η δοκιμασία unpaired t-test στις περιπτώσεις που οι παρατηρήσεις μας ήταν παραμετρικές (σύγκριση απόλυτων τιμών). Για τις περιπτώσεις, στις οποίες τα αποτελέσματα εκφράζονταν «επί τις εκατό», σε σχέση με κάποια μέτρηση αναφοράς («διατάξιμες» παρατηρήσεις), χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές διαδικασίες και συγκεκριμένα οι Mann-Whitney και Krustal-Wallis. Κάθε πείραμα έγινε τουλάχιστον σε τριπλούν, για τον περιορισμό του τυπικού σφάλματος. Για την ορθότητα των στατιστικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Instat.

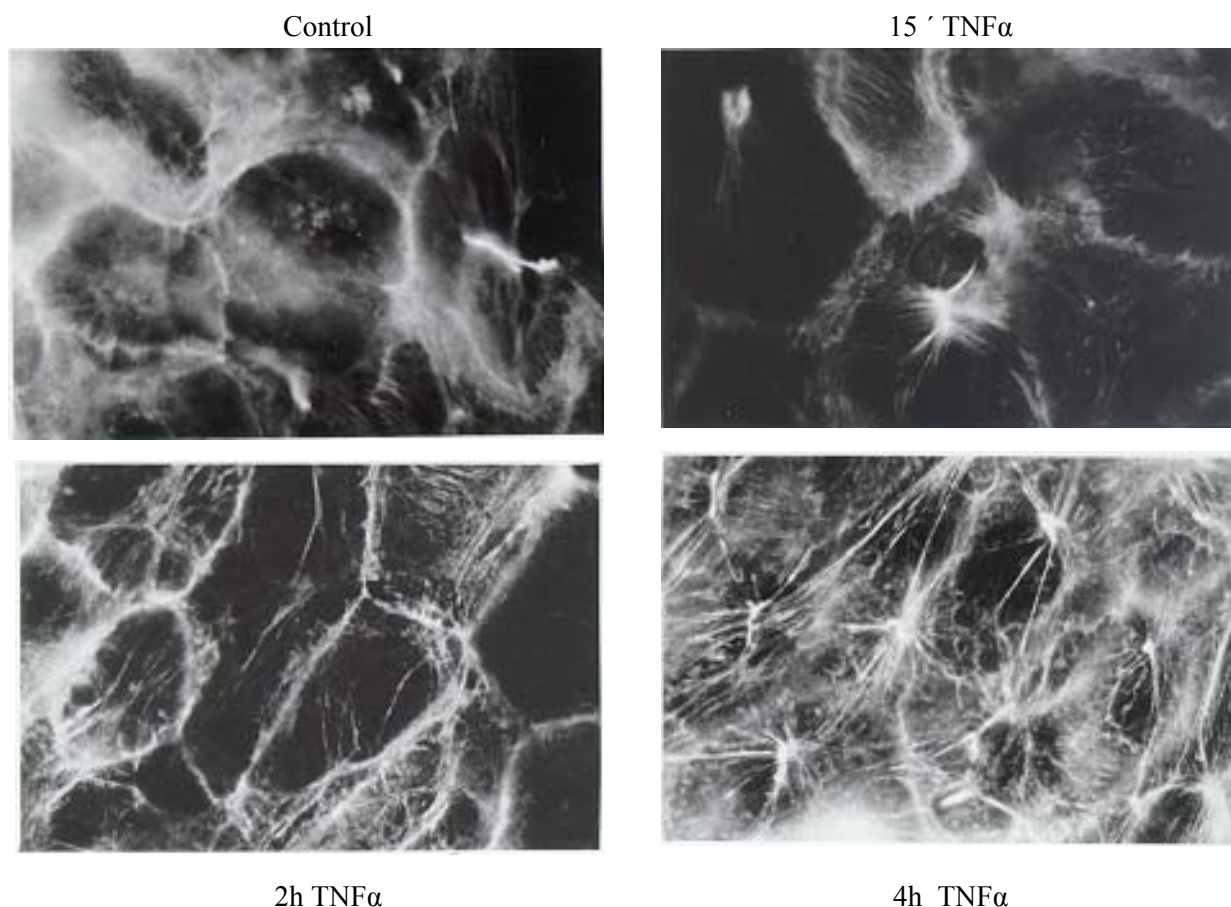
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Ο TNFα προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης

Η εκτίμηση της επίδρασης του TNFα στον κυτταροσκελετό της ακτίνης των πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (glomerular epithelial cells – GEC) έγινε με μικροσκοπία άμεσου φθορισμού και μικροσκοπία συνεστίασης (confocal). Οι παρατηρήσεις έγιναν σε GEC, τα οποία επώαστηκαν με 10 ng/ml TNFα σε προκαθορισμένους χρόνους, μετά χρώση ροδαμίνης – φαλλοϊδίνης.

Όπως φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν, και με τις δύο μεθόδους διαπιστώθηκε ότι η έκθεση των GEC σε TNFα είχε ως αποτέλεσμα μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων, οι οποίες συνοδεύονταν από μεταβολές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης (εικόνες 5 και 6). Μια σχετική αύξηση της πυκνότητας και του φθορισμού των μικροϊνιδίων παρατηρείται ταχύτατα (15΄) μετά την έκθεση σε TNFα (εικόνα 6). Η παρατηρούμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού παραμένει εμφανής και μετά 24 ώρες.

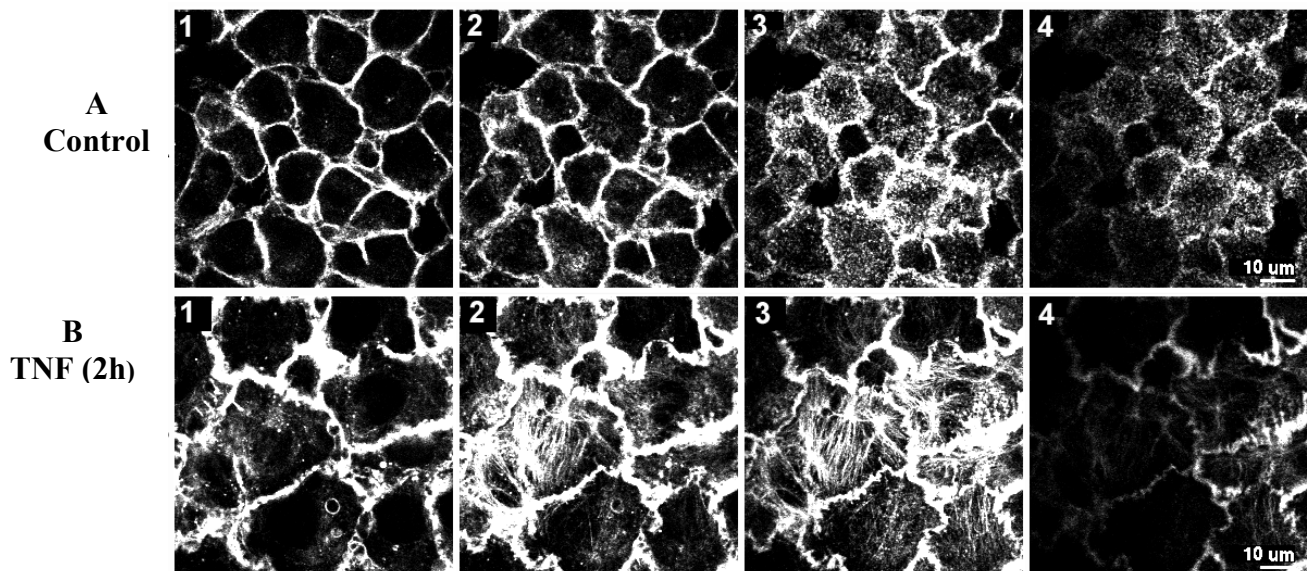
Επειδή τα ινίδια stress εκπορεύονται από τις εστιακές προσφύσεις, μελετήσαμε την κατανομή και την περίσσεια ή μη της βινκουλίνης, η οποία θεωρείται «δείκτης» των προσφύσεων. Κύτταρα, που είχαν εκτεθεί σε TNFα, μελετήθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κατά της βινκουλίνης (εικόνα 7). Εκχυλίσματα των κυττάρων αυτών ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα κατά της βινκουλίνης και της φωσφοτυροσίνης. Τα ανοσοκρημνίσματα διαχωρίστηκαν σε πήγμα SDS-πολυακριλαμίδης, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτυπώθηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της βινκουλίνης (εικόνα 9). Επιπλέον, διερευνήσαμε τη σχέση της βινκουλίνης με τις εστίες πρόσφυσης, συγκρίνοντας την τοπογραφική κατανομή της βινκουλίνης με εκείνη της ταλίνης, μιας άλλης κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης, η οποία εντοπίζεται αποκλειστικά στις εστιακές προσφύσεις.



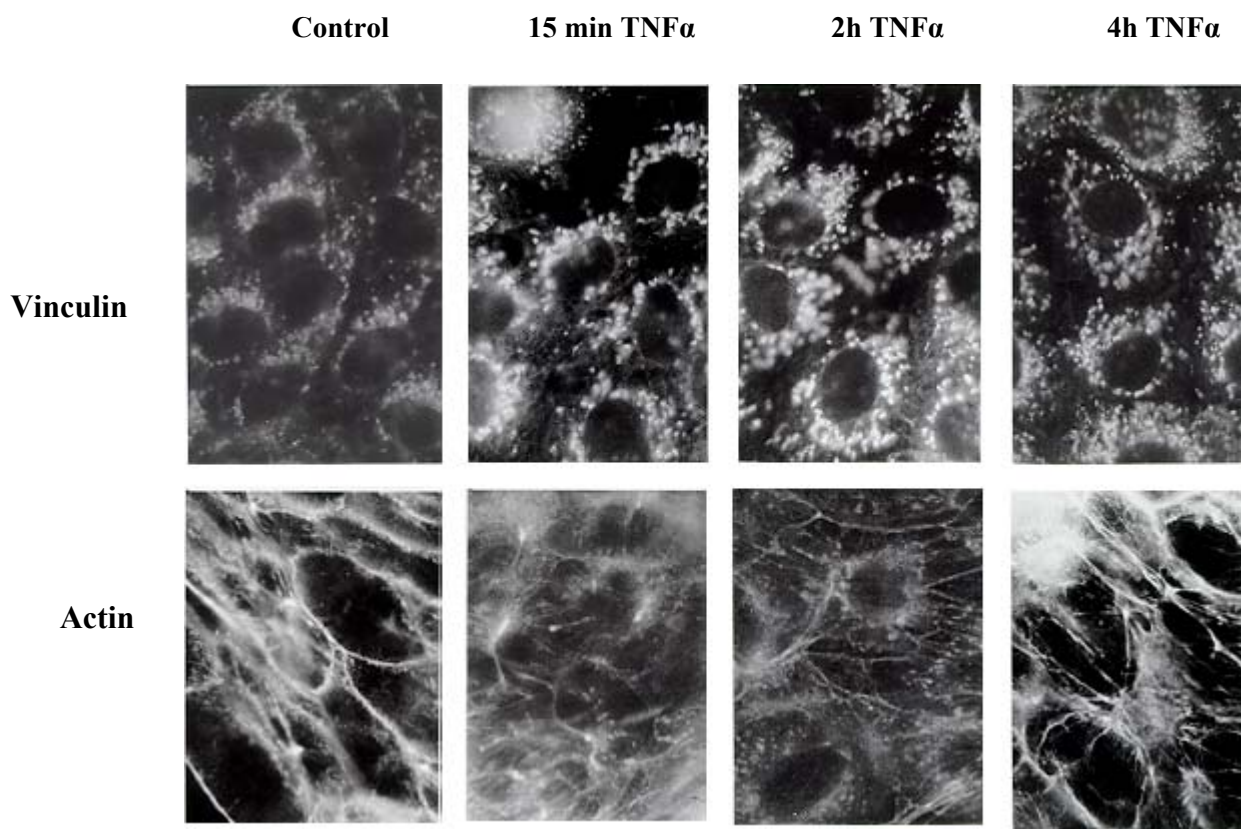
**Εικόνα 5.** Άμεση μικροσκοπία ανοσοφθορισμού μετά από χρώση με ροδαμίνη – φαλλοϊδίνη των μικροϊνιδίων των GEC, control και μετά από επώαση με TNFα 10 ng/ml 15 min – 2h – 4h. Μεγέθυνση x 1000.

Σε κύτταρα από καλλιέργειες ελέγχου (χωρίς TNFα) διαπιστώθηκε εκσεσημασμένη χρώση αντι-βινκουλίνης, ουσιαστικά επικαλυπτόμενη με χρώση αντι-ταλίνης. Η έκθεση των κυττάρων σε TNFα δεν μετέβαλε αισθητά την κατανομή των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 8) και τη συνολική έκφραση της βινκουλίνης, όπως έδειξε, αντίστοιχα, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η ανοσοκατακρήμιση. Ωστόσο, η ανοσοαποτύπωση των ανοσοκρημισμάτων της φωσφοτυροσίνης, με αντισώματα κατά της βινκουλίνης, απέκάλυψε μια σημαντική αύξηση της τυροσινοφωσφορυλίωσης αυτής της πρωτεΐνης (εικόνα 9).

