

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

## ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

# ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

# ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΖΕΥΓΝΥΝΤΑΙ ΜΕ G ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ



# ΛΕΩΝΙΔΑΣ Ι. ΛΕΟΝΤΙΑΔΗΣ

Βιολόγος

**AOHNA 2012** 



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

### ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

# ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΖΕΥΓΝΥΝΤΑΙ ΜΕ G ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

ΛΕΩΝΙΔΑΣ Ι. ΛΕΟΝΤΙΑΔΗΣ

Βιολόγος

**AOHNA 2012** 

ii

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Ε. Φραγκούλης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ (επιβλέπων τριμελούς)
- Ζ. Γεωργούση, Διευθ. Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
- Δ. Βασιλακοπούλου, Αναπληρ. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

### Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Δ. Βασιλακοπούλου Αναπλ. Καθηγήτρια
- Ζ. Γεωργούση Διευθ. Ερευνών
  Σ. Ευθυμιόπουλος Αναπλ. Καθηγητής
  Κ. Ιατρού Καθηγητής
  Δ. Σίδερης Αναπλ. Καθηγητής
  Ε. Φραγκούλης Καθηγητής
  Σ. Χαμόδρακας Καθηγητής

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό του Βιολογικού τμήματος της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα» Ν. 5343 / 1932, Άρθρο 202, Παρ. 2

Στον πατέρα μου Ιορδάνη

Στη μητέρα μου Αγγελική

Εζώφυλλο: Το πράσινο δομικό μοντέλο απεικονίζει την στερεοδομή του μ-οπιοειδούς υποδοχέα αρουραίου στην ενεργή διαμόρφωση (προσδεδεμένος με αγωνιστή), ενώ το κόκκινο μοντέλο στην ανενεργή διαμόρφωση (προσδεδεμένος με ανταγωνιστή) του ίδιου υποδοχέα (Fowler et al., 2004 α,β). Το σύνθετο δομικό μοντέλο στη μέση απεικονίζει την κρυσταλλική δομή της RGS περιοχής της RGS4 πρωτεΐνης (4Box) σε σύμπλοκο με την Gia<sub>1</sub> που έχει προσδέσει GDP-AlF<sub>4</sub> (Tesmer et al., 1997)

# Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2002-2008 στο εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας του Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών Δρ. Ζ. Γεωργούση. Ο υποφαινόμενος υποστηρίχθηκε από το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» με εσωτερική υποτροφία τεσσεράμισι χρόνων μετά από διαγωνισμό. Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από την Γ.Γ.Ε.Τ. μέσω των προγραμμάτων ΕΝΤΕR και ΠΡΑΞΕ, από διακρατικά προγράμματα Ελλάδας-Πολωνίας και Ελλάδας-Ιταλίας, καθώς και από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα «Normolife» (LSHC-CT2006-037733) της Ζ.Γ.

Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου Δρ. Ηρώ Γεωργούση για την επιλογή του θέματος και την καθοδήγησή της όλα αυτά τα χρόνια στη διάρκεια της παρούσας διατριβής. Η επιστημονική της βοήθεια και κρίση υπήρξε πολύτιμη και σημαντική για την επιτυχή έκβαση αυτής της μελέτης και τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής, και οι συμβουλές της καθοριστικές για την περαιτέρω εξέλιξή μου ως επιστήμονας.

Ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητή Ε. Φραγκούλη και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δ. Βασιλακοπούλου για την εύρυθμη και απρόσκοπτη παρακολούθηση της προόδου της διατριβής μου, καθώς και τους Καθηγητές Κ. Ιατρού, Σ. Ευθυμιόπουλο, Δ. Σίδερη, Σ. Χαμόδρακα για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους συναγωνιστές και συναδέλφους μου σε αυτήν την προσπάθεια: Τη Γ. Μαζαράκου και την Ε. Μώρου που με βοήθησαν καταλυτικά και αφειδώς στα πρώτα βήματα και για πολύ χρόνο μετά. Η προσφορά τους και φιλία τους προς εμένα ήταν και εξακολουθεί να είναι ανεκτίμητη. Τους ανθρώπους που συμπορεύθηκαν μαζί μου για πολύ καιρό, Ειρήνη Γεωργαντά και Μ. Παπακωνσταντίνου, Α. Αγάλου, Δ. Φούρλα. Τους θεωρώ πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής μου. Τους ανθρώπους που πέρασαν από το εργαστήριο, αλλά δεν πρόκειται να ξεχάσω, Μ. Σαρρή, Φ. Νικολό, Ε. Μερκούρη, Ν. Μπαλατσό, Θ. Τέλη. Τους υποψήφιους συνδιδάκτορες (πρώην και νυν) και τους συνεργάτες από το Ινστιτούτου Βιολογίας, η φιλία και η παρέα των οποίων ήταν και συνεχίζει να είναι πολύτιμη. Τα μέλη της εσωτερικής επιτροπής παρακολούθησης της υποτροφίας μου στο «Δημόκριτο» και ιδιαιτέρως τον Δρ. L. Swevers για την πολύτιμη επιστημονική βοήθειά του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και να εκφράσω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη στη μητέρα μου Αγγελική και στην αδερφή μου Αλεξάνδρα για όλα εκείνα που μου προσέφεραν, για την αμέριστη αγάπη τους και την υποστήριξή τους, χωρίς να ζητούν κανένα αντίκρυσμα. Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου που τόσα χρόνια με υποστηρίζουν και πιστεύουν σε εμένα, ήταν πηγή χαράς και παρόντες στις δύσκολες στιγμές. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους δασκάλους που συνάντησα στη ζωή μου και σμίλεψαν το χαρακτήρα μου, ελπίζω να στέκομαι άξια απέναντι στις διδαχές τους. Τελευταίον, αλλά όχι λιγότερο από κανέναν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου Ιορδάνη. Ήταν ο πιο υπερήφανος άνθρωπος για εμένα, όμως η ζωή δεν θέλησε να μοιραστούμε αυτήν την επιτυχία και χαρά.

### Συντμήσεις

4Box: περιογή RGS Box της RGS4 **AC**: Adenylyl cyclase, αδενυλική κυκλάση ADP, ATP, AMP: adenosine diphosphate, triphosphate, monophosphate, διφωσφορική, τριφωσφορική, μονοφωσφορική αδενοσίνη **AMF**: μίνμα ιόντων  $\mathbf{F}$ . Cl. Mg<sup>+2</sup> (βλ. παράγραφο 2.3.4) **APS**: ammonium persulfate,  $\upsilon \pi \varepsilon \rho \theta \varepsilon \iota \kappa \delta \alpha \mu \mu \omega \nu \upsilon$ AR, β2-, α2A-, α1-: adrenergic receptor, αδρενεργικός υποδοχέας τύπου β2-, α2A-, α1-AT-R: angiotensin receptor,  $\upsilon \pi \delta \delta \chi \delta \alpha \zeta \tau \eta \zeta \alpha \gamma \gamma \epsilon \iota \delta \tau \delta \gamma \delta \eta \zeta$ **BB-R**: bombesin receptor,  $\upsilon \pi \circ \delta \circ \chi \in \beta \circ \mu \beta \in \sigma \circ \eta$ **BetaARK** ( $\hat{\mathbf{n}}$  **BARK**): B-adrenergic receptor kinase. Kivágn του β-αδρενεργικού υποδογέα **BSA**: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός **BRET**: bioluminescence resonance energy transfer **cAMP**: 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη CCK-R: cholocystokinin receptor, υποδοχέας της χολοκυστοκινίνης **COS**: CV-1 – simian – in Origin, carrying SV40 genetic material cells, νεφρικά κύτταρα πράσινου αφρικανικού πιθήκου **D1-, D2-, D3-R**: dopaminergic receptor, ντοπαμινεργικός υποδογέας τύπου D1, D2, D3 DAG: Diacyl glycerol, διάκυλο γλυκερόλη **DAMGO**: [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>]-enkephalin **DEP**: Disheveled/EGL-10/Pleckstrin domain **DH**: Dbl Homology domain,  $\pi \epsilon \rho \iota o \chi \eta$  ομόλογη με την Dbl DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium **DMSO**: Dimethyl sulfoxide δ-CT: δ-carboxyl tail, καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR δ-i3L: δ-third intracellular loop, τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του δ-OR δ-OR ή DOP: δ-opioid receptor, δ-οπιοειδής υποδοχέας **DPDPE**: [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-enkephalin **DSLET**: [D-Ser<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>]-enkephalin-Thr<sup>6</sup> **DTT**: Dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη EBP50/NHERF: Ezrin-radixin-moesin (ERM) binding protein 50/ Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor ECL: enhanced chemiluminesence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid EGF Kat EGFR: Epidermal growth factor Kat EGF receptor **ERK**: Extracellular signal-Regulated protein Kinase FBS: Fetal Bovine Serum, εμβρυϊκός ορός βοός FITC: Fluorescein isothiocyanate GAIP (*n* RGS19): G alpha-interacting protein GAP: GTPase activating protein GASP: G protein-coupled receptor associated sorting protein GDI: Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor, αναστολέας της αποδέσμευσης νουκλεοτιδίων νουανίνης **GDP**, **GTP**: guanosine-5'-diphosphate, -triphosphate,  $\delta i \phi \omega \sigma \phi o \rho i \kappa \eta$ ,  $\tau \rho i \phi \omega \sigma \phi o \rho i \kappa \eta$  you avo  $\sigma i v \eta$ GEF: guanine nucleotide exchange factor, παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης **GFP**: Green fluorescent protein,  $\pi \rho \dot{\alpha} \sigma_{1} v \eta \phi \theta o \rho (\zeta \sigma_{1} \sigma_{2} \sigma_{2} \sigma_{3} \sigma_{3}$ **GGL**: Gy protein-like domain **GIP**: GPCR interacting proteins,  $\pi\rho\omega\tau\epsilon$  ivec  $\pi\circ\upsilon\alpha\lambda\eta\lambda\epsilon\pi\iota\delta\rho\circ\upsilon\nu$  us touc GPCRs **GIPC:** GAIP Interacting Protein C-terminus **GIRK ή Kir3 channel**: G protein Inwardly-Rectifying potassium (K<sup>+</sup>) channel, κανάλι K<sup>+</sup> εσωτερικής ανόρθωσης που ενεργοποιείται από G πρωτεΐνες GoLoco: Gi/oa-Loco motif

**G** protein: Guanine nucleotide binding protein,  $\pi\rho\omega\tau\epsilon$ ίνη που προσδένει νουκλεοτίδια γουανίνης **GRK**: G protein-coupled receptor kinase, κινάση των GPCRs **GST**: Glutathione S-transferase, S-τρανσφεράση της γλουταθεινόνης **GTPyS**: Guanosine 5'-O-( $\gamma$ -thio) triphosphate **HA**: hemagglutinin, αιμαγλουτινίνη HEK293: Human embryonic kidney cells, κύτταρα εμβρυϊκού ανθρώπινου νεφρού HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid **HPR**: Horseradish peroxidase **IBMX**: 3 Isobutyl-1-methylxanthine **IP**<sub>3</sub>: Inositol 1,4,5-triphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη **IPTG**: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside JNK: c-Jun N-terminal kinases κ-OR ή KOP: κ-opioid receptor, κ-οπισειδής υποδογέας LARG: Leukemia Associated RhoGEF **LB**: Lysogeny Broth ( $\eta \pi \omega \gamma \omega \sigma \tau \delta \omega \zeta$  Luria-Bertani broth),  $\theta \rho \epsilon \pi \tau \iota \kappa \delta \upsilon \lambda \iota \kappa \delta \beta \alpha \kappa \tau \eta \rho (\omega v)$ LPA: lysophosphatidic acid, λυσοφωσφατιδικό οξύ mAChR: muscarinic acetylcholine receptor, μουσκαρινικός υποδογέας της ακετυλογολίνης **MAPK**: Mitogen-activated protein kinase,  $\pi \rho \omega \tau \epsilon$  ivities  $\epsilon$  very  $\delta \sigma \epsilon$  very  $\delta \sigma \epsilon$  is a statement of  $\delta \sigma \epsilon$  in the second statement of  $\delta \sigma \epsilon$  is a statement of  $\delta \sigma \epsilon$  in the statement of  $\delta \sigma \epsilon$  is a statement of  $\delta \sigma \epsilon$  in the statement of  $\delta \sigma \epsilon$  is a statement of  $\delta \sigma \epsilon$  in the statement of  $\delta \sigma \epsilon$  is a statement of \delta \sigma \epsilon is a statement **MBP**: Maltose binding protein μ-CT: μ-carboxyl tail, καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR μ-OR ή MOP: μ-opioid receptor, μ-οπιοειδής υποδοχέας **NMS**: Normal mouse serum, φυσιολογικός ορός ποντικού **N-OR \dot{\eta} NOP \dot{\eta} ORL<sub>1</sub>: nociceptin opioid receptor \dot{\eta} opioid receptor-like 1** NRS: Normal rabbit serum, φυσιολογικός ορός αρουραίου **O.D.**: Optical density,  $o\pi\tau\iota\kappa\eta$   $\pi\iota\kappa\nu\delta\tau\eta\tau\alpha$ **PAGE**: Polyacrylamide gel electrophoresis **PAG**: periaqueductal grey matter,  $\pi \epsilon \rho i \ddot{\upsilon} \delta \rho \alpha \gamma \omega \gamma \delta \varsigma$  φαιά ουσία **PBS**: Phosphate buffered saline PDZ: Post-synaptic density protein (PSD95)/ Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA)/ Zonula occludens-1 protein (Zo-1) **PH**: Pleckstrin Homology domain, περιοχή ομόλογη με την Pleckstrin PI-PLC: PhosphoInosite PLC, φωσφατιδικά ισοένζυμα της PLC **PI3K**: Phosphatidylinositol-3 kinase, κινάση 3 της φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης **PIP**<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, 4,5-διφωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη **PIP**<sub>3</sub>: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη **PKA, PKC**: Protein kinase A, C, πρωτεϊνική κινάση A, C PKCI: protein kinase C-interacting protein, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την PKC PLC, PLD, PLA2: Phospholipase C, D, A2, φωσφολιπάση C, D, A2 **PMSF**: Phenylmethylsulfonyl flyoride **PTB**: phospotyrosine-binding domain PTX: Bordetella pertussis toxin **PVDF**: Polyvinylidene difluoride **RGS**: Regulators of G protein Signaling,  $\rho \upsilon \theta \mu \upsilon \sigma \tau \epsilon \zeta \tau \eta \zeta \sigma \eta \mu \alpha \tau \sigma \delta \delta \tau \eta \sigma \eta \zeta \tau \omega \nu G \pi \rho \omega \tau \epsilon \ddot{\nu} \omega \nu$ **RhoGEF:** Ras homology GEF **SDS**: Sodium dodecyl sulphate SNX: Sorting nexin **SPL**: Spinohilin,  $\sigma\pi$ ινοφιλίνη **SRF**: Surface plasmon resonance **STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription TCA: Trichloroacetic acid, τριγλωροξικό οξύ **TEMED**: N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine **Y2H**: yeast two-hybrid screening (or system), σύστημα δύο υβριδίων

# Περίληψη

«Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με υποδοχείς που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες»

Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες (GPCRs) και ρυθμίζουν μια ποικιλία φυσιολογικών αποκρίσεων στο νευρικό σύστημα, κυριότερες από τις οποίες είναι η αναλγησία καθώς και η ανογή και εξάρτηση σε ναρκωτικές ουσίες. Η σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων γίνεται κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με τις Gi/Go πρωτεΐνες και μια μεγάλη πρόκληση στη μελέτη της σηματοδότησής τους είναι να ανακαλυφθεί ο τρόπος με τον οποίο οι υποδοχείς αυτοί «επιλέγουν» με ποιες συγκεκριμένες G πρωτεΐνες θα αλληλεπιδράσουν. Πέραν όμως από τη σύζευξη με τις G πρωτεΐνες, βρέθηκε ότι οι οπιοειδείς υποδοχείς αλληλεπιδρούν και με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, και οι αλληλεπιδράσεις αυτές βοηθούν στην εναρμόνιση της κυτταρικής σηματοδότησης, στην ενδοκυτταρική κυκλοφορία των υποδοχέων από και προς τη μεμβράνη, στην απευαισθητοποίηση και αποικοδόμησή τους (Georgoussi, 2008). Προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας, έδειξαν ότι η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά και το καρβοξυτελικό άκρο των υποδοχέων αυτών ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με τις G πρωτεΐνες και με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Merkouris et al., 1996, Georgoussi et al., 1997, Megaritis et al., 2000, Mazarakou and Georgoussi, 2005, Georganta et al., 2010).

Στην πολυπλοκότητα της σηματοδότησης των GPCRs πρωταγωνιστικό ρόλο βρέθηκε τα τελευταία χρόνια ότι παίζει μια νέα ομάδα πρωτεϊνών, οι RGS πρωτεΐνες (<u>R</u>egulators of <u>G</u> protein <u>Signaling</u>, ρυθμιστές της κυτταρικής σηματοδότησης των G πρωτεϊνών). Κύριος ρόλος των RGS πρωτεϊνών είναι να συνδέονται με τις Ga υπομονάδες και να επιταχύνουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP, τερματίζοντας τη μεταφορά του ερεθίσματος από τους υποδοχείς στους τελεστές. *In vitro* πειράματα πρόσδεσης με τη χρήση ενός GST-χιμαιρικού πεπτιδίου που αντιπροσωπεύει το καρβοξυτελικό άκρο του μοπιοειδούς υποδοχέα (μ-CT), έδειξαν ότι η RGS4 προσδένεται με τον μ- οπιοειδή υποδοχέα (Georgoussi et al., 2006).

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να εμβαθύνουμε περαιτέρω στις αλληλεπιδράσεις των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων (μ-OR και δ-OR) με την RGS4 πρωτεΐνη και κυρίως να μελετήσουμε το ρόλο που παίζει η RGS4 στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων.