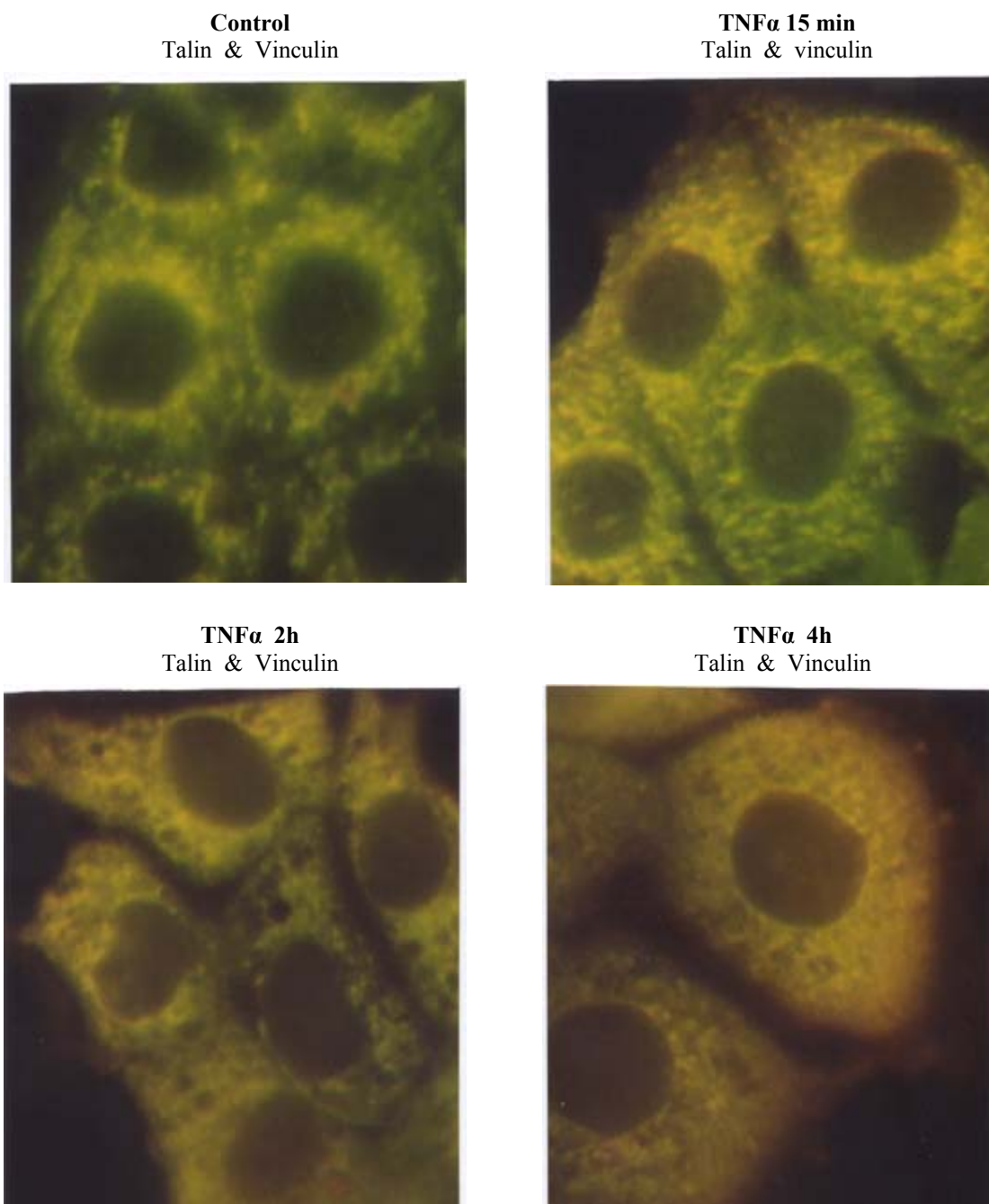
Στο σύνολο τους, τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι ο TNFα προκαλεί μια σαφή αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Έκθεση των GEC σε TNFα οδηγεί σε αναδόμηση του πλέγματος της ακτίνης, με σχηματισμό νέων ινιδίων stress και αυξημένη τυροσινοφωσφορυλίωση της βινκουλίνης, μιας πρωτεΐνης – δείκτη των εστιακών προσφύσεων.



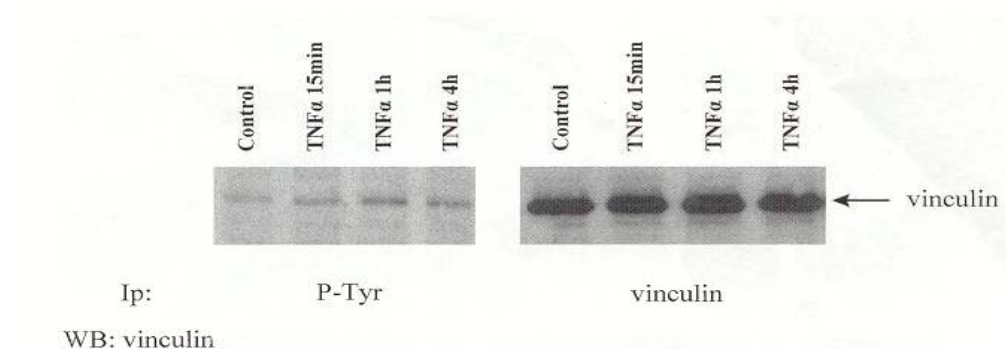
**Εικόνα 6.** Μικροσκοπία συνεστίασης πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από χρώση των μικροϊνιδίων τους με ροδαμίνη – φαλλοϊδίνη A: control και B: μετά από επώαση με TNFα 2h. Το βήμα της οπτικής σάρωσης καθορίστηκε σε 0,5 μm.



**Εικόνα 7:** Συμβατική μικροσκοπία πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από διπλό ανοσοφθορισμό για ακτίνη και βινκουλίνη, μετά από επώαση των κυττάρων με TNFα για 15 min, 2h και 4h.



**Εικόνα 8:** Διπλός ανοσοφθορισμός με Talin (Texas-Red-κόκκινο) & Vinculin (FITC-πράσινο)



**Εικόνα 9.** Επίδραση του Tumor Necrosis Factor TNF $\alpha$  στην έκφραση και την τυροσινοφωσφορυλίωση της Vinculin

### 3.2. Ο TNFα επάγει τον πολυμερισμό της G- προς F-ακτίνη

Εστιάζοντας στον υποκείμενο μηχανισμό της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, διερευνήσαμε την ικανότητα του TNFα να προκαλεί μετατόπιση της ενδοκυττάριας δεξαμενής της G-ακτίνης προς πολυμερισμένη F-ακτίνη. Προς τούτο, με τη μέθοδο αναστολής της DNase I, μετρήσαμε τα κυτταρικά επίπεδα G και ολικής ακτίνης και υπολογίσαμε το λόγο G/ολική ακτίνη, έναν κοινά αποδεκτό ποσοτικό δείκτη του πολυμερισμού της G-ακτίνης (Koukouritaki et al 1996, Koukouritaki et al 1997, Papakonstanti et al 1996, Papakonstanti et al 1998, Moustakas et al 1998).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά στην εικόνα 10 και συνοψίζονται στον πίνακα 1: επώαση των GEC με 10 ng/ml TNFα, επί 15 λεπτά, 2, 4 και 24 ώρες προκάλεσε, σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες, μιαν αναπαραγόμενη και σημαντική ( $p<0,05$ ) μείωση του λόγου G/ολική ακτίνη κατά 18%, 24%, 44% και 17% αντίστοιχα.

**Πίνακας 1. Επίδραση του TNFα στη δυναμική κατάσταση του πολυμερισμού της ακτίνης των ποδοκυττάρων**

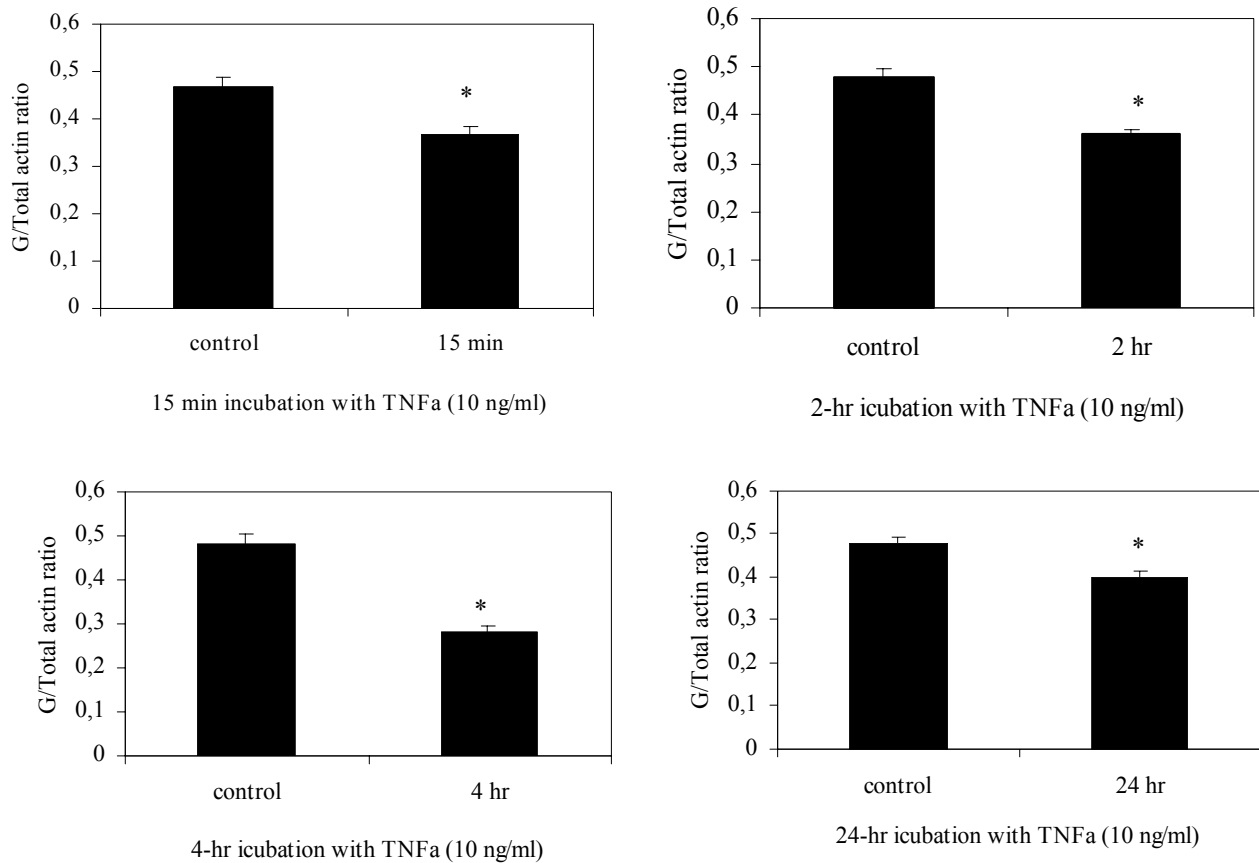
	Control 15 min (n=10)	TNFα				Control 24hr (n=5)
		15 min (n=7)	2 hr (n=10)	4 hr (n=9)	24 hr (n=9)	
G-ακτίνη (μg/mg)	20.67±0.82	14.45±1.52	17.9±1.26	27.03±2.84	83.71±4.8	52.7±5.9
Ολική ακτίνη (μg/mg)	41.55±1.68	35.24±2.03	50.23±2.17	96.54±1.96	209.28±7.9	109.80±10.10
G/ολική ακτίνη	0.50±0.003	0.41±0.01*	0.36±0.015*	0.28±0.005*	0.4±0.0025**	0.48±0.03

\*  $p<0.05$  v control στα 15 min, \*\* $p<0.05$  v. control στις 24h

Μια περαιτέρω ανάλυση των στοιχείων του Πίνακα 1 δείχνει ότι, η περιεκτικότητα των κυττάρων σε ολική ακτίνη παρουσιάζει μια σημαντική αύξηση, στη διάρκεια της 24ωρης επώασης με TNFα, ενδεικτική μιας αξιόλογης de novo βιοσύνθεσης της



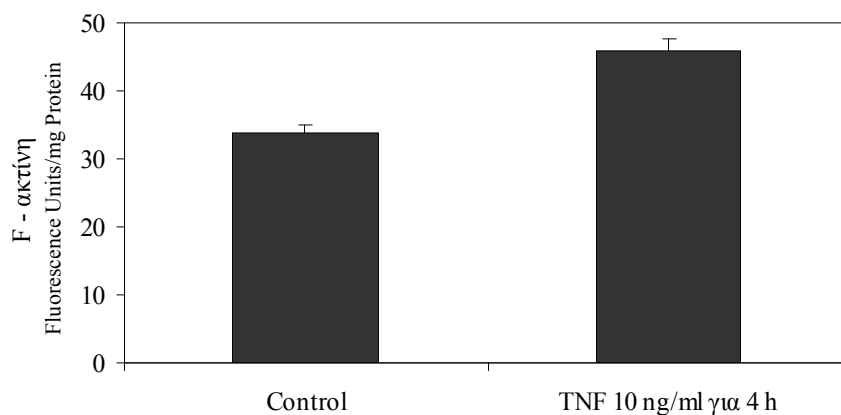
ακτίνης. Από την άλλη πλευρά, η αρχική πτώση της G-ακτίνης, κατά τις 2 πρώτες ώρες της επώασης, ακολουθείται από μικρή σχετικά άνοδο. Πρέπει, συνεπώς, να



**Εικόνα 10.** Επίδραση του TNFα στη δυναμική του πολυμερισμού της ακτίνης των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων. Η μονομερής G και η ολική μετρήθηκαν με τη μέθοδο αναστολής της DNase I μετά από επώαση με TNFα σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Η περιεκτικότητα της ακτίνης εκφράζεται σε μg/mg ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών.

\* $p < 0,05$  έναντι του control σε 15 min επώαση, \* $p < 0,05$  έναντι του control σε 24 h επώαση

υποθέσουμε ότι το μεγαλύτερο μέρος της de novo συντιθέμενης ακτίνης πολυμερίζονται προς F-ακτίνη. Επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής έγινε σε GEC, τα οποία επώαστηκαν επί 4 ώρες με TNFα. Φθοριομετρικός προσδιορισμός, με χρώση ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης, έδειξε πράγματι μια σημαντική αύξηση της F-ακτίνης (εικόνα 11). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ένα σημαντικό και ταχέως επαγόμενο, από τον TNFα, σύνθεση και πολυμερισμό της ακτίνης σε GEC, ο οποίος παραμένει σε όλη την 24ωρη διάρκεια της επώασης με την κυτταροκίνη.