Για το λόγο αυτό, έγιναν πειράματα με τη χρήση GST- και MBP-χιμαιρικών πεπτιδίων του δ-OR, τα οποία απέδειξαν ότι η RGS4 προσδένεται επίσης στο καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR (δ-CT) και στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά (δ-i3L) αυτού. Επιπλέον πειράματα έδειξαν ότι οι Ga και Gβy υπομονάδες των G πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με το δ-CT και την δ-i3L, σε αντίθεση με τον μ-OR που δεν προσδένει απευθείας τις Ga υπομονάδες στο μ-CT. Παράλληλα, in vitro πειράματα πρόσδεσης έδειξαν, ότι η RGS4 πρωτεΐνη σχηματίζει ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο με την Ga υπομονάδα (μ-CT – RGS4 – Ga) και προάγει την πρόσδεσή της Ga στο μ-CT λειτουργώντας ως ικρίωμα. Για να επιβεβαιώσουμε α) εάν η RGS4 αλληλεπιδρά με τους μ- και δ-ORs σε ένα κυτταρικό σύστημα και β) εάν επηρεάζεται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν σταθερά τον mycμ-OR ή τον flag-δ-OR. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης παρουσία της HA-RGS4 έδειξαν ότι η RGS4, όχι μόνο αλληλεπιδρά με τους μ- και δ-OR, αλλά επίσης επιτρέπει στους μ-, δ-ORs να αλληλεπιδράσουν με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες, ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησης των υποδοχέων. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η RGS4 οδηγεί τους οπισειδείς υποδοχείς να «επιλέξουν» με ποιες G πρωτεΐνες θα αλληλεπιδράσουν, προάγοντας την εξειδίκευση στη σηματοδότηση των υποδοχέων αυτών. Από την άλλη πλευρά, η in vitro αλληλεπίδραση των Gβy υπομονάδων με τα μ-, δ-CTs ενισχύεται παρουσία της RGS4 πρωτεΐνης, ενώ αντίθετα η πρόσδεση της RGS4 στα μ- και δ-CT μειώνεται παρουσία των Gβγ υπομονάδων.

Λεπτομερής χαρτογράφηση των περιοχών αλληλεπίδρασης των μ-, δ-CTs για εξεύρεση μιας συντηρημένης περιοχής πρόσδεσης, με τη χρήση GST-χιμαιρικών ελλειμματικών τμημάτων, έδειξε ότι η RGS4 προσδένεται στο συντηρημένο τμήμα κοντά στην έβδομη διαμεμβρανική περιοχή (DENFKRCFRXXC), που θεωρείται ότι δημιουργεί μια όγδοη έλικα. Επιπλέον πειράματα έδειξαν ότι και το «ζευγάρι» RGS4-Ga προσδένεται στο συντηρημένο τμήμα των μ-CT και δ-CT, ενώ η περιοχή C337-A372 του δ-CT διαθέτει μια επιπλέον θέση πρόσδεσης για το ίδιο σύμπλοκο. Πειράματα με χρήση μεταλλαγμένων μορφών της RGS4 (ΔNRGS4, 4Box) έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο της RGS4 είναι υπεύθυνο για τη πρόσδεσή της στα μ- και δ-CT, ενώ η περιοχή 4Box προσδένεται στο μ-CT μόνο παρουσία της Ga υπομονάδας.

Όσον αφορά στη λειτουργική επίδραση της RGS4 στους οπιοειδείς υποδοχείς, διαπιστώθηκε ότι η RGS4 α) μειώνει την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, αυξάνοντας τα ποσοστά του διαθέσιμου κυκλικού AMP και β) αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των ERK κινασών. Για αυτές τις λειτουργικές επιδράσεις ευθύνεται το αμινοτελικό άκρο της RGS4. Μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξαν επίσης ότι η RGS4-GFP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των κυττάρων, και ότι οι μ-, δ-ORs συνεντοπίζονται με την RGS4 στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα μετά από ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων.

Έχουν ήδη αναφερθεί μελέτες με στοχευμένη αποσιώπηση της RGS4 σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου πειραματόζωων που δείχνουν αύξηση στην ανταμοιβή και στη φυσική εξάρτηση μετά από χορήγηση μορφίνης. Συνεπώς, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η RGS4 αποτελεί έναν σημαντικό φαρμακολογικό στόχο για την επιλεκτική παρέμβαση στα σηματοδοτικά μονοπάτια των οπιοειδών υποδοχέων, ώστε να ρυθμίζεται η δραστικότητα, η εξειδίκευση και η διάρκεια της δράσης των οπιοειδών προσδετών και να αποτρέπονται οι αρνητικές επιδράσεις της ανοχής και της εξάρτησης. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μάς οδηγούν στο συμπέρασμα ότι όντως, η RGS4 πρωτεΐνη, είναι ένα νέο μόριο-κλειδί για την ρύθμιση της σηματοδότησης των οπιοειδών υποδοχέων, που εμπλέκεται στην εξειδίκευση της μετάδοσης του σήματος από αυτούς και στην ενεργοποίηση των τελεστών τους.

**Λέξεις-κλειδία**: Οπιοειδείς υποδοχείς, RGS πρωτεΐνες, αλληλεπίδραση πρωτεϊνών, πρωτεϊνικά σύμπλοκα, εξειδίκευση σηματοδότησης

# **Summary**

### "Functional protein interactions with G protein coupled receptors"

Opioid receptors belong to the superfamily of G protein coupled receptors (GPCRs) and regulate analgesia and tolerance-dependence to narcotic drugs. A new family of proteins, RGS proteins (Regulators of G protein Signalling), are involved in the signalling of GPCRs by accelerating the rate of GTP hydrolysis from Ga subunits, thus terminating signal transduction. The aim of the research was to study the interactions of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors ( $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR) with RGS4 protein and the role of RGS4 in receptor signalling. In vitro pulldown experiments using GST-/MBP-fusion peptides demonstrated that RGS4 binds to the third intracellular loop and the conserved region of the carboxyl tails of opioid receptors ( $\mu$ -CT,  $\delta$ -CT). RGS4 functions as a scaffold protein and promotes the binding of Ga subunit to the  $\mu$ -CT, forming a RGS4–Ga– $\mu$ -CT ternary complex. Co-immunoprecipitation experiments showed that RGS4 promotes interaction of  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR with specific G $\alpha$  subunit subtypes, depending on receptor activation. Functional experiments demonstrated that RGS4 a) increases intracellular cAMP accumulation by reducing opioid receptor adenyl cyclase inhibition, b) inhibits ERK phosphorylation, c) colocalizes with activated receptors. The N terminal of RGS4 is responsible for the protein's functional activity. The results of this study indicate that RGS4 protein is a key element for the regulation and specificity of opioid receptor signalling.

**Keywords**: Opioid receptors, RGS proteins, protein interaction, protein complexes, signalling specificity

# Περιεχόμενα

Συντμήσειςix
Περίληψη - Summary
<b>1. Εισαγωγή</b> 1
1.1 Οπιοειδείς υποδοχείς2
1.1.1 Υπότυποι οπιοειδών υποδοχέων2
<b>1.2 G πρωτεΐνες (Guanine nucleotide binding proteins)</b> 7
1.2.1 Κύκλος ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών
1.2.3 Gβγ υπομονάδες
1.4 Μεταγωγή της πληροφορίας των οπιοειδών υποδοχέων μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορες πρωτεΐνες
<ul> <li>1.4.1 Ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις οπιοειδών υποδοχέων και λειτουργικά χαρακτηριστικά αυτών</li></ul>
ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις
1.4.3.1 Ιδιότητες, λειτουργικά χαρακτηριστικά και εξειδίκευση (specificity)
της ρυθμιστικής δράσης των RGS πρωτεϊνών
1.4.3.3 Ρόλος των RGS στην οπιοειδή δράση

2. Σκοπός	
-----------	--

3. Υλικά και Μέθοδοι	.71
3.1 Χειρισμός και κατεργασία κυττάρων	.74
3.1.1 Βακτηριακά κύτταρα	.74
3.1.1.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων	.74
3.1.1.2 Παρασκευή κυττάρων E.coli δεκτικών σε μετασχηματισμό	
(competent cells)	.74
3.1.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων – Θερμικό σοκ	.76
3.1.2 Ευκαρυωτικά κύτταρα	.77
3.1.2.1 Κυτταρικές σειρές	.77
3.1.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας και υλικά καλλιεργειών	. 79
3.1.2.3 Καλλιέργεια και χειρισμός κυττάρων	. 79
3.1.2.4 Παροδική διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων	.81
3.2 Μοριακές μέθοδοι	. 86
3.2.1 Χειρισμός και κατεργασία DNA	. 86
3.2.1.1 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από βακτήρια	. 86
3.2.1.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας πλασμιδιακού DNA	. 88
<i>3.2.1.3</i> Ηλεκτροφόρηση DNA	. 88
3.2.1.4 Καθαρισμός DNA με μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου	. 89
3.2.2 Κατασκευή χιμαιρικών πεπτιδίων	.91
3.2.2.1 Κατασκευή των MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών των καρβοξυτελικών	
άκρων των μ-OR και δ-OR (MBP-μ-CT και MBP-δ-CT)	.91
3.2.2.2 Κατασκευή των GST χιμαιρικών πρωτεϊνών της τρίτης	
ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού άκρου των μ- και δ-	
οπιοειδών υποδοχέων (δ-i3L, μ-CT, δ-CT)	.94
3.2.2.3 Κατασκευή των GST-χιμαιρικών ελλειμματικών πρωτεϊνών των	
καοβοξυτελικών άκοων του μ- και δ-ΟΒ	.95

<ul> <li>(ΔNRGS4) πρωτεΐνης</li></ul>	3.2.2.4 Παρασκευή της ελλειμματικής στο αμινοτελικό άκρο RGS4	
<ul> <li>3.2.2.5 Παρασκευή της RGS4 πρωτεΐνης συντηγμένης με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, (RGS4-GFP)</li></ul>	(ΔNRGS4) πρωτεΐνης	98
πρωτεΐνη GFP, (RGS4-GFP)	3.2.2.5 Παρασκευή της RGS4 πρωτεΐνης συντηγμένης με τη φθορίζουσα	
3.3 Βιοχημικές μέθοδοι       104         3.3.1 Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών       104         3.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο       Bradford         Bradford       105         3.3.3 Έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια       107         3.3.3 Έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια       107         3.3.3.1 Έκφραση GST- και MBP-χμαιρικών πρωτεϊνών       107         3.3.3.2 Έκφραση His-RGS4 και His-4Box       110         3.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της <i>in vitro</i> πρόσδεσης των GST και MBP       110         3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της <i>in vitro</i> πρόσδεσης των GST και MBP       114         3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PolyAcrylamide Gel       116         3.3.6 Χρώση πηκτώματος με χρωστική coomassie       118         3.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση (Western       119         3.3.8 Απομάκρυνση αντισωμάτων από την PVDF μεμβράνη (απογύμνωση       122         3.3.10 Προσδιορισμός της φωσφορυλιωμένης ERK κινάσης       125         3.3.11 Συνεστιακή μικροσκοπία       127         3.3.12 Ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων RGS4 – i4 πεπτιδίου με       ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native gel         electrophoresis)       131         3.4 Φαρμακολογικές Μέθοδοι       134	πρωτεΐνη GFP, (RGS4-GFP)1	01
<ul> <li>3.3.1 Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών</li></ul>	<b>.3 Βιοχημικές μέθοδοι</b> 1	04
<ul> <li>3.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford</li></ul>	3.3.1 Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών1	04
Bradford	3.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο	
<ul> <li>3.3.3 Έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια</li></ul>	Bradford1	05
<ul> <li>3.3.3.1 Έκφραση GST- και MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών</li></ul>	3.3.3 Έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια1	07
<ul> <li>3.3.2 Έκφραση His-RGS4 και His-4Box</li></ul>	3.3.3.1 Έκφραση GST- και MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών	07
<ul> <li>3.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της <i>in vitro</i> πρόσδεσης των GST και MBP χιμαιρικών πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες (pull down assays)</li></ul>	3.3.3.2 Έκφραση His-RGS4 και His-4Box1	10
<ul> <li>χιμαιρικών πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες (pull down assays)</li></ul>	3.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της in vitro πρόσδεσης των GST και MBP	
<ul> <li>3.3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis – PAGE)</li></ul>	χιμαιρικών πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες (pull down assays)1	14
<ul> <li>Electrophoresis – PAGE)</li></ul>	3.3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PolyAcrylamide Gel	
<ul> <li>3.3.6 Χρώση πηκτώματος με χρωστική coomassie</li></ul>	Electrophoresis – PAGE)1	16
<ul> <li>3.3.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση (Western blotting)</li></ul>	3.3.6 Χρώση πηκτώματος με χρωστική coomassie1	18
<ul> <li>blotting)</li></ul>	3.3.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση (Western	
<ul> <li>3.3.8 Απομάκρυνση αντισωμάτων από την PVDF μεμβράνη (απογύμνωση μεμβράνης ή stripping)</li></ul>	blotting)1	19
μεμβράνης ή stripping)	3.3.8 Απομάκρυνση αντισωμάτων από την PVDF μεμβράνη (απογύμνωση	
<ul> <li>3.3.9 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων από ζωντανά κύτταρα</li></ul>	μεμβράνης ή stripping)1	22
<ul> <li>3.3.10 Προσδιορισμός της φωσφορυλιωμένης ERK κινάσης</li></ul>	3.3.9 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων από ζωντανά κύτταρα 1	22
<ul> <li>3.3.11 Συνεστιακή μικροσκοπία</li></ul>	3.3.10 Προσδιορισμός της φωσφορυλιωμένης ERK κινάσης1	25
<ul> <li>3.3.12 Ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων RGS4 – i4 πεπτιδίου με ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native gel electrophoresis)</li></ul>	3.3.11 Συνεστιακή μικροσκοπία1	27
ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native gel electrophoresis)	3.3.12 Ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων RGS4 – i4 πεπτιδίου με	
electrophoresis)	ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native gel	
<ul> <li>3.4 Φαρμακολογικές Μέθοδοι</li></ul>	electrophoresis)1	31
3.4.1 Μελέτες εκτόπισης (displacement ή ψυχρός κορεσμός)134	.4 Φαρμακολογικές Μέθοδοι1	34
3.4.2 Μελέτη της συσσώσευσης του ενδοκυτταοικού cAMP 138	3.4.1 Μελέτες εκτόπισης (displacement ή ψυγρός κορεσμός)1	34
	3.4.2 Μελέτη της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού cAMP	38

4. Αποτελέσματα	. 143
4.1 Κατασκευή και έκφραση χιμαιρικών πεπτιδίων της τρίτης	
ενδοκυτταρικής θηλιάς και των καρβοξυτελικών άκρων των	
μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων	. 144
4.2 Προσδιορισμός της in vitro αλληλεπίδρασης των οπιοειδών	
υποδοχέων με πρωτεΐνες του κύκλου ενεργοποίησης των G	
πρωτεϊνών	. 147
4.2.1 Η RGS4 προσδένεται στις ενδοκυτταρικές περιοχές των οπιοειδών υποδοχέων	. 147
4.2.2 Οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ-OR	. 148
4.2.3 Διαφορική πρόσδεση των Ga πρωτεϊνών στις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ-OR	. 152
4.2.4 Εξειδίκευση πρόσδεσης των Ga υπομονάδων στα καρβοξυτελικά άκρα των υποδοχέων	. 155
4.3 Τα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων (μ-CT, δ-	
CT) ως πλατφόρμες για το σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών	
συμπλόκων: Ο ρόλος της RGS4 πρωτεΐνης	. 156
4.3.1 Οι Gβγ υπομονάδες ανταγωνίζονται με την RGS4 για την πρόσδεση στο μ-CT και δ-CT	. 157
4.3.2 Η πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT προϋποθέτει την ενεργοποίηση του μ- OR	. 162
4.3.3 Προσδιορισμός in vitro ετεροτριμερών συμπλόκων μεταξύ του μ-OR, της RGS4 και της Ga πρωτεΐνης	. 163
4.4 Χαρτογράφηση των θέσεων αλληλεπίδρασης της RGS4. των	
Ga υπομονάδων και των μ- και δ- οπιοειδών υποδογέων	. 165

4.4.1 Θέσεις πρόσδεσης της RGS4 πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-	
OR και δ-OR	165
4.4.2 Θέσεις πρόσδεσης της Ga πρωτεΐνης και του συμπλόκου RGS4-Ga στο	
καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR και του δ-OR	170
4.4.3 Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης των Gβγ υπομονάδων στο	
καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR	173
4.4.4 Προσδιορισμός των περιοχών αλληλεπίδρασης της RGS4 με τους	
οπιοειδείς υποδοχείς	173
4.5 Ρόλος της RGS4 στην εξειδίκευση σύζευξης των οπιοειδών	
υποδοχέων με τις Ga υπομονάδες	177
4.5.1 Η RGS4 αλληλεπιδρά με τον μ-OR και δ-OR σε κύτταρα ΗΕΚ293	177
4.5.2 Η RGS4 προάγει την αλληλεπίδραση συγκεκριμένων Ga υπομονάδων με	
τους μ-OR και δ-OR	181
4.6 Επίδραση της RGS4 στην κυτταρική σηματοδότηση των μ-	
και δ- οπιοειδών υποδοχέων	185
4.6.1 Λειτουργική επίδραση της RGS4 σε κύτταρα ΗΕΚ293	188
α) Επίδραση της RGS4 στη συγγένεια πρόσδεσης του μ-OR για οπιοειδείς	
προσδέτες	188
β) Επίδραση της RGS4 στην αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης μετά από	
ενεργοποίηση του μ-OR	189
γ) Επίδραση της RGS4 στην ενεργοποίηση των ERK1,2 από τους μ- και δ-	
ORs	191