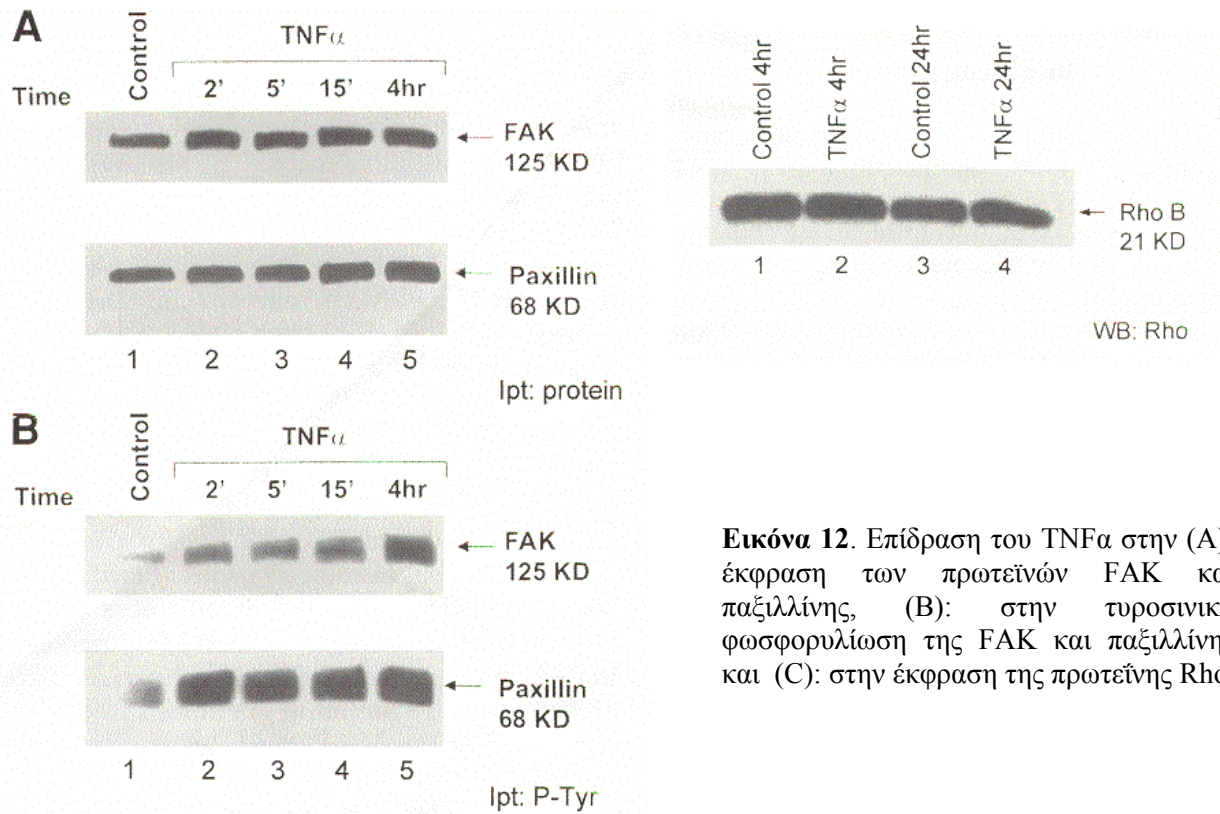


**Εικόνα 11.** Μέτρηση της F ακτίνης σε πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα μετά από επώαση με TNF $\alpha$  10 ng/ml για 4h.

### **3.3. Ο TNF $\alpha$ επάγει την τυροσινοφωσφορυλίωση της FAK και της Παξιλλίνης χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασής τους.**

Για να διερευνήσουμε την πιθανή συμμετοχή της FAK ή/και της παξιλλίνης στην προκαλούμενη από τον TNF $\alpha$  αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ελέγξαμε την έκφραση και την τυροσινοφωσφορυλίωση αμοτέρων των πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 12A Western blot ανάλυση με μονοκλωνικά αντισώματα κατά της FAK και της παξιλλίνης, η οποία έγινε μετά 2, 5, 15 λεπτά και 4 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με TNF $\alpha$  δεν έδειξε μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των δύο πρωτεϊνών. Ωστόσο, η έκθεση σε TNF $\alpha$  προκάλεσε αύξηση των επιπέδων τυροσινοφωσφορυλίωσης της FAK, η οποία ήταν ορατή στα 2 λεπτά και παραμένει εμφανής στα 5, 15 λεπτά και 4 ώρες. Παρόμοια, TNF $\alpha$  προκαλούμενη, παρατεταμένη αύξηση των επιπέδων τυροσινοφωσφορυλίωσης παρατηρήσαμε και για την παξιλλίνη (εικόνα 12B).



**Εικόνα 12.** Επίδραση του TNF $\alpha$  στην (A): έκφραση των πρωτεϊνών FAK και παξιλλίνης, (B): στην τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK και παξιλλίνης και (C): στην έκφραση της πρωτεΐνης Rho

### 3.4. Ο TNF $\alpha$ δεν μεταβάλλει την έκφραση των Rho B πρωτεϊνών

Δεδομένου ότι, οι μικρές GTPάσες φαίνεται να συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής μηνυμάτων, από την ενεργοποίηση υποδοχέων στην αναδιοργάνωση της ακτίνης (Ridley and Hall 1992, Tapon and Hall 1997, Moustakas and Stournaras 1999), εξετάσαμε το ενδεχόμενο συμμετοχής της οικογένειας των Rho B πρωτεϊνών, στον TNF $\alpha$  προκαλούμενο πολυμερισμό της ακτίνης, που παρατηρήσαμε στα πειράματά μας.

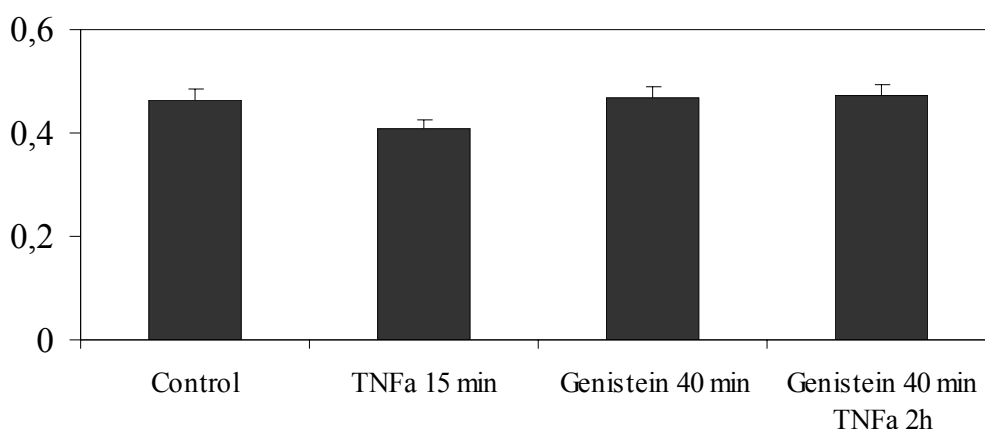
Εκχυλίσματα κυττάρων, τα οποία είχαν επωαστεί επί 4 και 24 ώρες με TNF $\alpha$  (10 ng/ml), υποβλήθηκαν σε Western blot ανάλυση, με πολυκλωνικό αντί Rho B αντίσωμα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12C, ο TNF $\alpha$  δεν προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης της Rho B πρωτεΐνης. Εντούτοις, το αρνητικό αυτό εύρημα δεν μπορεί να αποκλείσει ενδεχόμενη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης.

### 3.5. Η αναστολή της τυροσινοφωσφορυλίωσης αναστέλλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TNFα.

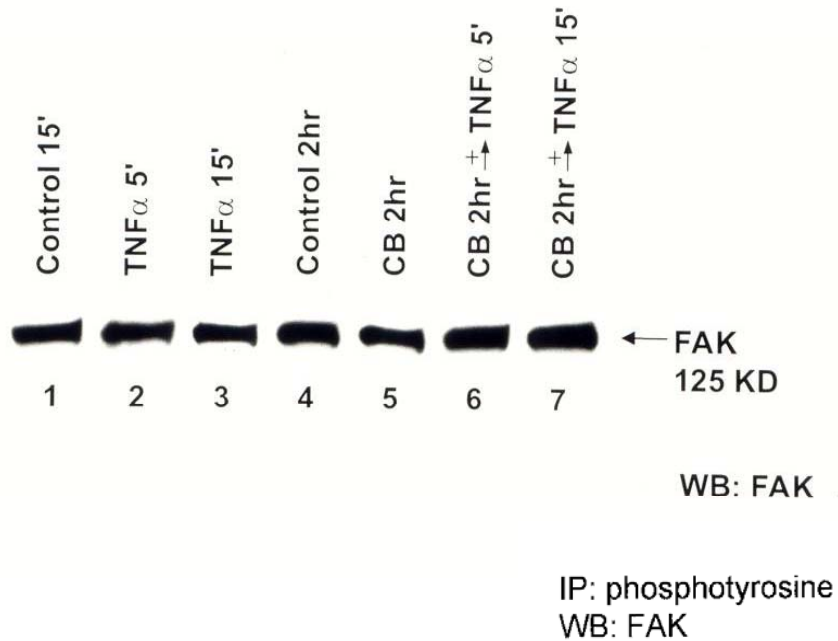
Δεδομένου ότι, η τυροσινοφωσφορυλίωση θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην οργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης (Melamed et al 1991, Pamiglia et al 1992), διερευνήσαμε την TNFα-προκαλούμενη επαγωγή του πολυμερισμού της ακτίνης σε GEC, τα οποία είχαν προεπωαστεί με γενιστεΐνη (genistein), έναν αναστολέα της τυροσινικής κινάσης.

Με τη μέθοδο αναστολής DNase I, υπολογίσαμε το λόγο G/ολικής ακτίνης σε GEC, τα οποία προεπωάστηκαν επί 40 λεπτά με γενιστεΐνη (100 nM) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε TNFα επί 15 λεπτά και 2 ώρες. Σε αυτά τα προεπωασθέντα με γενιστεΐνη κύτταρα δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στο λόγο G/ολικής ακτίνης, προ και μετά την έκθεση τους σε TNFα (εικόνα 13).

Αν και, η δράση της γενιστεΐνης μπορεί να μην περιορίζεται αποκλειστικά στην αναστολή των τυροσινικών κινάσεων, τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι, η τυροσινοφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών FAK και παξιλλίνης είναι απαραίτητη για την προκαλούμενη από τον TNFα αναδιοργάνωση της ακτίνης.



**Εικόνα 13.** Μελέτη επίδραση στον πολυμερισμό της ακτίνης από την δράση του TNFα μετά από επώαση με genistein.



**Εικόνα 14.** Επίδραση του Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$ ) στην έκφραση και τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK παρουσία ή απουσία κυτοχλασίνης B (CB) 1.2 mM

### 3.6. Η επαγωγή της τυροσινοφωσφορυλίωσης της FAK και της παξιλλίνης από τον TNF $\alpha$ προϋποθέτει την ακεραιότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης

Το ερώτημα, κατά πόσον ο πολυμερισμός της ακτίνης υπό την επίδραση του TNF $\alpha$ , που παρατηρήσαμε στα πειράματά μας, συνιστά ένα μονοπάτι μεταγωγής μηνύματος προσεγγίστηκε από μια διαφορετική πλευρά. GEC κύτταρα επώαστηκαν με TNF $\alpha$  επί 5, 15 λεπτά και 2 ώρες, με σύγχρονη έκθεση σε κυτοχλασίνη B (CB) και ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με αντι-FAK αντίσωμα και περαιτέρω ανάλυση, κατά τα περιγραφέντα σε προηγούμενη ενότητα. Η CB είναι μια μυκητιασική τοξίνη, η οποία εξειδικευμένα προκαλεί αποπολυμερισμό της ακτίνης και αναστέλλει τη συγκρότηση του μικροϊνδιακού πλέγματος.

Διαπιστώθηκε ότι, η αναστολή του πολυμερισμού της ακτίνης συνοδεύεται από κατάργηση της τυροσινοφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών FAK και παξιλλίνης (εικόνα 14), ένα εύρημα συμβατό με παρόμοιες παρατηρήσεις, που έχουν γίνει σε άλλα κυτταρικά συστήματα (Khan et al 1995, Melamed et al 1995).

### **3.7. Ο TNFα προκαλεί αύξηση του κυτταρικού όγκου**

Κατά τη διάρκεια της μορφολογικής ανάλυσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε TNFα – προεπωασθέντα GEC, παρατηρήσαμε μια προφανή αύξηση του κυτταρικού όγκου. Επιδιώξαμε την ποσοτική εκτίμηση της αύξησης του όγκου σε GEC, τα οποία επώαστηκαν με TNFα (10 ng/ml) επί 15 λεπτά, 2, 4 και 24 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν επί 5 λεπτά σε [<sup>14</sup>C] ουρία και [<sup>3</sup>H] ινουλίνη. Η ινουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης του «εξωκυττάριου» χώρου, ενώ η ουρία, ένα μόριο που διέρχεται γρήγορα και ελεύθερα από τις κυτταρικές μεμβράνες, ως δείκτης του ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου χώρου.

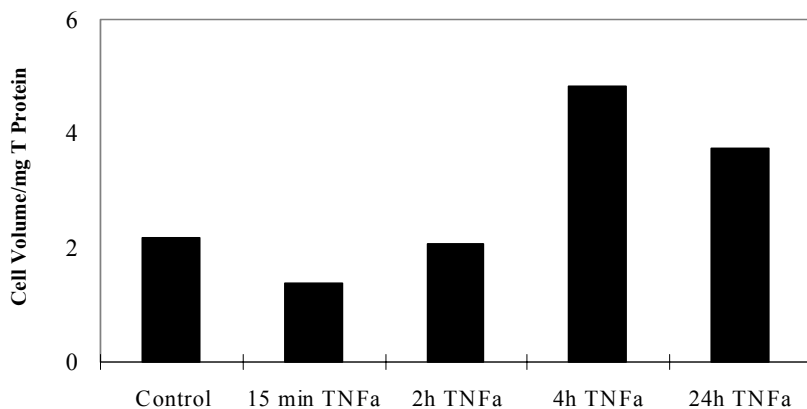
Η μέτρηση της ουρίας και της ινουλίνης, σε εκχυλίσματα κυττάρων και στο υπερκείμενο διάλυμα, έδειξε αύξηση του κυτταρικού όγκου των GEC (εικόνα 15). Το φαινόμενο αυτό της ταυτόχρονης αύξησης του πολυμερισμού της ακτίνης και του κυτταρικού όγκου, εν πολλοίς αναμενόμενο και συμβατό με προηγούμενες παρατηρήσεις (Theodoropoulos et al 1992), σε άλλα κυτταρικά συστήματα.