Συζήτηση
----------

6.	Βιβλιογραφ	ία	225
----	------------	----	-----

7. Παράρτημα	
8. Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά	
9. Βιογραφικό σημείωμα	

<u>1. Εισαγωγή</u>

# 1.1 Οπιοειδείς υποδοχείς

Οι οπισειδείς υποδοχείς είναι μεμβρανικοί υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια Α της υπεροικογένειας των υποδογέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors, GPCRs ή αλλιώς επταελικοειδείς υποδογείς, 7-TM) (Corbett et al., 2006). Οι οπιοειδείς υποδοχείς ενεργοποιούνται από μια πλειάδα χημικών μορίων όπως ενδογενή οπιοειδή, διάφορα οπιοειδή πεπτίδια και αλκαλοειδή (φυσικά ή συνθετικά) και λαμβάνουν μέρος σε μια ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών στο νευρικό σύστημα εκ των οποίων κυριότερη είναι η αναλγησία, είναι δε υπεύθυνοι τόσο για τις ευεργετικές όσο και για τις δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούν τα οπιοειδή στον οργανισμό. Εντοπίζονται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, όπως στα κέντρα του πόνου, της μνήμης και της μάθησης, αλλά και σε άλλες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενώ έχουν εντοπιστεί και στον γαστρεντερικό σωλήνα. Οι οπιοειδείς υποδοχείς συζεύγνυνται κυρίως με τις Gi/Go πρωτεΐνες και κύριο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι η καταστολή της ενεργότητας της αδενυλικής κυκλάσης (adenylyl cyclase, AC), και κατά συνέπεια η μείωση των επιπέδων του κυκλικού AMP (cAMP) στο κύτταρο (Standifer and Pasternak, 1997). Πέραν όμως αυτής της λειτουργίας οι οπιοειδείς υποδοχείς παίζουν ρόλο και στη ρύθμιση πληθώρας διαφορετικών μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης όπως είναι η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (phospholipase C, PLC), των πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinases - MAPKs) αλλά και ιοντικών καναλιών K<sup>+</sup> και Ca<sup>+2</sup> (Standifer and Pasternak, 1997, Law et al., 1999, Law et al., 2000, Corbett et al., 2006).

## 1.1.1 Υπότυποι οπιοειδών υποδοχέων

Μοριακές και φαρμακολογικές μελέτες έχουν ταξινομήσει τους οπιοειδείς υποδοχείς σε τρεις κύριους υποτύπους, τους μ-, δ- και κ- (Lord et al., 1977, Martin et al., 1979, Standifer and Pasternak, 1997, Bockaert and Pin, 1999, Law et al., 1999, Law et al., 2000, Waldhoer et al., 2004, Corbett et al., 2006). Η κλωνοποίηση τεσσάρων γονιδίων, που εντοπίστηκαν σε διαφορετικά χρωμοσώματα, επιβεβαίωσε την ύπαρξη των τριών αυτών υποτύπων και έδειξε την ύπαρξη ενός επιπλέον νέου υποτύπου. Έτσι οι οπιοειδείς υποδοχείς ταξινομούνται πλέον σε τέσσερις βασικούς υποτύπους ανάλογα κυρίως με τον πρώτο προσδέτη που βρέθηκε για τον καθένα, τον μ-οπιοειδή υποδοχέα ή μ-OR, τον δ-οπιοειδή υποδοχέα ή δ-OR, τον κ-οπιοειδή υποδοχέα ή κ-OR και τον N-OR ή ORL<sub>1</sub>.



Σχήμα 1. Ελικοειδές μοντέλο του δ-OR. Οι κύκλοι περιλαμβάνουν τα αμινοξέα με τον κώδικα ενός γράμματος. Οι πράσινες γραμμές ορίζουν το τέλος των ελίκων. Οι γκρι κύκλοι δείχνουν τα συντηρημένα κατάλοιπα των τριών υποτύπων (μ-, δ- και κ-OR), ενώ οι μαύροι τα υψηλώς συντηρημένα κατάλοιπα για την οικογένεια της ροδοψίνης (οικογένεια Α) των GPCRs. Η κίτρινη γραμμή δείχνει τη δισουλφιδική γέφυρα στις εξωκυτταρικές θηλιές (Kane et al., 2006).

Οι οπιοειδείς υποδοχείς εμφανίζουν μεταξύ τους ομοιότητα ~60-70% με τις μεγαλύτερες διαφορές να εντοπίζονται στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τους άκρα, ενώ τη μεγαλύτερη ομολογία την εμφανίζουν στις διαμεμβρανικές έλικες (Σχήμα 1) (Chen et al., 1993, Waldhoer et al., 2004). Επιπρόσθετα, και οι τέσσερις υποδοχείς διαθέτουν δυο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης στην πρώτη και δεύτερη εξωκυτταρική θηλιά, τα οποία πιθανόν δημιουργούν μια δισουλφιδική γέφυρα. Όλοι οι οπιοειδείς υποδοχείς υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες

περιλαμβάνουν την προσθήκη γλυκοσυλικών αλυσίδων σε κατάλοιπα ασπαραγίνης σε διάφορες θέσεις των αμινοτελικών άκρων. Επίσης, και οι τέσσερις υποδοχείς περιλαμβάνουν υψηλώς συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα, όπως είναι το μοτίβο Asp-Arg-Tyr (DRY) στο κυτταροπλασματικό άκρο του τρίτου διαμεμβρανικού τμήματος, καθώς και οι τρεις προλίνες στην πέμπτη, έκτη και έβδομη διαμεμβρανική περιοχή, μεταξύ άλλων (Waldhoer et al., 2004).

#### μ-οπιοειδής υποδοχέας (μ-OR)

Για την ονομασία αυτού του υποδογέα γρησιμοποιείται το γράμμα μ από το αρχικό της λέξης μορφίνη, που είναι ο κύριος και πρωταρχικά αναγνωρισμένος αγωνιστής του υποδογέα. Προέργεται από την έκφραση του γονιδίου oprm1, το οποίο βρίσκεται στο έκτο γρωμόσωμα του ανθρώπου και στο δέκατο γρωμόσωμα του ποντικού και εκφράζει την πρωτεΐνη που καλείται OPRM1 ή MOR1. Ο υποδοχέας αυτός διακρίνεται σε τρεις καλά χαρακτηρισμένους φαρμακολογικά υποτύπους, τον  $\mu_1$ , τον  $\mu_2$ , και τον  $\mu_3$ (Pasternak, 2001, 2005). Επιπλέον, σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δέκα συνολικά διαφορετικοί υπότυποι εναλλακτικού ματίσματος, μέσω PCR με αντίστροφη μεταγραφάση σε διάφορους οργανισμούς που διαφέρουν μόνο στο καρβοξυτελικό τους άκρο και δεν είναι ακόμα γνωστή η λειτουργική τους σημασία (Pan et al., 2005). Ο μ-OR έχει μεγάλη συγγένεια για τα ενδογενή οπιοειδή εγκεφαλίνες, την β ενδορφίνη και τις ενδομορφίνες, ενώ ο πλέον γνωστός εξωγενής αγωνιστής για τον μ-OR είναι, όπως προαναφέρθηκε, το αλκαλοειδές οπιοειδές μορφίνη. Η έκφραση του μ-OR εντοπίζεται στον εγκέφαλο και ειδικότερα στον φλοιό (cortex) (στιβάδες ΙΙΙ και IV), στο θάλαμο (thalamus), στο ραβδωτό σώμα (striatum), στην περιϋδραγωγό φαιά ουσία (periaqueductal grey matter, PAG), στους οσφρητικούς βολβούς (olfactory bulb), στον επικλινή πυρήνα (nucleus accumbens, NA). Εντοπίζεται επίσης στο νωτιαίο μυελό και ειδικότερα στα θωρακικά κέρατα της φαιάς ουσίας (περιοχή substantia gelatinosa), καθώς και στον γαστρεντερικό σωλήνα (Tempel and Zukin, 1987, Fine and Portenoy, 2004). Ο υπότυπος  $\mu_1$  εμπλέκεται στη υπερνωτιαία (supraspinal) αναλγησία που προκαλείται από τη μορφίνη. Ο υπότυπος μ<sub>2</sub> ανταποκρίνεται στη φαρμακολογία του κλωνοποιημένου MOR1 και ενέχεται στην αναπνευστική καταστολή, στη συστολή της κόρης του οφθαλμού, στην ευφορία, στη φυσική εξάρτηση και στη μειωμένη κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα. Η λειτουργία του υποτύπου μ<sub>3</sub> δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, ενώ σε αυτόν δεν προσδένεται η μορφίνη παρόλο που προσδένονται άλλα αναλγητικά παράγωγά της (Pasternak, 2005). Η ενεργοποίηση του μ-OR οδηγεί επίσης σε δευτερεύοντα συμπτώματα όπως είναι η νάρκωση, η φαγούρα, η ναυτία, η μειωμένη αναπνοή. Κάποιες από τις παραπάνω δράσεις του μ-OR, όπως είναι η αναλγησία, η αναισθητοποίηση, η ευφορία και η καταστολή του αναπνευστικού συστήματος, τείνουν να μειώνονται μετά από χρόνια χρήση οπιοειδών, με άμεση συνέπεια την εμφάνιση φαινομένων όπως η ανοχή και η εξάρτηση.