### **3.8. Ο TNFα δεν προκαλεί κυτταρική υπερπλασία ή απόπτωση των ποδοκυττάρων**

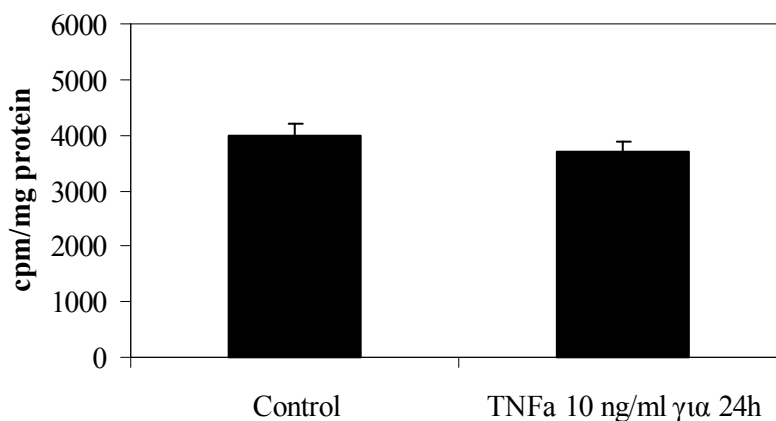
Η TNFα-προκαλούμενη αύξηση του κυτταρικού όγκου, την οποία παρατηρήσαμε στα πειράματά μας, έθεσε το ερώτημα, εάν η κυτταρική αυτή εξοίδηση σχετίζεται ή αποτελεί στάδιο κυτταρικής υπερπλασίας ή απόπτωσης.

Η κυτταρική υπερπλασία έχει περιγραφεί σε ορισμένες μορφές σπειραματονεφριτίδων (Barisoni et al 2000, Shankland et al 2000) και η κυτταρική απόπτωση έχει ενοχοποιηθεί για την παθογένεια της σπειραματικής βλάβης νοσημάτων, κυρίως, του συνδετικού ιστού.

Για τη μελέτη της κυτταρικής υπερπλασίας, GEC κύτταρα επώαστηκαν επί 24 ώρες με TNFα και τριτιωμένη θυμιδίνη, της οποίας η δέσμευση στο DNA του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης κυτταροπολλαπλασιασμού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, σε σύγκριση με κύτταρα από καλλιέργειες ελέγχου (χωρίς TNFα), η επώαση με TNFα δεν προκάλεσε αυξημένη ενσωμάτωση θυμιδίνης.

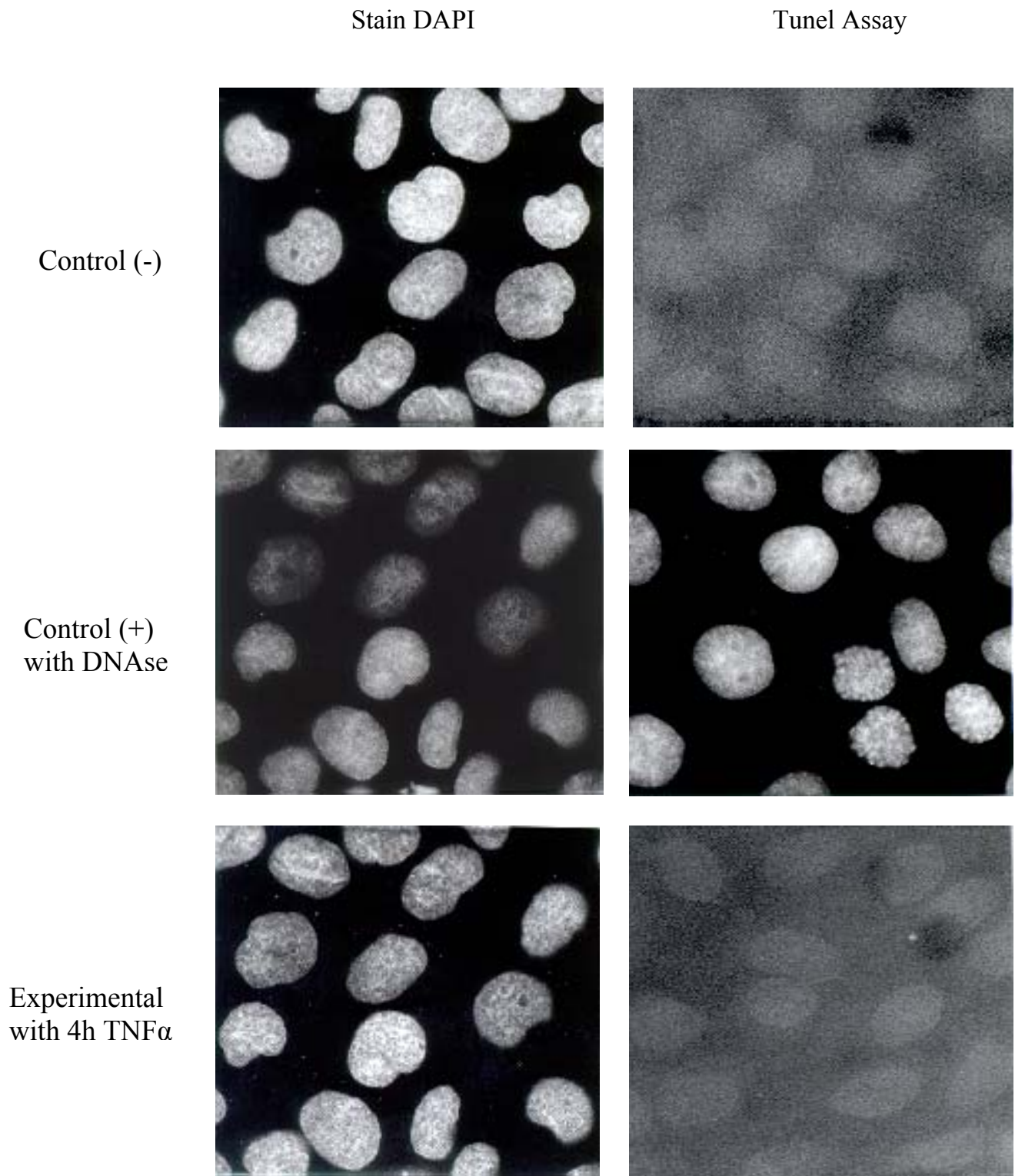


**Εικόνα 15.** Μελέτη επίδρασης του TNFα στον κυτταρικό όγκο των πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από επώαση τους με TNFα για 15 min, 2h, 4h, 24h.



**Εικόνα 16.** Μελέτη κυτταροπολλαπλασιασμού με τριτιωμένη θυμιδίνη στα πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα μετά από επώαση με TNFα.

Η απόπτωση μελετήθηκε σε GEC, τα οποία είχαν επωαστεί με TNFα επί 15 λεπτά, 2 και 4 ώρες. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν GEC, τα οποία επώαστηκαν με DNase επί 20 λεπτά, ένα ένζυμο με γνωστή αποπτωτική δράση. Η εκτίμηση της απόπτωσης έγινε μετά από χρώση με DAPI (μια χρωστική του DNA των αποπτωτικών κυττάρων) σε συνδυασμό με ενζυμική μέθοδο (tunel assay). Τα αποτελέσματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 17, έδειξαν ότι η επώαση με TNFα δεν προκάλεσε κυτταρική απόπτωση.



**Εικόνα 17.** Μελέτη επίδρασης του TNF $\alpha$  στην απόπτωση των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από επώαση με TNF $\alpha$  4h. Με διπλή μέθοδο με χρωστική DAPI και Tunel Assay.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ποδοκύτταρα (GEC) αποτελούν βασικό δομικό στοιχείο του σπειραματικού τριχοειδούς. Διαθέτουν ένα πλούσιο και καλά οργανωμένο κυτταροσκελετό ακτίνης, στον οποίο οφείλεται η μορφολογική σταθερότητα του κυτταρικού σώματος και των ποδοειδών προσεκβολών του. Εκτός της δημιουργίας μιας σταθερής μορφολογικής δομής, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης συμμετέχει σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα "αγκυροβολητών" (τις εστιακές προσφύσεις), τα οποία είναι υπεύθυνα για την προσκόληση των ποδικών προσεκβολών στη βασική σπειραματική μεμβράνη, μέσω των ιντεγκρινών (Drenckhahn and Franke 1988). Η ανατομική και λειτουργική ακεραιότητα των εστιών πρόσφυσης είναι ιδιαίτερα σημαντική, για την ακεραιότητα του διπλού φραγμού διήθησης (φραγμού μεγέθους και φραγμού φορτίου), ο οποίος παρεμποδίζει τη διέλευση λευκωματινών και άλλων μακρομορίων από το τοίχωμα του σπειραματικού τριχοειδούς.

**Τα ποδοκύτταρα αποτελούν στόχο ανοσολογικής ή τοξικής βλάβης σε ποικίλες σπειραματοπάθειες, οι οποίες απαντώνται στον άνθρωπο ή προκαλούνται πειραματικά, με κύριο λειτουργικό χαρακτηριστικό τη βαρεία λευκωματουρία. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις, στις σπειραματοπάθειες αυτές, υποδηλώνουν συμμετοχή του κυτταροσκελετού και περιγράφονται ως εξάλειψη και επιπέδωση των ποδίων, μικρολαχνώδη μετατροπή της κορυφαίας κυτταρικής μεμβράνης και απόσπαση από τη βασική σπειραματική μεμβράνη (Kerjaschki 1994).**

Σχετικά πρόσφατες δημοσιεύσεις, από πολλές ερευνητικές ομάδες, παρέχουν σοβαρές ενδείξεις ότι ο TNFα ενδέχεται, με άμεσο ή έμμεσο τρόπο, να αποτελεί ένα κεντρικό κρίκο στην αλληλουχία των γεγονότων, που οδηγούν στις ανωτέρω αναφερόμενες σπειραματικές αλλοιώσεις. Στο πειραματικά προκαλούμενο νεφρωσικό σύνδρομο με χορήγηση πουρομυκίνης ή αδριαμυκίνης σε αρουραίους, η βαρύτητα της λευκωματουρίας βαίνει παράλληλα με την υπερπαραγωγή TNFα από τα αγγειώδη σπειράματα (Gomez-Chiarri et al 1994). Σε ασθενείς με μεμβρανώδη

σπειραματοπάθεια ο TNFα υπερεκφράζεται στα GEC και η συγκέντρωση του στα ούρα είναι σημαντικά αυξημένη (Neale et al 1995). Επιπλέον, σε πειραματική ομόλογη αντι-GBM (glomerular basement membrane) σπειραματονεφρίτιδα η λευκωματουρία και η σπειραματική βλάβη περιορίζονται σημαντικά με αντισώματα αντι-TNFα (Hruby et al 1991). Τέλος, ένας, μη ακόμη ταυτοποιημένος, κυτταροκινοειδής παράγοντας ενοχοποιείται για τις παρατηρούμενες βλάβες στη νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων και την εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (Wardle 1993, Savin et al 1996). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τα οποία έδειξαν ότι ο TNFα προκαλεί εκσεσημασμένες μεταβολές του πολυμερισμού της ακτίνης και των μορίων προσκόλλησης των ποδοκυττάρων, πρέπει να συζητηθούν σε σχέση με τα παραπάνω δεδομένα.

Η έκθεση σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (GEC) σε TNFα οδήγησε σε μια ταχέως ανιχνεύσιμη (εντός 15 λεπτών) και παρατεταμένη (24ωρη) ελάττωση του λόγου G/ολικής ακτίνης (εικόνα 10, πίνακας I). Η μετατόπιση της ισορροπίας από τη μονομερή G- προς την πολυμερισμένη F-ακτίνη υποδηλώνει συναρμογή των μικροϊνιδίων σε δέσμες ινιδίων (ινίδια stress) και ενδέχεται να αντανακλά μian απόπειρα σταθεροποίησης του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Koukouritaki et al 1996, Papakonstanti et al 1996).

Πράγματι, οι ταχείας έναρξης και μικρής διάρκειας μεταβολές του πολυμερισμού - αποπολυμερισμού της ακτίνης θεωρούνται σημαντικές, για την επαγωγή ταχέων κυτταρικών αποκρίσεων σε διάφορα ερεθίσματα. Παραδείγματα τέτοιων σχέσεων, μεταξύ της κατάστασης πολυμερισμού της ακτίνης και κυτταρικής ανταπόκρισης, αποτελούν: α) η ενδοκύττωση (Kubler and Riezman 1993, Sako and Kusumi 1994), β) η εξωκύττωση (Burgess and Kelly 1987, Annis and Baber 1988, Hesketh and Bryme 1991), γ) η ρύθμιση της ενεργότητας διαφόρων πρωτεϊνών μεταφοράς (Nelson 1991, Hunziker and Mellman 1991, Jessen and Hoffmann 1992), δ) η ρύθμιση της ενεργότητας ιονικών καναλιών (Cantiello et al 1991, 1995, Wu et al 1992, Papakonstanti et al 1996, 2000), ε) η μεταφορά ύδατος (Ding et al 1991, Simon et al 1993) και στ) η ρύθμιση του κυτταρικού όγκου (Theodoropoulos et al 1992, Moustakas et al 1998, Papakonstanti et al 2000b).

Ωστόσο, σε σύγκριση με πειράματα ελέγχου, η 24ωρη έκθεση των GEC σε TNF $\alpha$ , πέραν της μείωσης του λόγου G/ολικής ακτίνης, προκάλεσε επίσης μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της ολικής ακτίνης (πίνακας I). Η επαγωγή της de novo βιοσύνθεσης ακτίνης επιβεβαιώθηκε με άμεση φθοριομετρική μέτρηση της ινιδιακής F-ακτίνης κυτταρικών εκχυλισμάτων (εικόνα 11), μια καλά καθορισμένη πειραματική προσέγγιση για τον άμεσο και ακριβή προσδιορισμό της ενδοκυττάριας F-ακτίνης (Wu et al 1992, Cable et al 1995, Cox et al 1996, Stournaras et al 1996).

Η άμεση μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και η μικροσκοπία συνεστίασης (laser scanning confocal microscopy) επιβεβαίωσε τα ευρήματα, που προέκυψαν από τις βιοχημικές μελέτες, αποκαλύπτοντας μια σημαντική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τη δημιουργία νεοσχηματισθέντων ινιδίων stress (εικόνες 5, 6). Επιπλέον όμως, έδωσε ενδείξεις αύξησης του κυτταρικού όγκου των TNF $\alpha$  - εκτεθειμένων GEC. Η ποσοτική εκτίμηση των μεταβολών έδειξε ότι ο TNF $\alpha$  προκαλεί, πράγματι, αύξηση του κυτταρικού όγκου, η οποία γίνεται ορατή στις 4 ώρες και είναι στατιστικά σημαντική στις 24 ώρες (εικόνα 15).