### δ-οπιοειδής υποδοχέας (δ-OR)

Ο δ-οπιοειδής υποδογέας ονομάστηκε έτσι από το αργικό της λέξης (vas) deferens – σπερματική λήκυθος, διότι οι υποδοχείς αυτοί ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στον ιστό της σπερματικής ληκύθου του ποντικού (Lord et al., 1977). Οι Met- και Leuεγκεφαλίνες είναι οι ενδογενείς αγωνιστές για αυτόν τον υποδοχέα (Quock et al., 1999) και είναι παράγωγα του γονιδίου της προεγκεφαλίνης. Οι εξωγενείς πεπτιδικοί αγωνιστές του υποδοχέα αυτού περιλαμβάνουν τους DSLET, DPDPE και deltorphin II, οι μη πεπτιδικοί αγωνιστές τους SNC-80, BW373U86, ενώ ο πιο γνωστός ανταγωνιστής του δυποδοχέα είναι η ναλτρινδόλη (naltrindole). Το γονίδιο από το οποίο προέρχεται ο δ-OR καλείται oprd1 και απομονώθηκε ταυτόχρονα από δυο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες (Kieffer et al., 1992, Evans et al., 1992). Υπάρχουν δυο φαρμακολογικά χαρακτηρισμένοι υπότυποι, ο  $\delta_1$  και ο  $\delta_2$ , η αναλογία των οποίων ( $\delta_2:\delta_1$ ) διαφέρει σε ανατομικά διακριτές περιοχές του εγκεφάλου αρουραίου, όπως είναι ο υποθάλαμος, οι αμυγδαλοειδείς πυρήνες, το άνω διδύμιο, ο επικλινής πυρήνας. Ο δ-OR εντοπίζεται στον εγκέφαλο και ειδικότερα στις περιοχές των γεφυρικών πυρήνων (pontine nuclei), στην αμυγδαλή (amygdale), στους οσφρητικούς βολβούς, στο βαθύ φλοιό (deep cortex) (Tempel and Zukin, 1987, Fine and Portenoy, 2004). O  $\delta$ -OR  $\epsilon\mu\pi\lambda\epsilon\kappa\epsilon\tau\alpha\iota$  και αυτός στο φαινόμενο της αναλγησίας, σε μικρότερο όμως βαθμό από τον μ-OR (Varga et al., 2004), και ευθύνεται, επίσης, για τη σωματική εξάρτηση. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο δ-OR εμπλέκεται στη συμπεριφορά και στην κατάθλιψη, καθώς έχει δειχθεί ότι δενδογενείς αγωνιστές έχουν αντικαταθλιπτική δράση (Broom et al., 2002), ενώ μπορούν να προκαλούν αυξορύθμιση της παραγωγής του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), ο οποίος ενέχεται στην ίδια ψυχολογική νόσο, σε διάφορα ζωικά μοντέλα κατάθλιψης (Torregrossa et al., 2006, Zhang et al., 2006).

#### κ-οπιοειδής υποδοχέας (κ-OR)

Ονομάστηκε κ υποδοχέας από το αρχικό του αγωνιστή κετοκυκλαζοσίνη, που βρέθηκε πρώτος ότι προσδένεται σε αυτόν τον υποδοχέα. Προσδένει το ενδογενές ενώ οπιοειδές πεπτίδιο δυνορφίνη, στους εξωγενείς οπιοειδείς ανωνιστές συγκαταλέγονται, εκτός από την κετοκυκλαζοσίνη, η σαλβινορίνη Α και η πεντοκυκλαζοσίνη. Περιλαμβάνει τρεις πιθανούς υποτύπους, τον κ1, κ2 και κ3 (Rothman et al., 1989), όμως ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός τους δεν είναι οριστικός διότι δεν υπάρχουν αγωνιστές ειδικοί για κάθε έναν από αυτούς τους υποτύπους. Μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί μόνο ένας ανθρώπινος cDNA κλώνος (Mansson et al., 1994) που αντιστοιχεί στον κ1 υπότυπο, ενώ έχει προταθεί ότι ο κ2 υπότυπος προέρχεται από ετεροδιμερισμό του κ-OR με τον δ-OR (Jordan and Devi, 1999, Devi, 2001). O  $\kappa$ -OR εντοπίζεται στον εγκέφαλο και ειδικότερα στον υποθάλαμο, στην περιϋδραγωγό φαιά ουσία και στο προτείχισμα (claustrum). Εντοπίζεται επίσης στο νωτιαίο μυελό και ειδικότερα στα θωρακικά κέρατα της φαιάς ουσίας (περιοχή substantia gelatinosa), καθώς και στους νευρώνες του πόνου (Tempel and Zukin, 1987, Fine and Portenoy, 2004). Εμπλέκεται στην αναλγησία του νωτιαίου μυελού, στη νάρκωση, στη συστολή της κόρης του ματιού, στη δυσφορία και στην αναστολή της έκκρισης της ορμόνης βασοπρεσίνη (ADH) που οδηγεί σε διουρητική δράση.

#### **Opioid receptor-like 1 υποδοχέας (ORL-1 ή N-OR)**

Μετά την κλωνοποίηση των μ-, δ- και κ- υποδοχέων, ταυτοποιήθηκε ένα cDNA που κωδικοποιεί έναν αρχικά «ορφανό» υποδοχέα (δεν διέθετε γνωστό αγωνιστή) με μεγάλο βαθμό ομολογίας (>60%) με τους κλασσικούς υποδοχείς. Ονομάστηκε αρχικά ORL-1 (Opioid Receptor-Like 1), ενώ άλλες ονομασίες περιλαμβάνουν τους όρους nociceptin/orphanin FQ υποδοχέας και LC132 (Meunier et al., 1995). Ο υποδοχέας αυτός καλείται πλέον N-OR (από τη λέξη nociceptin) και θεωρείται ότι ανήκει στην οικογένεια των οπιοειδών υποδοχέων λόγω της δομικής του ομολογία με τους κλασσικούς

υποτύπους. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν αρκετά φαρμακολογικά δεδομένα που να υποστηρίζουν την ύπαρξη υποτύπων του N-OR, λόγω της απουσίας εξειδικευμένων προσδετών και κυρίως ανταγωνιστών. Ο N-OR κωδικοποιείται από το γονίδιο oprl1 (Mollereau et al., 1994) και ο ενδογενής αγωνιστής του είναι η nociceptin ή orphanin FQ, ένα νευροπεπτίδιο 17 αμινοξέων (Henderson and McKnight, 1997). Ο N-OR εντοπίζεται στον εγκέφαλο και ειδικότερα στο φλοιό, στην αμυγδαλή, στον ιππόκαμπο (hippocampus), στον υποθάλαμο, στους διαφραγματικούς πυρήνες (septal nuclei) του τελεγκεφάλου, καθώς και στο νωτιαίο μυελό, αλλά δεν συνεντοπίζεται με τον μ-OR σε περιοχές που εμπλέκονται στη διαδικασία του πόνου. Μετέχει στην ρύθμιση μιας σειράς εγκεφαλικών λειτουργιών ειδικότερα σε ενστικτώδεις και συναισθηματικές συμπεριφορές όπως είναι η ανησυχία, η κατάθλιψη, η όρεξη, η μνήμη, ενώ εμπλέκεται στην κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα, στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και στην ανοχή του οργανισμού στους μ- αγωνιστές (Calo et al., 2000), οδηγώντας έτσι σε υπερνωτιαίο ανταγωνισμό της αναλγητικής επίδρασης των οπιοειδών.

# **1.2** G πρωτέινες (Guanine nucleotide binding proteins)

Οι GPCRs χρησιμοποιούν ως κύριο και αναγνωρισμένο «μεσολαβητή» των ερεθισμάτων που δέχονται τις G πρωτεΐνες, για να μεταφέρουν το μήνυμα ενδοκυτταρικά στους διάφορους τελεστές (Neer, 1995, Hamm and Gilchrist, 1996, Hamm, 2001). Οι G πρωτεΐνες εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και είναι τριμερή, μοριακά σύμπλοκα που αποτελούνται από τρεις υπομονάδες την α, β και γ (Neer 1995, Clapham and Neer 1997). Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι προσδένουν νουκλεοτίδια γουανοσίνης (GDP και GTP) μέσω της α υπομονάδας, η οποία διαθέτει ενδογενή ενεργότητα GTPάσης για την υδρόλυση του GTP σε GDP (Hepler and Gilman, 1992). Στην ανενεργή μορφή η α υπομονάδα προσδένει μόρια GDP, ενώ η ενεργοποιημένη διαμόρφωση της α υπομονάδας συνδέεται με GTP και είναι αυτή που εμφανίζει ενεργότητα GTPάσης. Οι β και οι γ υπομονάδα είτε είναι ελεύθερο. Στο γονιδίωμα των θηλαστικών έχουν βρεθεί 16 γονίδια που κωδικοποιούν για τις α

υπομονάδες, 5 γονίδια για τις β και 12 για τις γ υπομονάδες (McCudden et al., 2005, Sanders et al., 2008). Παρόλο που όλοι οι συνδυασμοί των παραπάνω υπομονάδων δεν απαντώνται απαραίτητα στη φύση, ο θεωρητικός αριθμός διαφορετικών ετεροτριμερών G πρωτεϊνών είναι πολύ μεγάλος και σε αυτό πιθανά να οφείλεται η ποικιλομορφία και ταυτόχρονα η εκλεκτικότητα των παραγόμενων ενδοκυτταρικών σημάτων των GPCR.

### 1.2.1 Κύκλος ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών

Στην ανενεργή τους μορφή οι α, β, και γ υπομονάδες των G πρωτεϊνών σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο, με το GDP προσδεδεμένο στην α υπομονάδα. Όταν οι GPCR υποδοχείς ενεργοποιούνται από τους κατάλληλους αγωνιστές. αλλάζει n στερεοδιαμόρφωσή τους και μεταπίπτουν στην κατάσταση υψηλής συγγένειας (Σχήμα Αυτό έχει ως συνέπεια τη σύζευξη των υποδοχέων με τις ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες, την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και την ανταλλαγή του GDP με GTP της Ga υπομονάδας (οι υποδοχείς δηλαδή δρουν ως παράγοντες ανταλλαγής γουανοσίνης guanine nucleotide exchange factors, GEFs). Ουσιαστικά, οι G πρωτείνες δρουν ως μοριακοί διακόπτες, οι οποίοι «ανοίγουν» όταν δεχθούν το κατάλληλο ερέθισμα από τους υποδοχείς. Αποτέλεσμα της πρόσδεσης του GTP στην Ga υπομονάδα είναι ο διαχωρισμός του ετεροτριμερούς των G πρωτεϊνών στις α και βγ υπομονάδες και οι αποδέσμευσή τους από τον υποδοχέα, οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζουν διάφορους τελεστές όπως είναι η αδενυλική κυκλάση, ιοντικά κανάλια K<sup>+</sup> και Ca<sup>+2</sup>, φωσφολιπάση C, D, A<sub>2</sub> (PLC, PLD, PLA<sub>2</sub>) και ERK κινάσες (Extracellular signal-Regulated protein Kinase), μεταξύ άλλων (Neer, 1995, Hamm and Gilchrist, 1996, Bourne, 1997, Clapham & Neer, 1997, Hamm, 1998). Η αποσύζευξη των G πρωτεϊνών από τον υποδοχέα οδηγεί στη μετάπτωση αυτού στην κατάσταση γαμηλής συγγένειας. Η μετάδοση του σήματος τερματίζεται με την δράση GTPάσης της Ga υπομονάδας, οπότε η GaGTP επανέργεται στην αρχική, ανενεργή διαμόρφωση GaGDP, έτοιμη να επανασχηματίσει το ετεροτριμερές σύμπλοκο με τις Gβy υπομονάδες (GaGDPby). Στο κλασσικό αυτό μοντέλο της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών, έχει δειχθεί τα τελευταία χρόνια να συμμετέχει μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών, οι αποκαλούμενες ρυθμιστές της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών (Regulators of G protein Signaling, RGS πρωτεΐνες), για τις οποίες θα μιλήσουμε εκτενέστερα παρακάτω. Κύρια δράση αυτών των πρωτεϊνών

είναι η επιτάχυνση της δράσης GTPάσης των Ga υπομονάδων με αποτέλεσμα το «κλείσιμο» του κύκλου ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών, ρυθμιστικός ρόλος που θα αναφερθεί επίσης με λεπτομέρεια στη συνέχεια.



Σχήμα 2. Κύκλος ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών. Στην κατάσταση ηρεμίας, οι G πρωτεΐνες εμφανίζονται ως ετεροτριμερή σύμπλοκα, τα οποία περιλαμβάνουν τις α υπομονάδες (πορτοκαλί) που έχουν προσδεδεμένο το GDP (σκούρο κόκκινο), τις β υπομονάδες (πράσινο) και τις γ υπομονάδες (κίτρινο). Η πρόσδεση αγωνιστή στον GPCR (μπλε) έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα και αυτό οδηγεί στην πρόσδεση της ετεροτριμερούς G πρωτεΐνης στον υποδοχέα και κατά συνέπεια στην αποδέσμευση του GDP. Το υψηλής συγγένειας τετραμερές σύμπλοκο είναι σταθερό μέχρι η πρόσδεση ενός μορίου GTP (ανοικτό πράσινο) να προκαλέσει την αποσύνδεση από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα των GaGTP και Gβγ υπομονάδων. Οι GaGTP και Gβγ υπομονάδες στη συνέχεια ενεργοποιούν μια ποικιλία τελεστών, όπως αδενυλική κυκλάση και κανάλια K<sup>+</sup> (μωβ και γαλάζιο, αντίστοιχα). Η σηματοδότηση τερματίζεται με την υδρόλυση του GTP σε GDP από την Gα υπομονάδα, αντίδραση που επιταχύνεται από τις RGS πρωτεΐνες (ανοικτό κόκκινο)

## 1.2.2 Ga υπομονάδες

Η δομή της Ga υπομονάδας αποτελείται από δυο περιοχές, μια περιοχή που προσδένει νουκλεοτίδια και έχει μεγάλη ομολογία με την υπεροικογένεια των Ras GTPασών, και μια περιοχή που αποτελείται μόνο από α έλικες, η οποία σε συνδυασμό με την προηγούμενη περιοχή, βοηθά στη δημιουργία μιας βαθιάς «τσέπης» για την πρόσδεση των νουκλεοτιδίων της γουανίνης (McCudden et al., 2005, Jean-Baptiste et al., 2006). Οι Ga υπομονάδες περιλαμβάνουν τρεις εύκαμπτες περιοχές που προσδιορίζονται ως διακόπτης -Ι, -ΙΙ και -ΙΙΙ, οι οποίες αλλάζουν την στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης σε απόκριση της πρόσδεσης και υδρόλυσης του GTP. Η στερεοδιαμόρφωση της Ga όταν είναι προσδεδεμένη με το GTP, έχει μειωμένη συγγένεια για το Gβγ διμερές, αυξημένη συγγένεια για τους τελεστές των Ga και σε αυτήν οφείλεται η αποσύνδεση των υπομονάδων των G πρωτεϊνών κατά την ενεργοποίηση. Οι Ga υπομονάδες επίσης περιλαμβάνουν ένα εκτεταμένο αμινοτελικό άκρο που αποτελείται από 26 έως 36 αμινοξέα. Δομές του ετεροτριμερούς δείχνουν ότι αυτή η περιοχή δημιουργεί μια α έλικα που αλληλεπιδρά με την Gβ υπομονάδα (McCudden et al., 2005).

Εκτός από την υδρόλυση του GTP, υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί για τη ρύθμιση της σηματοδότησης των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών (McCudden et al., 2005). Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των Ga υπομονάδων που αποσκοπούν στη ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού και των επιπέδων των Ga πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, οι Ga πρωτεΐνες υφίστανται μυριστιλίωση ή παλμιτυλίωση σε κατάλοιπα γλυκίνης ή κυστεΐνης αντίστοιχα στο αμινοτελικό τους άκρο και αυτές οι τροποποιήσεις βοηθούν την αγκυροβόληση των υπομονάδων στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε να βρίσκονται σε εγγύτητα με άλλες πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού τους, όπως η αδενυλική κυκλάση, οι Gβγ υπομονάδες και οι GPCRs. Έτσι ρυθμίζονται οι αλληλεπιδράσεις με αυτές τις πρωτεΐνες. Πολλές Ga υπομονάδες, επίσης, υπόκεινται σε φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση C (Protein Kinase C, PKC) (Chen and Manning, 2001) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασης αυτών των υπομονάδων με το Gβγ διμερές και με άλλες πρωτεΐνες του σηματοδοτικού κύκλου. Επιπλέον, οι Ga πρωτεΐνες είναι δυνατόν να αποικοδομούνται από ένα μηγανισμό που περιλαμβάνει πρωτεόλυση μέσω ουβικιτίνης, μετά από χρόνια ενεργοποίηση (Johansson et al., 2005).