Το απλό και μόνο γεγονός, ότι οι μεταβολές του όγκου συνεπάγονται μεταβολές της κυτταρικής μορφολογίας είναι επαρκές, για να στηρίζει την υπόθεση, ότι το κυτταροσκελετικό δίκτυο μπορεί να σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού όγκου. Αυτή η πιθανότητα ισχύει, κατ' εξοχήν, για τα μικροϊνίδια της ακτίνης, ενός δυναμικού συστήματος, το οποίο στηρίζει και οργανώνει την κυτταρική μεμβράνη και πολλές κυτταρικές λειτουργίες (Luna and Hitt 1992, Hitt and Luna 1994, Mils et al 1994). Παράλληλες μεταβολές του κυτταρικού όγκου και της κατάστασης των μικροϊνιδίων της ακτίνης έχει μελετηθεί σε ποικίλα κυτταρικά συστήματα και κάτω από την επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων (Moustakas et al 1998). Αναφέρονται π.χ., μεταβολές του κυτταρικού όγκου με συνοδό: α) ταχεία μείωση του λόγου G/ολικής ακτίνης, χωρίς μεταβολή της περιεκτικότητας σε ολική ακτίνη, σε ηπατικά κύτταρα, υπό την επίδραση ανισοτονικών, μεταβολικών ή ορμονικών ερεθισμάτων (Theodoropoulos et al 1992), β) απώλεια ινιδίων stress σε NIH-3T3 ινοβλάστες ποντικού, μετά διέγερση του ογκογονιδίου H-ras (Lang et al 1992, Dartsch et al 1995, Ritter et al 1997, Moustakas and Stournaras 1999, Papakonstanti et al 2000b), γ) αύξηση της κυτταρικής

περιεκτικότητας σε F-ακτίνη σε HL-60 λεμφοκύτταρα, μετά υποτονικό shock (Hallows et al 1996).

Η παρατηρούμενη στα πειράματα μας αύξηση του κυτταρικού όγκου αποτελεί μια μάλλον καθυστεριμένη απόκριση στη δράση του TNF $\alpha$ , η οποία δεν συμπίπτει χρονικά με την ταχέως επαγόμενη μείωση του λόγου G/ολική ακτίνη, αλλά περισσότερο με την *de novo* σύνθεση ακτίνης. Από παθοφυσιολογική άποψη, η διαπιστούμενη αύξηση του κυτταρικού όγκου θα μπορούσε να σχετίζεται με την παθογένεια νεφροπαθειών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπερτροφία των ποδοκυττάρων και καταλήγουν σε σπειραματοσκλήρυνση (Rennke et al 1994, Kriz et al 1994). Ανάλογες διαταραχές του πολυμερισμού της ακτίνης, ως απόκριση στον TNF $\alpha$ , με επακόλουθη "απόσυρση" και δημιουργία διακυτταρικών χασμάτων, έχουν περιγραφεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Wojciak – Scothard et al 1998). Η κυτταρική απόσυρση και η δημιουργία χασμάτων έχουν ενοχοποιηθεί για την αγγειακή "διαρροή", που συνδέεται με αυξημένα επίπεδα TNF $\alpha$ . Εάν οι κυτταροσκελετικές μεταβολές, που παρατηρήσαμε στα GEC, μπορούν να οδηγήσουν σε ανάλογες διαταραχές της διαπερατότητας δεν είναι βιβλιογραφικά γνωστό. Πάντως, η διερεύνηση του κυτταροπολλαπλασιασμού με τριτωμένη θυμιδίνη και της κυτταρικής απόπτωσης με χρώση DAPI και ενζυμική μέθοδο (tunel assay), δεν απεκάλυψε επίδραση του TNF $\alpha$  στον κυτταροπολλαπλασιασμό ή την απόπτωση στο κυτταρικό μας σύστημα (εικόνες 16, 17).

Η διαπίστωση των μεταβολών της δυναμικής κατάστασης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και του κυτταρικού όγκου, υπό την επίδραση του TNF $\alpha$ , οδήγησε στο επόμενο στάδιο της μελέτης μας. Η δυναμική κατάσταση του κυτταροσκελετού έχει συσχετιστεί στενά με την ενεργοποίηση, από μια ποικιλία κινασών, πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Burrige et al 1992, Tidball and Spencer 1993, Chrzanowska-Wodnicka and Burrige 1994). Ειδικότερα, η τυροσινική φωσφορυλίωση είναι βασικής σημασίας για τη συγκρότηση του μικροϊνδιακού πλέγματος της ακτίνης (Melamed et al 1991, Pumiglia et al 1992, Leventhal and Feldman 1996). Επιπλέον, η τυροσινοφωσφορυλίωση ειδικών κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών εμπλέκεται στον υποκείμενο μηχανισμό της συγκρότησης των εστιακών προσφύσεων κυττάρων και υποστρώματος (Chrzanowska-Wodnicka and Burrige 1994). Αυξημένη ενεργότητα της τυροσινικής φωσφατάσης έχει συσχετιστεί με την αποκόλληση των κυττάρων από

το υπόστρωμα και αποδιοργάνωση των εστιών πρόσφυσης (Maher 1993). Οι εστιακές προσφύσεις θεωρούνται σημαντικές, όχι μόνο ως σύνδεσμοι μεταξύ κυτταροσκελετού και εξωκυττάριου υποστρώματος, αλλά και ως "αγωγοί" μεταφοράς μηνυμάτων από το εξωκυττάριο υπόστρωμα.

Κατ' αρχήν, διερευνήσαμε την τυροσινική φωσφορυλίωση της βινκουλίνης, μιας πρωτεΐνης η οποία αποτελεί δομικό στοιχείο των εστιών πρόσφυσης. Ο TNFα προκάλεσε αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της βινκουλίνης σε κατάλοιπα τυροσίνης, χωρίς να μεταβάλει τα επίπεδα έκφρασης (εικόνα 9) ή την τοπογραφική της κατανομή, σε σχέση με την ταλίνη (εικόνα 8), η οποία είναι γνωστό ότι εντοπίζεται αποκλειστικά στις εστιακές προσφύσεις. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει εμπλοκή του μορίου αυτού των εστιακών προσφύσεων στην προκαλούμενη από τον TNFα αναδιάταξη των μικροϊνιδίων.

Στις πρωτεΐνες οι οποίες υφίστανται φωσφορυλίωση σε τυροσίνη και σχετίζονται με την συγκρότηση των μικροϊνιδίων, περιλαμβάνονται επίσης η FAK (Focal Adhesion Kinase) και η παξιλλίνη (Burrige et al 1992). Αυξημένη τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK και της παξιλλίνης συνοδεύονται από εκσεσημασμένες μεταβολές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της συγκρότησης των εστιακών προσφύσεων (Seufferlein and Rozengurt 1995). Η FAK και η παξιλλίνη συχνά συνεντοπίζονται στα άκρα ινιδίων F-ακτίνης στις εστιακές προσφύσεις (Turner et al 1990, Tachibana et al 1995). Η εντόπιση της FAK στις εστίες πρόσφυσης γίνεται από μια καταλυτική περιοχή FAT (Focal Adhesion Targeting), η οποία ευρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (Sieg et al 1999, Thomas et al 1999, Shen et al 1999). Η μόνη πρωτεΐνη που έχει ταυτοποιηθεί, μέχρι σήμερα, στην καταλυτική περιοχή της FAK είναι η παξιλλίνη (Turner 1998), η οποία προσδένεται άμεσα στις κυτταροπλασματικές περιοχές των υποδοχέων της ιντεγκρίνης (Liu et al 1999, Schaller and Parsons 1994), καθώς και στη βινκουλίνη, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως "συνεργός ελλιμενισμού" (docking partner) για τη FAK στα σύμπλοκα πρόσφυσης. Η φωσφορυλίωση της FAK σε τυροσινικά κατάλοιπα μπορεί να αποτελεί απόκριση στη δημιουργία συμπλόκων του ιντεγκρινικού υποδοχέα με πρωτεΐνες του υποστρώματος (Burrige et al 1992, Lipfert et al 1992, Clark and Brugge 1995, Rozengurt 1995), καθώς επίσης και απόκριση σε εξωκυττάρια μηνύματα από ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες

(Rozengurt 1995, Zachary et al 1993, Rankin and Rozengurt 1994). Εν συνεχεία, η FAK φωσφορυλιώνει την παξιλλίνη (Turner et al 1993, Bellis et al 1995).

Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι η τυροσινική φωσφορυλίωση της παξιλλίνης ενδέχεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη συγκρότηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της σύνδεσης κυτταροσκελετού - κυτταρικής μεμβράνης κατά την ανάπτυξη των εστιακών προσφύσεων (BurrIDGE et al 1992). Οι παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης, οι οποίες προέκυψαν από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοαποτύπωσης, κατέδειξαν ότι σε GEC ο TNF $\alpha$  διεγείρει τη φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης, τόσον της FAK, όσο και της παξιλλίνης (εικόνα 12B), χωρίς καμιά επίδραση στην ολική ποσότητα των πρωτεϊνών αυτών (εικόνα 12A). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK και της παξιλλίνης πιθανόν να αποτελεί το μηχανισμό ρύθμισης, ο οποίος ελέγχει τη συγκρότηση και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ως απόκριση στη δράση του TNF $\alpha$ . Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, στα οποία έγινε αναστολή της τυροσινικής φωσφορυλίωσης με γενιστεΐνη. Η προεπάση των GEC με γενιστεΐνη παρεμπόδισε τον TNF $\alpha$  - επαγόμενο πολυμερισμό της ακτίνης και την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων (εικόνα 13). Αν και είναι πιθανόν η δράση της γενιστεΐνης να μην περιορίζεται αποκλειστικά στις τυροσινικές κινάσες, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν τη συμμετοχή της τυροσινικής φωσφορυλίωσης, στην παρατηρούμενη αναδιοργάνωση της ακτίνης από τον TNF $\alpha$  (Akiyama and Ogawara 1991, Yap et al 1994).

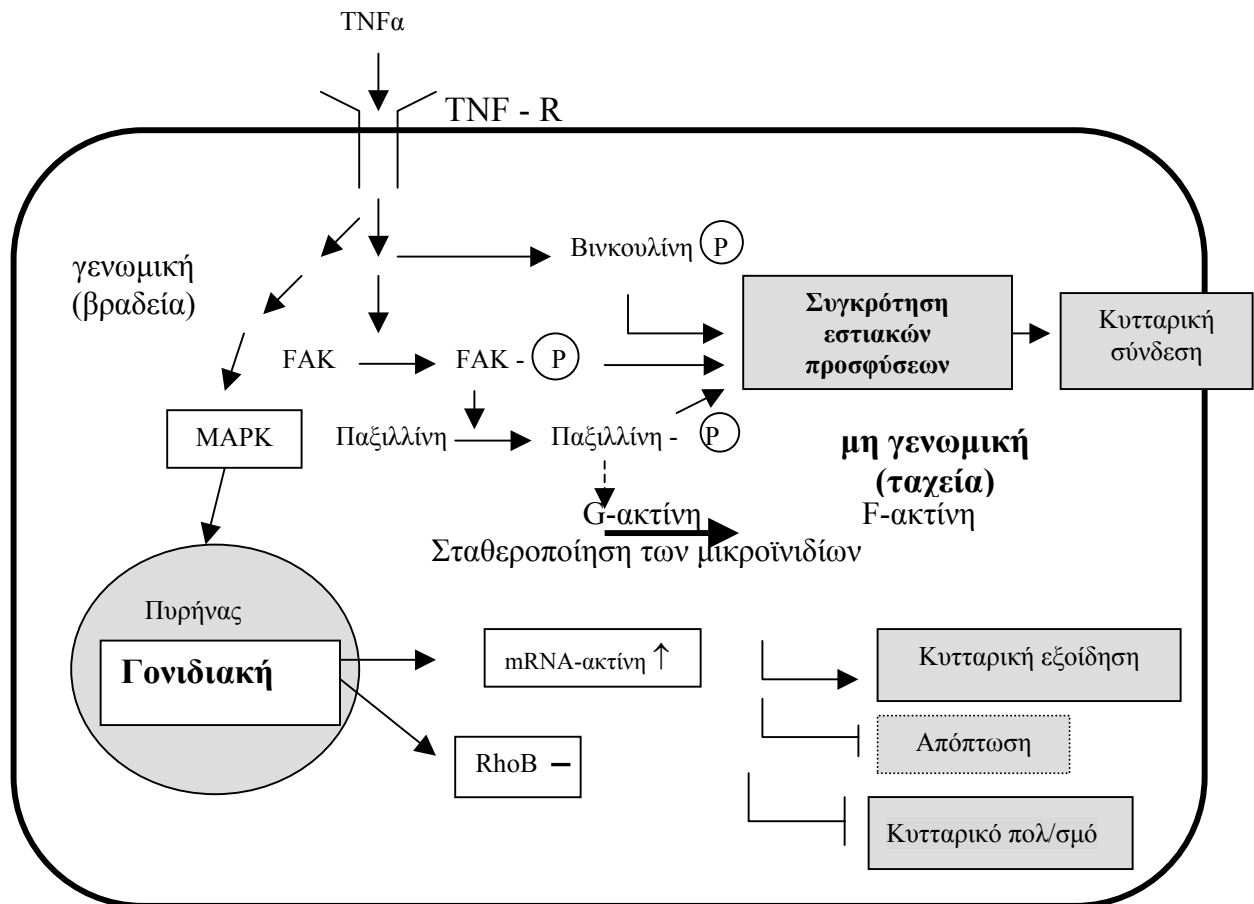
Μια εναλλακτική ερμηνεία των ευρημάτων μας είναι ότι, στην ακολουθία πολυμερισμού - τυροσινικής φωσφορυλίωσης, ο προκαλούμενος από τον TNF $\alpha$  πολυμερισμός της ακτίνης αποτελεί το πρωταρχικό γεγονός. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή ο παρατηρούμενος πολυμερισμός της ακτίνης αποτελεί ένα μηχανισμό μεταβίβασης σημάτων, τα οποία προερχόμενα από τον υποδοχέα του TNF $\alpha$  ρυθμίζουν την τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK. Τέτοιου είδους σήματα θα μπορούσαν να αφορούν ενεργοποίηση τυροσινικών φωσφατασών, π.χ., της MAP κινάσης (Rafiee et al 1995), η οποία φωσφορυλιώνει την FAK σε τυροσινικά κατάλοιπα (Yamada and Greoger 1997).

Δεδομένα, που στηρίζουν την υπόθεση αυτή, προέκυψαν από τη μελέτη της επίδρασης της κυτοχλασίνης B στο κυτταρικό μας σύστημα. Η αναστολή του TNFα - προκαλούμενου πολυμερισμού της ακτίνης, από την κυτοχλασίνη B, οδήγησε σε μείωση των επιπέδων τυροσινικής φωσφορυλίωσης της FAK και της παξιλλίνης (εικόνα 14).

Ανάλογες ενδείξεις, ότι ο πολυμερισμός της G-ακτίνης χρησιμοποιείται από το κύτταρο ως ένας μηχανισμός μεταβίβασης σήματος, έχουν προκύψει από παρατηρήσεις και σε άλλα κυτταρικά συστήματα. Για παράδειγμα, ο νευρικός αυξητικός παράγων (nerve growth factor - NGF), του οποίου ο υποδοχέας ανήκει στην υπεροικογένεια TNF/NGF, επάγει την ταχεία φωσφορυλίωση της παξιλλίνης. Το αποτέλεσμα αυτό παρεμποδίζεται από την κυτοχλασίνη B, η οποία αποδιοργανώνει την κυτταροσκελετική συγκρότηση (Khan et al 1995, Melamed et al 1995). Επίσης, η επαγόμενη από τον TGFβ1 (transforming growth factor) φωσφορυλίωση της FAK και της παξιλλίνης των ινοβλαστών, καθώς και η ενεργοποίηση της MAP κινάσης, αναστέλλονται από την αποδιατακτική δράση της κυτοχλασίνης B (Moustakas and Stournaras 1999, Burrridge et al 1992, Chen et al 1994, Rosales et al 1995). Στο πλαίσιο των παραπάνω παρατηρήσεων, η οφειλόμενη στη δράση της κυτοχλασίνης B, πάνω στα GEC, αναστολή της φωσφορυλίωσης υποδηλώνει ότι η ακεραιότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης αποτελεί προϋπόθεση για τη μετάδοση σήματος από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα του TNFα. Εάν η άποψη θεωρηθεί σωστή, τότε η ταχεία αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης μπορεί να είναι ένα σημαντικό βήμα, στο μηχανισμό που ελέγχει την οδό της μεταγωγής σήματος της απόκρισης του TNFα.

Η χρονολογική σύμπτωση του σχηματισμού των εστιακών προσφύσεων και των ινιδίων stress υπαινίσσεται ότι, ο πολυμερισμός της G-ακτίνης και η συγκρότηση των εστιών πρόσφυσης μπορεί να αντιπροσωπεύουν διακριτές δράσεις ενός κοινού ρυθμιστικού μορίου. Η δυναμική ισορροπία του πολυμερισμού της ακτίνης ελέγχεται και από έναν άλλο μοριακό μηχανισμό, ο οποίος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών της υπεροικογένειας Ras, μέσω των οποίων ο κυτταροσκελετός της ακτίνης συμμετέχει στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνυμάτων (Dartsch et al 1994, Symons 1996, Machesky and Hall 1997, Hall 1998, Moustakas and Stournaras 1999, Papakonstanti et al 2000b). Η οικογένεια των Rho GTPασών, η οποία ανήκει στην

υπεροικογένεια Ras, συμμετέχει στο σχηματισμό των εστιών πρόσφυσης (Ridley and Hall 1992, Ridley and Hall 1994, Burrige and Chrzanowska - Wodnicka 1996, Flinn and Ridley 1996, Tapon and Hall 1997, Moustakas and Stournaras 1999).



**Εικόνα 18.** TNF $\alpha$  επαγόμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Διερευνήσαμε την υπόθεση ότι η Rho B πρωτεΐνη αποτελεί το κοινό ρυθμιστικό μόριο του συγχρονισμένου πολυμερισμού της ακτίνης και της συγκρότησης των εστιακών προσφύσεων σε GEC, μετά έκθεση τους σε TNF $\alpha$ . Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της Rho B πρωτεΐνης, μετά από επώαση με TNF $\alpha$  επί 4 και 24 ώρες, παρέμειναν αμετάβλητα (εικόνα 12C). Το αρνητικό αυτό αποτέλεσμα δεν μπορεί να αποκλείσει μεταβολές της ενεργότητας της μικρής αυτής GTPάσης, αλλά αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο της ύπαρξης ενός μηχανισμού ανεξάρτητου της Rho B, ο οποίος εμπλέκεται στη δράση του TNF $\alpha$  στην κατάσταση πολυμερισμού της ακτίνης και της τυροσινικής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών FAK και παξιλλίνης.



Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν ότι σε GEC ο TNF $\alpha$  επάγει δράσεις, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους, είναι θεμελιώδους σημασίας για την οργάνωση του κυτταροσκελετού και τη μεταφορά μηνυμάτων και περιλαμβάνουν: α) αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, de novo βιοσύνθεση ακτίνης και πολυμερισμό της G-ακτίνης, β) τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK, της παξιλλίνης και της βινκουλίνης και γ) αύξηση του κυτταρικού όγκου (εικόνα 18). Η μεταφορά των πειραματικών αυτών παρατηρήσεων σε κλινικό επίπεδο και η σχέση τους με την παθογένεια νοσολογικών οντοτήτων είναι επικίνδυνη και πρέπει να γίνεται με πολύ προσοχή. Δεδομένης όμως της σημασίας, που έχουν τα φαινόμενα αυτά, για την πρόσφυση των κυττάρων στο υπόστρωμα τους, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι αλληλοεπιδράσεις TNF $\alpha$  - GEC - κυτταροσκελετού μπορεί να είναι σχετικές με την παθογένεια λευκωματινουρικών σπειραματοπαθειών, στις οποίες αυξημένη σπειραματική έκφραση του TNF $\alpha$  συνοδεύεται από διάταραχή της πρόσφυσης των ποδοκυττάρων στη βασική σπειραματική μεμβράνη.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το γενικό συμπέρασμα, που προέκυψε από την παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι ότι η έκθεση των πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (ποδοκυττάρων – GEC) στην επίδραση του TNF $\alpha$  προκαλεί ουσιαστικές μεταβολές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, των εστιακών προσφύσεων και του κυτταρικού όγκου.

Συγκεκριμένα:

- 1) Οι μορφολογικές παρατηρήσεις, με ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία συνεστίασης, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο TNF $\alpha$  προκάλεσε αναδιοργάνωση και ανακατανομή των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Το φαινόμενο αποδόθηκε σε έναν ταχύ πολυμερισμό της G- προς F-ακτίνη, όπως διαπιστώθηκε από την ανεύρεση μειωμένου λόγου G/ολικής ακτίνης, και ερμηνεύθηκε ως μια ενδεχόμενη απόπειρα σταθεροποίησης του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Επιπλέον όμως, διαπιστώθηκε ότι ο TNF $\alpha$  επάγει την de novo βιοσύνθεση της ακτίνης, γεγονός που υποδηλώνει ενεργοποίηση γενωμικού μηχανισμού, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την παρατεταμένη διάρκεια του φαινομένου.
- 2) Η επαγωγή της τυροσινικής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών των εστιακών προσφύσεων βινκουλίνης, FAK και παξιλλίνης, χωρίς μεταβολή των επιπέδων έκφρασης τους, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο TNF $\alpha$ , πέραν της δράσης του στην δυναμική κατάσταση του πολυμερισμού της ακτίνης και παράλληλα προς αυτήν, προκαλεί και αναδιοργάνωση της συγκρότησης των εστιακών προσφύσεων.
- 3) Ο πολυμερισμός της G-ακτίνης και η αναδιοργάνωση των εστιακών προσφύσεων εμφανίζονται ως αλληλένδετα φαινόμενα. Η αναστολή της

τυροσινικής φωσφορυλίωσης με γενιστεΐνη παρεμποδίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης και την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων αφετέρου, η αναστολή του πολυμερισμού με κυτοχλασίνη Β οδήγησε σε μείωση των επιπέδων τυροσινικής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών FAK και παξιλλίνης.

- 4) Η χρονολογική σύμπτωση και η διαφαινόμενη συσχέτιση πολυμερισμού της G-ακτίνης και αναδιοργάνωσης των εστιακών προσφύσεων επιτρέπει την υπόθεση της ύπαρξης ενός μη γενωμικού μηχανισμού μεταβίβασης σήματος, ο οποίος, διαμέσου πρόσδεσης του TNFα στον μεμβρανικό του υποδοχέα και κατά την ακόλουθη αλληλουχία, επάγει: α) την ταχεία τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK, β) την τυροσινική φωσφορυλίωση της παξιλλίνης από την FAK, γ) την ανασυγκρότηση και σταθεροποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από την παξιλλίνη, δ) την αναδιοργάνωση των εστιών πρόσφυσης διαμέσου τυροσινικής φωσφορυλίωσης της βινκουλίνης από την FAK. Τα αποτελέσματα αυτά της δράσης του TNFα συντηρούνται στη συνέχεια, μέσω ενός γενωμικού μηχανισμού de novo σύνθεσης ακτίνης.
- 5) Η μελέτη της Rho B, μιας μικρής GTPάσης, η οποία είναι γνωστόν ότι εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, έδειξε ότι ο TNFα δεν επάγει την έκφραση της Rho B πρωτεΐνης. Στη μελέτη μας δεν αποκλείστηκε το ενδεχόμενο ο TNFα να μεταβάλει την ενεργοποίηση της Rho B παραμένει όμως ανοικτό και το ενδεχόμενο ο TNFα να ενεργοποιεί άλλον, ανεξάρτητο της Rho B, μηχανισμό.
- 6) Τέλος, ο TNFα προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού όγκου των GEC, η οποία αποτελεί μια μάλλον καθυστερημένη απόκριση στη δράση του TNFα. Το συμπέρασμα, στο οποίο με επιφύλαξη καταλήγουμε, είναι ότι η αύξηση του κυτταρικού όγκου μπορεί να συσχετίζεται με τη γενωμικά επαγόμενη de novo σύνθεση της ακτίνης. Σε μια τέτοια περίπτωση η αύξηση του κυτταρικού όγκου θα μπορούσε να αποτελέσει το έναυσμα για περαιτέρω μορφολογικές και λειτουργικές διαταραχές του κυττάρου. Πάντως, η μελέτη του κυτταροπολλαπλασιασμού και της κυτταρικής απόπτωσης δεν απεκάλυψε επίδραση του TNFα στις δύο αυτές παραμέτρους κυτταρικής λειτουργίας.

- 7) Στο σύνολο τους, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επιτρέπουν το συμπέρασμα ότι οι TNFα – επαγόμενες διαταραχές, οι οποίες διαπιστώθηκαν στο κυτταρικό μας σύστημα, ενδέχεται να αποτελούν το μοριακό υπόβαθρο των μορφολογικών και λειτουργικών διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζουν τις λευκωματινουργικές σπειραματοπάθειες. Η υπερέκφραση σπειραματικού TNFα στις σπειραματοπάθειες αυτές θα μπορούσε να είναι μέρος του μηχανισμού, ο οποίος προκαλεί ή/και συντηρεί τη σπειραματική βλάβη.

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ακεραιότητα του φραγμού διήθησης των σπειραματικών τριχοειδών, ο οποίος παρεμποδίζει τη διήθηση μακρομορίων, εξαρτάται, σε σημαντικό βαθμό, από την αρτιότητα της πρόσφυσης των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων (ποδοκυττάρων) στη βασική σπειραματική μεμβράνη. Εξάλλου, η πρόσφυση των ποδοκυττάρων εξαρτάται από την ακεραιότητα του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζεται από ειδικές συνδεόμενες με την ακτίνη πρωτεΐνες. Δεδομένου ότι ορισμένες σπειραματοπάθειες που χαρακτηρίζονται από βαριά λευκωματινουρία, συνοδεύονται από αυξημένη έκφραση του σπειραματικού TNF $\alpha$ , μελετήσαμε την επίδραση του TNF $\alpha$  στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, σε καλλιέργειες κυτταρικής σειράς ποδοκυττάρων αρουραίου.

Όπως διαπιστώθηκε με άμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία συνεστίασης, η επώαση των ποδοκυττάρων με 10 ng/ml TNF $\alpha$ , για χρονικά διαστήματα από 5 λεπτά έως 24 ώρες, προκάλεσε εκσημασμένη αύξηση της πυκνότητας και ανακατανομή των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε με ποσοτικό βιοχημικό προσδιορισμό του κλάσματος G/ολικής ακτίνης και της de novo σύνθεσης ακτίνης. Πράγματι, διαπιστώθηκε μια σημαντική, ταχείας έναρξης και παρατεταμένη μείωση του λόγου G/ολικής ακτίνης, ενδεικτική πολυμερισμού της G- προς F-ακτίνη, αλλά και de novo σύνθεση ακτίνης.

Παράλληλα με τον πολυμερισμό της ακτίνης, ο TNF $\alpha$  προκάλεσε μια ταχέως επαγόμενη τυροσινική φωσφορυλίωση της παξιλλίνης και της κινάσης των εστιακών προσφύσεων (FAK), χωρίς να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών. Επίσης, η διαπιστωθείσα τυροσινική φωσφορυλίωση της βινκουλίνης

απετέλεσε ένδειξη ότι, η πρωτεΐνη αυτή των εστιακών προσφύσεων, συμμετέχει στην παρατηρούμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Επιπλέον, η αναστολή της τυροσινικής φωσφορυλίωσης με γενιστεΐνη αναστέλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TNFα.

Τέλος, πέραν των προαναφερόμενων μεταβολών, η έκθεση των ποδοκυττάρων σε TNFα οδηγεί σε αύξηση του κυτταρικού τους όγκου, χωρίς όμως να επηρεάζει τον κυτταροπολλαπλασιασμό ή την κυτταρική απόπτωση.

Συμπεραίνουμε ότι, στο κυτταρικό μας σύστημα, ο TNFα επάγει μια σημαντική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των εστιακών προσφύσεων. Τα δύο αυτά φαινόμενα, τα οποία συμπίπτουν χρονικά, συνοδεύονται από μια άμεση, TNFα-επαγόμενη, τυροσινική φωσφορυλίωση της FAK και της παξιλλίνης. Δεδομένου ότι, όπως είναι γνωστό, οι δύο αυτές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης και τη συγκρότηση των εστιακών προσφύσεων, θεωρούμε πολύ πιθανό ότι εμπλέκονται ευθέως στην παρατηρούμενη αναδιάταξη της ακτίνης.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επιτρέπουν το συμπέρασμα ότι οι επαγόμενες από τον TNFα διαταραχές, οι οποίες διαπιστώθηκαν στο κυτταρικό μας σύστημα, ενδέχεται να αποτελούν το μοριακό υπόβαθρο των διαταραχών της πρόσφυσης των ποδοκυττάρων στη βασική σπειραματική μεμβράνη, οι οποίες χαρακτηρίζουν τις σπειραματοπάθειες με βαριά λευκωματινουρία. Η υπερέκφραση του σπειραματικού TNFα, η οποία έχει διαπιστωθεί στις σπειραματοπάθειες αυτές θα μπορούσε να είναι μέρος του μηχανισμού, που προκαλεί ή/και συντηρεί τη σπειραματική βλάβη.

## 7. SUMMARY

Glomerular permeability for macromolecules depends partially on proper attachment of the glomerular epithelial cells (GEC) to the glomerular basement membrane (GBM). The latter requires integrity of the actin cytoskeleton, which in turn is regulated by specific actin – associated proteins. Since several glomerulopathies characterized by heavy proteinuria are associated with increased glomerular tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expression, we studied the interaction of TNF- $\alpha$  with the actin cytoskeleton of cultured rat GEC. Incubation of GEC with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for variable time periods ranging from 15 min to 24 hr demonstrated a marked accentuation and redistribution of actin microfilaments, as shown by direct fluorescence analysis and confocal laser scanning microscopy. Quantitative biochemical determination of the G/total – actin ratio confirmed the above observations. Indeed, this ratio was significantly reduced, indicating substantial polymerization of G-actin and formation of F-actin. Concurrently, TNF- $\alpha$  rapidly induced tyrosine phosphorylation of both paxillin and focal adhesion kinase, without affecting the expression levels of these two proteins. In addition, tyrosine phosphorylation of vinculin became evident, indicating involvement of this focal adhesion marker in the observed actin reorganization. Inhibition of tyrosine phosphorylation by genistein prevented the reorganization of the actin cytoskeleton by TNF- $\alpha$ . We conclude that TNF- $\alpha$  induces substantial reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesion. These effects occur simultaneously, with a prominent TNF- $\alpha$  – induced tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase, indicating that these proteins, shown to regulate actin polymerization and formation of focal adhesions, may be directly involved in the mechanism controlling the observed actin redistribution. We studied effects of TNF $\alpha$  upon the proliferation, cell volume and apoptosis glomerular epithelial cells. Incubation of GEC evidence with TNF- $\alpha$  (10

ng/ml) for 15 min, 2h, 4h and 24h increased of cell volume, while there is not evidence proliferation and apoptosis. These findings suggest that the observed TNF- $\alpha$ -actin cytoskeleton interactions may relate to the pathogenesis of glomerulopathies with heavy proteinuria, in which increased glomerular expression of TNF- $\alpha$  is associated with disturbances in the attachment of podocytes to the GBM.



## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abrahamson DR. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. Am J Physiol 253(5 Pt 2): F783-794 1987**
- Adler S. Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. Am J Pathol 141(3): 571-578, 1992
- Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. Ann Rheum Dis. 59 Suppl 1: i6-16, 2000
- Akiyama T and Ogawara H. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. Methods Enzymol 201: 362-370, 1991
- Albelda SM and Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J 4(11): 2868-2880, 1990
- Allegri L, Brianti E, Chatelert F, Manara GC, Ronco P, Verroust P. Polyvalent antigen-antibody interactions are required for the formation of electron – dense immune deposits in passive Heymann’s nephritis. Am J Pathol 126: 1-6, 1986
- Andrews P. Morphological alterations of the glomerular (visceral) epithelium in response to pathological and experimental situations. J Electron Microscop Tech. 9(2): 115-144, 1988
- Anfosso F, Bardin N, Frances V, Vivier E, Camoin-Jau L, Sampol J and Dignat-George F. Activation of human endothelial cells via S-endo-1-antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125<sup>FAK</sup>. J Biol Chem 273: 26852-26856, 1998
- Annis D and Bader MF. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. J Exp Biol 139: 253-266, 1988
- Barisoni L, Mokrzycki M, Sablay L, Nagata M, Yamase H, Mundel P. Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. Kidney Int.

58(1): 137-143, 2000

- Bellis SL, Miller JT, Turner CE. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 270 (29): 17437-17441, 1995
- Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* 57: 505-518, 1988
- Beutler B, Greenwald D, Hulmer JD, Chang M, Pan Y-CE, Mathison J, Ulvetich R, Cerami A. Identify of tumor necrosis factor and macrophage secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552-554, 1985
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendick DL, Cotrn RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9238-9242, 1987
- Blikstad I, Markey F, Carlsson L, Person T, Lindberd U. Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I. *Cell* 15: 935-943, 1978
- Bonder EM, Fishkind DJ, Mooseker MS. Direct Measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* 34(2): 491-501, 1983
- Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol.* 234(6): F455-460, 1978
- Brett J, Gerlach H, Nawaroth P, Steingerg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins *J Exp Med* 169: 1977-1991, 1989.
- Brown M, Perrotta JA and Turner CE. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* 135: 1109-1123, 1996
- Broxmeyer HE, Williams DE, Lu L, Cooper S, Anderson SL, Beyer GS, Hoffman R, Rubin BY. The suppressive influences of human tumor necrosis factors on

- bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donor and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-gamma. *J Immunol* 15; 136(12): 4487-4495, 1986
- Bucala R, Rixchilin C, Winchester R, Cerami A. Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 173: 569-574, 1991
- Burgess LT and Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann Rev Cell Biol* 3: 243-293, 1987
- Burridge K and Mangeat P. An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308(5961): 744-746, 1984
- Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 4: 487-525, 1988
- Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125 FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 119 (4): 893-903, 1992
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463-518, 1996.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M and Zhong C. Focal adhesion assembly. *Trends Cell Biol* 7: 342-347, 1997
- Bussolino F, Camussi G, Aglietta M, Braquet P, Bosia A, Pescarmona G, Sanavio F, D'Urso N, Marchisio PC. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. platelet - activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol* 1; 139(7): 2439-2446, 1987
- Cable HC, El-Mansoury A and Morgan NG. Activation of alpha-2-adrenoreceptors results in an increase in F-actin formation in HIT-T15 pancreatic B-cells. *Biochem J* 307: 169-174, 1995
- Calalb MB, Polte TR and Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15: 954-963, 1995

- Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 28; 275(30): 22607-22610, 2000
- Camussi G, Turello E, Bussolino F, Baglioni C. Tumor necrosis factor alters cytoskeletal organization and barrier function of endothelial cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 96: 84-91, 1991
- Camussi G, Mariano F, Biancone L, Montrucchio G, Vercellone A. Effect of cytokines on the cytoskeleton of resident glomerular cells. *Kidney Int* 43 (39): S-32-S-36, 1993
- Cantiello HF, Stow JL, Prat AG and Ausiello DA. Actin filaments regulate epithelial Na<sup>+</sup> channel activity. *Am J Physiol* 261: C882-C888, 1991
- Cantiello HF. Actin filaments stimulate the Na(+)-K(+)-ATPase. *Am J Physiol* 269: F637-F643, 1995
- Carrier MF. Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol* 115: 139-170, 1989
- Chen P, Xie H, Sekar MC, Gupta K, Wells A. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J Cell Biol* 127(3):847-57, 1994
- Chouaid S, Branellec D, Buurman WA. More insights into the complex physiology of TNF. *Immunol Today* 12: 141-142, 1991
- Chrzanowska-Wodnicka M and Burridge K. Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation. *J Cell Science* 107: 3643-3654, 1994
- Clark EA and Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268: 223-239, 1995
- Clark MA, Chen JM, Croke ST, Bomanlaski JS. Tumor necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem J.* 250: 125-132, 1988
- Clark SW, Meyer DI. Centractin is an actin homologue associated with the

- centrosome. *Nature* 359: 246-250, 1992
- Conti P, Dempsey RA, Reale M, Barbacane RC, Panara MR, Bongrazio M, Mier JW. Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumor necrosis factor and interleukin-6. *Immunology* 73: 450-456, 1991
- Cox D, Chang P, Kurosaki T and Greenberg S. Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* 271: 16597-16602, 1996
- Craig SW, Johnson RP. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol.* 8(1):74-85, 1996
- Cybalsky AV, Goodyer PR, Cyr MD, McTavish AJ. Eicosanoids enhance epidermal growth factor receptor activation and proliferation in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol.* 262(4 Pt 2): F639-46, 1992
- Dartsch PC, Ritter M, Haussinger D and Lang F. Cytoskeletal reorganization in NIH 3T3 fibroblasts expressing the ras oncogene. *Eur J Cell Biol* 63: 316-325, 1994
- Dartsch PC, Ritter M, Gschwentner M, Lang HJ, Lang F. Effects of calcium channel blockers on NIH 3T3 fibroblasts expressing the Ha-ras oncogene. *Eur J Cell Biol* 67(4):372-8, 1995
- Dayer J-M, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: stimulates collagenase and prostaglandin E2 by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162: 2163-2168, 1985
- Deen WM, Bohrer MP, Brenner BM. Macromolecule transport across glomerular capillaries. Application of pore theory. *Kidney International* 16, 353-365, 1979
- DeForge LE, Nguyen TN, Kunkel SL, Remick DG. Relation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. *J Lab Clin Med* 116: 429-438, 1990
- Ding G, Franki N, Condelis J and Hays RM. Vasopressin depolymerizes F-actin in toad bladder epithelial cells. *Am J Physiol* 260: C9-C16, 1991
- Drenckhahn D and Franke RP Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab*

- Invest. 59(5): 673-682, 1988
- Exley AR, Cohen J, Buurman W, Owen R, Hanson G Lumley J Aukakh JM, Bodmer M, Riddell A, Stephens S, Perry M. Monoclonal antibody to TNF in severe septic shock. *Lancet* 335: 1275-1276, 1990
- Farquhar MG, Wissing SL, Palade GE. Glomerular permeability: I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *J Exp Med* 113: 47-66, 1961
- Faulstich H, Merkler I, Blackholm H, Stournaras C. Nucleotide in monomeric actin regulates the reactivity of the thiol groups. *Biochemistry* 23: 1608-1612, 1984
- Faulstich H, Trischmann H, Mayer D. Preparation of tetramethylrhoadaminyl-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis. *Exp Cell Res* 144(1): 73-82, 1983
- Flinn HM Ridley AJ. Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J Cell Science* 109: 1133-1141, 1996
- Foidart JB, Pirard YS, Winand RJ, Mahieu PR. Tissue culture of normal rat glomeruli: Glycosaminoglycan biosynthesis by homogeneous epithelial and mesangial cell populations. *Renal Physiol* 3: 169-173, 1980
- Fox GL, Rebay I, Hynes RO. Expression of DFak56, a Drosophila homolog of vertebrate focal adhesion kinase, supports a role in cell migration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21; 96(26): 14978-14983, 1999
- Freiden C, Patane K. Mechanism for nucleotide exchange in monomeric actin. *Biochemistry* 27(10): 3812-3820, 1988
- Fries JW, Sandstrom DJ, Meyer TW, Rennke HG. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest* 60(2): 205-218, 1989
- Gershman LC, Selden LA, Estes JE. High affinity binding of divalent cation to actin monomer is much stronger than previously reported. *Biochem Biophys Res Commun* 135(2): 607-614, 1986
- Goldblum SE, Henning B, Jay M, Yoneda K, McClain CJ. Tumor necrosis factor - $\alpha$  induced pulmonary vascular endothelial injury. *Infect Immun* 57: 1218-1226, 1989

- Goldblum SE, Sun WL. Tumor necrosis factor  $\alpha$  augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol* 258 (Lung Cell Mol Physiol 2): L57-L67, 1990
- Gomez-Chiarri M, Ortiz A, Lerma JL, et al. Involvement of tumor necrosis factor and platelet activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. *Lab Invest* 70: 449-459, 1994
- Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul.* 2(11): 951-964, 1991
- Guan JL and Shalloway D. Regulation of focal adhesion associated protein tyrosine kinase by both cell adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 358: 690-692, 1992
- Gumbiner BM. Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11: 551-564, 1993
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514, 1998
- Hallows KR, Law FY, Packman CH, Knauf PA. Changes in cytoskeletal actin content, F-actin distribution, and surface morphology during HL-60 cell volume regulation. *J Cell Physiol* 167(1):60-71, 1996
- Herman IM. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5: 48-55, 1993
- Hesketh JE and Pryme IF. Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. *Biochem J* 277: 1-10, 1991
- Hitt AL, Luna EJ. Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 6(1):120-30, 1994
- Hruby ZW, Shirota K, Jothy S, Lowry RP. Antiserum against tumor necrosis factor- $\alpha$  and a protease inhibitor reduce immune glomerular injury. *Kidney Int* 40(1):43-51, 1991
- Huang TW and Langlois JC. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J Exp Med* 1; 162(1): 245-267, 1985
- Huang ZJ, Haugland RP, You WM, Haugland RP. Phallotoxin and actin binding assay by fluorescence enhancement. *Anal Biochem* 200(1): 199-204, 1992
- Hunziker W and Mellman I. Relationships between sorting in the exocytic and

- endocytic pathways of MDCK cells. *Semin Cell Biol* 2: 397-410, 1991
- Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration--movin' on. *Science*. 5:1102-1103, 1999
- Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 1; 50(3): 184-195, 2000
- Jaattela M: Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin. *Lab Invest* 64: 724-742, 1991
- Jessen F, Hoffmann EK. Activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransport system by reorganization of the actin filaments in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 5;1110(2):199-201, 1992
- Kanwar YS, Farquhar MG. Detachment of endothelium and epithelium from the glomerular basement membrane produced by kidney perfusion with neuraminidase. *Lab Invest* 42: 375-384, 1980
- Kashgarian M. Morphologic Evaluation of immune renal disease. Int: Neilson EG, Couser WG (eds). *Immunologic Renal Diseases*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 837-860, 1997
- Kazatchkine MD, Fearon DT, Appay MD, Mandet C, Bariety J. Immunohistochemical study of the human glomerular C3b receptor in normal kidney and in 75 cases of renal diseases. *J Clin Invest* 69: 900-912, 1982
- Kerjaschki D, Farquhar MG. Immunocytochemical localization of the Heymann antigen (gp 330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 157: 667-686, 1983
- Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin – the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98: 1591-1596, 1984
- Kerjaschki D. Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int* 45(2):300-313, 1994
- Khan MA, Okumura N, Okada M, Kobayashi S, Nakagawa H. Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of paxillin in PC12h cells. *FEBS Lett* 362: 201-204, 1995
- Khaitlina SY. Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol*. 202: 35-98,



2001

- Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* (4827): 638-644, 1987
- Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 25; 267(33): 23439-23442, 1992
- Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Margioris AN, Gravanis A and Stournaras C. Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: Evidence for nongenomic action involving cAMP turnover. *J Cell Biochem* 62: 251-261, 1996
- Koukouritaki SB, Margioris AN, Gravanis A, Hartig R and Stournaras C. Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis. *J Cell Biochem* 65: 1-9, 1997
- Koukouritaki SB, Vardaki EA, Papakonstanti EA, Lianos E, Stournaras C, Emmanouel DS. TNF $\alpha$  induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase. *Mol Medicine* 5(6): 382-392, 1999
- Kreis T and Vale R (editors) *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins.* Oxford University Press, 1993
- Kriz W, Elger M, Nagata M, et al. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int* 45 (suppl 45): S64-S72, 1994
- Kriz W, Hahnel B, Rosener S, Elger M. Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 48(5): 1435-1450, 1995
- Kubler E, Riezman H. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* 12(7):2855-2862, 1993
- Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG. The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am J Pathol.* 141(4): 805-816, 1992

- Lang F, Ritter M, Woll E, Weiss H, Haussinger D, Hoflacher J, Maly K, Grunicke H. Altered cell volume regulation in ras oncogene expressing NIH fibroblasts. *Pflugers Arch* 420(5-6):424-7, 1992
- Lazarides E. Biochemical and immunocytological characterization of intermediate filaments in muscle cells. *Methods Cell Biol.* 25 Pt B: 333-357, 1982
- Less Miller JP, Helfman DM, Shroer TA. A vertebrate actin related proteins is a component of a multisubunit complex involved in microtubule based vesicle motility. *Nature* 359: 244-246, 1992b
- Leventhal PS and Feldman EL. The tyrosine kinase inhibitor methyl 2,5-dihydroxycinnamate disrupts changes in the actin cytoskeleton required for neurite formation. *Brain Res Mol Brain Res* 43: 338-340, 1996
- Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125 FAK in platelets. *J Cell Biol* 119 (4): 905-912, 1992
- Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kioussis WB, Pfaff M, Ginsberg MH. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses, *Nature*, 402: 676-681, 1999
- Liu ZY, Ganju RK, Wang J-F, Ona MA, Hatch WC, Zheng T, Avraham S, Gill P, Groopman JE. Cytokine signalling through the novel tyrosine kinase RAFTK in Kaposi's sarcoma cells. *J Clin Invest* 99 (7): 1798-1804, 1997
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 23; 104(4): 487-501, 2001
- Luna EJ and Hitt A. Cytoskeleton-plasma membrane interactions, *Science*, 258: 955-964, 1992
- Machesky LM and Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 138: 913-926, 1997
- Maher JJ. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 91(5): 2244-2252, 1993

- Melamed I, Downey GP, Roifman CM. Tyrosine phosphorylation is essential for microfilament assembly in B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 176 (3): 1424-1429, 1991
- Melamed I, Turner CE, Aktories K, Kaplan DR, Gelfand EW. Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *J Exp Med* 181: 1071- 1079, 1995
- Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis* 163(1): 78-82, 1991
- Mendrick DL, Rennke HG. Epitope specific induction of proteinuria by monoclonal antibodies. *Kidney Int* 33(4):831-42, 1988
- McCarthy ET, Sharma R, Sharma M, Li JZ, Ge XL, Dileezpan KN, Savin VJ. TNF- $\alpha$  increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 9 (3): 433,438, 1998
- Mils JW, Schwiebert EM and Stanton BA. The cytoskeleton and membrane transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3: 529-534, 1994
- Molony L, Armstrong L. Cytoskeletal reorganization in human umbilical vein endothelial cell as a result of cytokine exposure. *Exp Cell Res* 196: 40-48, 1991.
- Moustakas A, Theodoropoulos PA, Gravanis A, Haussinger D, Stournaras C. The cytoskeleton in cell volume regulation. *Contrib Nephrol* 123: 121-134, 1998
- Moustakas A and Stournaras C. Regulation of actin organization by TGF- $\beta$  in H-ras transformed fibroblasts. *J Cell Sci* 112: 1169-1179, 1999
- Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol* 192(5): 385-97, 1995
- Nagata M and Kriz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int* 42(1): 148-160, 1992
- Neale TJ, Ruger BM, Macaulay H, Dunbar PR, Hasan Q, Bourke A, Murray-McIntosh RP, Kitching AR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is expressed by

- glomerular visceral epithelial cells in human membranous nephropathy. *Am J Pathol* 146: 1444-1454, 1995
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 11; 13(17): 6361-73, 1985
- Nelson WJ. Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells, *Semin. Cell Biol* 2: 375-385, 1991
- Nolan K, Lacoste J and Parsons JT. Regulated expression of focal adhesion kinase-related nonkinase, the autonomously expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase, *Mol Cell Biol*. 19: 6120-6129, 1999
- Ozen S, Saatci U, Tinaztepe K, Bakkaloglou A, Barut A. Urinary tumor necrosis factor levels in primary glomerulopathies. *Nephron* 66(3): 291-294, 1994
- Owen JD, Ruest PJ, Fry DW and Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 19: 4806-4818, 1999
- Palmer RH, Fessler LI, Edeen PT, Madigan SJ, McKeown M, Hunter T. DFak56 is a novel *Drosophila melanogaster* focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 10; 274(50): 35621-35629, 1999
- Papadakis KA and Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 6(4): 303-313, 2000a
- Papadakis KA and Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology*. 119(4): 1148-1157, 2000b
- Papakonstanti EA, Emmanouel DS, Gravanis A, Stournaras C. Na<sup>+</sup>/Pi co-transport alters rapidly cytoskeletal protein polymerization dynamics in opossum kidney cells. *Biochem J* 315: 241-247, 1996
- Papakonstanti EA, Bakogourgou E, Castanas E, Emmanouel DS, Harting R, Stournaras C. Early alterations of actin cytoskeleton in OK Cells by opioids. *J*

Cell Biochem 70: 60-69, 1998

- Papakonstanti EA, Vardaki EA, Stournaras C. Actin Cytoskeleton: A Signaling Sensor in Cell Volume Regulation. *Cell Physiol Biochem* 10: 257-264, 2000
- Papakonstanti EA, Emmanouel DS, Gravanis A, Stournaras C. PLC-gamma1 signaling pathway and villin activation are involved in actin cytoskeleton reorganization induced by Na<sup>+</sup>/Pi cotransport up-regulation. *Mol Med* 6(4):303-18, 2000b
- Parsons JT and Parsons SJ. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 187-192, 1997
- Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement, *Oncogene* 19: 5606-5613, 2000
- Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, Burrridge K. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans* 19 (4): 1065-1069, 1991
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 2; 312(5996): 724-729, 1984
- Pollard TD, Cooper JA. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55: 987-1035, 1986
- Pollard TD. Actin. *Curr Opin Cell Biol*. 2(1): 33-40, 1990
- Price CJ, Brindle NP. Vasodilator-stimulated phosphoprotein is involved in stress-fiber and membrane ruffle formation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(9): 2051-2056, 2000
- Pumiglia KM, Lau L-F, Huang C-K, Burroughs S, Feinstein MB. Activation of signal transduction in platelets by the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hydroperoxide). *Biochem J* 286: 441-449, 1992
- Rafiee P, Lee JK, Leung CC, Raffin TA. TNF $\alpha$  induces tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in adherent human neutrophils. *J Immunol*

154 (9): 4785-4792, 1995

- Rankin S and Rozengurt E. Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (pp125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 269: 704-710, 1994
- Remick DG, Nguyen DT, Eskandari MK, Strieter RM, Kunkel SL. Cyclosporine A inhibits TNF production without decreasing TNF mRNA levels. *Biochem Biophys Res Commun* Jun 15; 161(2): 551-555, 1989
- Rennke HG. How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int* 45: S58-S63, 1994
- Richardson A, Parsons T. A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Nature*. 11; 380: 538-540, 1996
- Ridley AJ and Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399, 1992
- Ridley AJ and Hall A. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J* 13: 2600-2610, 1994
- Ritter M, Dartsch P, Waldegger S, Haller T, Zwierzina H, Lang HJ, Lang F. Effects of bradykinin on NIH 3T3 fibroblasts pretreated with lithium. Mimicking events of Ha-ras oncogene expression. *Biochim Biophys Acta* 21;1358(1):23-30, 1997
- Rodriguez-Fernandez JL. Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? *BioEssays* 21: 1069-1075, 1999
- Rollason TP, Brewer DB. A study of glomerular basement membrane anionic sites and glomerular visceral epithelial cell coat in protein overload proteinuria in the rat. *J Pathol* 142: 301-316, 1984
- Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242: 77-98, 1995
- Rozengurt E. Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth

- factors and oncogenes. *Cancer Surv* 24: 81-96, 1995
- Rozengurt E and Rodriguez-Fernandez. Tyrosine phosphorylation of p125<sup>FAK</sup>, p130<sup>CAS</sup> and paxillin in the action of integrins, neuropeptides, bacterial toxins and growth factors. In: Maruta H, editor. *G proteins, cytoskeleton and cancer*. Austin, TX: RG Landes Bioscience, 79-100, 1998
- Sako Y and Kusumi A. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J Cell Biol* 125: 1251-1264, 1994
- Savin VJ, Sharma R, Sharma MS, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenty F. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 4; 334(14): 878-883, 1996
- Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D, Farquhar MG. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol* 125(2): 309-318, 1986
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 130: 1181-1187, 1995
- Schaller MD and Parsons JT. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6: 705-710, 1994
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1; 89(11): 5192-5196, 1992
- Schlaepfer DD, Hunter T. Signal transduction from the extracellular matrix--a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell Struct Funct.* 21(5): 445-450, 1996
- Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Progr Biophys Mol Biol* 71: 435-478, 1999
- Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein Z0-1 is concentrated along the slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell*

- Biol 111: 1255-1263, 1990
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:549-99, 1995
- Schwob E, Martin RP. New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. *Nature* 355: 179-182, 1992
- Seiler MW, Venkatachalam MA, Cotran RS. Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science.* 1; 189(4200): 390-393, 1975
- Seufferlein T and Rozengurt E. Sphingosylphosphorylcholine rapidly induces tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin, rearrangement of the actin cytoskeleton and focal contact assembly. *J Biol Chem* 270 (41): 24343-24351, 1995
- Shankland SJ, Eitner F, Hudkins KL, Goodpaster T, D'Agati V, Alpers CE. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation. *Kidney Int* 58(2): 674-683, 2000
- Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach MJ. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res* 51: 657-661, 1982
- Sheehan B, Fuller SD, Pique ME and Yeager M. AVS software for the visualization in molecular microscopy. *J Struct Biol* 116: 99, 1996
- Shen Y, Schaller MD. Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell* 10(8): 2507-2518, 1999.
- Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 112 (Pt 16): 2677-2691, 1999
- Smith RA and Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 25; 262(15): 6951-6954, 1987
- Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, Goodwin RG. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science.* 25; 248 (4958): 1019-



1023, 1990

- Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W, Pober JS. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* 123: 16-24, 1986
- Stossel TP, Chaponnier C, Ezzell RM, Hartwig JH, Janmey PA, Kwiatkowski DJ, Lind SE, Smith DB, Southwick FS, Yin HL, et al. Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1: 353-402, 1985
- Stournaras C, Stiakaki E, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Kalmanti M, Fostinis Y, Gravanis A. Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem Pharmacol* 52: 1339-1346, 1996
- Striker GE, Striker LJ. Biology of disease: Glomerular cell culture. *Lab Invest* 53: 122-131, 1985
- Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis* 21(3): 251-259, 1993
- Symons M., Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci* 21: 178-181, 1996
- Tabibzadeh S, Kong QF, Kapur S, Satyaswaroop PG, Aktories K. Tumor necrosis factor-alpha mediated dyscohesion of epithelial cells is associated with disordered expression of cadherin / $\beta$ -catenin and disassembly of actin filaments. *Hum Reprod* 10 (4): 994-1004, 1995
- Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med* 182: 1089-1100, 1995
- Tapon N and Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9: 86-92, 1997
- Taverne J, Tavernier J, Fiers W, Playfair JH. Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro. *Clin Exp Immunol* 67(1):1-4, 1987

- Theodoropoulos PA, Stournaras C, Stool B, Markogiannakis E, Lang F, Gravanis A, Haussinger D. Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-/Total actin ratio and increases actin mRNA levels. *FEBS Lett* 311: 241-245, 1992
- Thomas JW, Cooley MA, Broome JM, Salgia R, Griffin JD, Lombardo CR, Schaller MD. The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *J Biol Chem* 17; 274(51): 36684-36692, 1999
- Tidball JG and Spencer MJ. PDGF stimulation induces phosphorylation of talin and cytoskeletal reorganization in skeletal muscle. *J Cell Biol* 123: 627-635, 1993
- Turner CE, Glenney JR, Burridge K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* 111, 1059-1068, 1990
- Turner CE, Schaller MD, Parsons JT. Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125FAK during development: relation to paxillin. *J Cell Science* 105: 637-645, 1993
- Turner CE. Paxillin. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 955, 1998
- Vandekerckhove J, Weder K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 122: 783-802, 1978
- Vasmant D, Maurice M, Feldmann G. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat Rec* 210(1): 17-24, 1984
- Wachsstock DH, Wilkins JA, Lin S. Specific interaction of vinculin with alpha – actinin. *Biochem Biophys Res Commun* 146(2): 554-560, 1987
- Wardle N. Minimal change nephropathy: how does the immune system affect the glomerulus? *Nephrol Dial Transplant* 8 (8): 787, 1993
- Welling LW, Zupka TM, Welling DT. Mechanical properties of basement membrane. *News in Physiological Sciences* 10, 30-35, 1995.
- Wright SC, Kumar P, Tam AW, Shen N, Verma M, Larrick JW. Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J Cell Biochem* 48\*4): 344-355, 1992
- Wojciak – Scothard B, Entwistle A, Garg R, Ridely AJ. Regulation of TNF-alpha-

- induces reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac and Cdc 42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 176: 150-165, 1998
- Wu YN, Yang YC, Wagner PD. Modification of chromaffin cells with pertussis toxin or N-ethylmaleimide lowers cytoskeletal F-actin and enhances Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion. *J Biol Chem* 267: 8396-8403, 1992
- Xiong WC, Macklem M and Parsons JT. Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein, *J. Cell Sci.*, 111: 1981-1991, 1998
- Yamada KM and Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 9: 76-85, 1997
- Yap AS, Keast JR and Manley SW. Thyroid cell spreading and focal adhesion formation depend upon protein phosphorylation and actin microfilaments. *Exp Cell Res* 210: 306-314, 1994
- Zachary I, Sinnott-Smith J, Turner CE, Rozengurt E. Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 268 (29): 22060-22065, 1993
- Zimmerle CT and Frieden C. Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry* 21;25(21): 6432-6438, 1986