Στους ανθρώπους υπάρχουν 23 γνωστές Ga πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από 16 γονίδια και διαχωρίζονται σε 4 υποοικογένειες με βάση, ως επί το πλείστον, την ταυτότητα (ομοιότητα) στην αλληλουχία και τα κοινά συστήματα τελεστών τους (McCudden et al., 2005, Milligan and Kostenis, 2006): 1) Gsa (Gsa και G<sub>olf</sub>α). Είναι οι πρώτες Ga πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκαν και αρχικά η κύρια λειτουργία τους βρέθηκε να είναι η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης. Στις λειτουργίες αυτών των υπομονάδων συμπεριλαμβάνονται επίσης η ενεργοποίηση των μεγάλων καναλιών K<sup>+</sup> (Maxi K channels) και της τυροσινικής κινάσης Src. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και οι G<sub>olf</sub>α, οι οποίες είναι οι Ga υπομονάδες που συζεύγνυνται με τους υποδοχείς που εμπλέκονται στην αίσθηση της όσφρησης. Χαρακτηριστικό τους είναι η ευαισθησία τους στην κατεργασία με τη βακτηριακή τοξίνη της χολέρας (cholera toxin sensitive).

2)  $Gi_{,oa}$  ( $Gia_{1-4}$ , Goa,  $G_{gust}a$ , Gza,  $Gt_{rodea}a$ ,  $Gt_{conea}a$ ). Auth  $\eta$  κατηγορία περιλαμβάνει μέλη που κυρίως αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση, ενώ άλλες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν είναι η ενεργοποίηση των ERK/MAP κινασών (Extracellular signal-Regulated protein Kinase),  $\eta$  αναστολή καναλιών  $Ca^{+2}$ ,  $\eta$  διέγερση καναλιών  $K^+$  και  $\eta$  ενεργοποίηση της Src κινάσης. Περιλαμβάνει επίσης τις  $G_{gust}a$ , οι οποίες αλληλεπιδρούν με υποδοχείς που συμμετέχουν στην αίσθηση της γεύσης, ενώ οι Gta συμμετέχουν στην αίσθηση του φωτός, καθώς ρυθμίζουν τη φωσφοδιεστεράση του cGMP (cyclic guanosine monophosphate). Οι Gia πρωτεΐνες, με εξαίρεση την Gza, είναι ευαίσθητες στην κατεργασία με την βακτηριακή τοξίνη του κοκίτη (pertussis toxin sensitive).

3)  $Gq_{/11}\alpha$  (Gqa,  $G_{11}a$ ,  $G_{14}a$ ,  $G_{15}a$  και  $G_{16}a$ ). Οι υπομονάδες αυτές ενεργοποιούν τα ειδικά φωσφοϊνοσιτιδικά ισοένζυμα των φωσφολιπασών C (PI-PLC). Τα PI-PLC δημιουργούν από την 4,5-διφωσφορο-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη (PIP<sub>2</sub>) της μεμβράνης τους δεύτερους μηνύτορες 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>) και 1,2 διακυλογλυκερόλη (DAG). Οι υπομονάδες αυτές διεγείρουν επίσης ιοντικά κανάλια K<sup>+</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας δεν είναι ευαίσθητες στις βακτηριακές τοξίνες του κοκκίτη και της χολέρας (cholera toxin and pertussis toxin insensitive) (Milligan and Kostenis, 2006).

4)  $G_{12/13}\alpha$  ( $G_{12}\alpha$  και  $G_{13}\alpha$ ). Οι υπομονάδες αυτές ρυθμίζουν τις μικρού μοριακού βάρους G πρωτεΐνες, όπως είναι η RhoA, μέσω τελεστών που διαθέτουν περιοχές ομόλογες με Dbl (Dbl Homology, DH) και ομόλογες με pleckstrin (Pleckstrin Homology, PH). Μπορούν, επίσης, να διεγείρουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης PDZ-RhoGEF (PSD95/Disc large/Zo-1 -Ras homology GEF) καθώς και την ενεργότητα της leukemiaassociated RhoGEF (LARG). Παράλληλα, η G<sub>13</sub>α κι όχι η G<sub>12</sub>α μπορεί να διεγείρει την ενεργότητα της p115RhoGEF. Οι υπομονάδες αυτής της κατηγορίας είναι επίσης ικανές να διεγείρουν την PLD και PLC-ε (McCudden et al., 2005).

### 1.2.3 Gβγ υπομονάδες

Οι Gβ και Gγ υπομονάδες σχηματίζουν υπό φυσιολογικές συνθήκες ένα διμερές σύμπλοκο (McCudden et al., 2005). Τα 5 γνωστά ανθρώπινα γονίδια για την Gβ υπομονάδα και τα 12 γονίδια για την Gγ υπομονάδα αποτελούν πρόσφορο έδαφος για τη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού συνδυασμών Gβγ διμερών. Η Gβγ υπομονάδα είναι ένα λειτουργικό ετεροδιμερές και δημιουργεί μια σταθερή δομική μονάδα. Όλες οι Gβ υπομονάδες περιλαμβάνουν κάθε 40 αμινοξέα επτά επαναλήψεις των αμινοξέων τρυπτοφάνη-ασπαρτικό οξύ, οι οποίες καλούνται WD-40 επαναλήψεις και δημιουργούν μικρές αντιπαράλληλες β πτυχώσεις. Οι επτά WD-40 επαναλήψεις των Gβ υπομονάδαν αναδιπλώνονται σε μια διαμόρφωση προπέλας με επτά πτερύγια που αποτελείται από β πτυχώσεις, ενώ το αμινοτελικό άκρο δημιουργεί μια α έλικα. Η Gγ υπομονάδα αναδιπλώνεται σε δυο α έλικες, οι οποίες και οι δυο αποτελούν σημεία επαφής με την Gβ υπομονάδα. Όλες οι Gβγ υπομονάδες πρενυλιώνονται μετα-μεταφραστικά και αυτή η λιπιδική τροποποίηση είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό τους στην πλασματική μεμβράνη.

Το διμερές των Gβγ υπομονάδων θεωρείτο παλιότερα ότι απλώς διευκολύνει το σχηματισμό του ετεροτριμερούς Gaβγ και την πρόσδεση της Ga στους GPCRs, και ότι δρα ως αναστολέας της Ga, δεδομένου ότι διαθέτει ενεργότητα αναστολέα της αποσύνδεσης νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI), επιπλέον δε ότι λειτουργεί ως μεμβρανική «άγκυρα» για την Ga. Νεώτερα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν στο ότι, εκτός των α υπομονάδων, το σύμπλοκο των βγ υπομονάδων μετά την αποσύνδεση από την Ga-GTP, είναι επίσης ελεύθερο να ενεργοποιεί ένα μεγάλο αριθμό τελεστών. Έτσι, οι Gβγ υπομονάδες συμβάλουν ουσιαστικά στην κυτταρική σηματοδότηση των GPCRs, απορρίπτοντας παλιότερες θεωρίες που ανέφεραν ότι το διμερές παίζει παθητικό και βοηθητικό ρόλο στη σηματοδότηση των Gβγ υπομονάδων βρέθηκε ότι είναι η PLCβ. Οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν απευθείας με τις ισομορφές PLCβ1, PLCβ2

και PLCβ3 και ενεργοποιούν τη δράση αυτών των ενζύμων (Clapham and Neer, 1997). Ειδικότερα στην περίπτωση της PLCβ3, μελέτες έδειξαν ότι, σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Mg<sup>+2</sup> που προάγουν τον διαγωρισμό του ετεροτριμερούς των G πρωτεϊνών, η δράση των Gβy υπομονάδων στην ενεργοποίηση αυτής της ισομορφής είναι προσθετική της δράσης των Gq/11α υπομονάδων, οι οποίες ενεργοποιούν επίσης την PLCβ. Οι Gβy υπομονάδες βρέθηκε επίσης ότι αλληλεπιδρούν απευθείας με διάφορες ισομορφές της αδενυλικής κυκλάσης για να τροποποιήσουν τη λειτουργία τους. Έτσι, βρέθηκε ότι οι ισομορφές ΙΙ, ΙV και VII ενεργοποιούνται από το Gβy διμερές, ενώ η ισομορφή Ι αναστέλλεται (Clapham and Neer, 1997). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι Gβy υπομονάδες ενεργοποιούν τα κανάλια Κ<sup>+</sup> εσωτερικής ανόρθωσης που ενεργοποιούνται από G πρωτεΐνες (G protein-coupled inwardly-rectifying K channels, GIRK ή Kir3), τα οποία εντοπίζονται στα καρδιακά κύτταρα (GIRK1/GIRK4 ή IKACh) καθώς και στον εγκέφαλο (GIRK1/GIRK2). Πράγματι, ανακαλύφθηκε ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται απευθείας στο καρβοξυτελικό άκρο των GIRK1 καναλιών και τα ενεργοποιούν (Inanobe et al., 1995). Οι Gβγ υπομονάδες μπορούν επίσης να ρυθμίζουν την λειτουργία κι άλλων ιοντικών καναλιών, όπως είναι τα κανάλια Ca<sup>+2</sup> τύπου N- και P/Q- που βρίσκονται στους νευρώνες (Ikeda, 1996). Αυτή η ρύθμιση φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα απευθείας αλληλεπίδρασης των Gβγ με τα κανάλια Ca<sup>+2</sup> και συνέπεια αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η αναστολή της λειτουργίας τους.

Οι Gβγ υπομονάδες μπορούν να ρυθμίζουν τη δράση και άλλων πρωτεϊνών, όπως κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες. Έτσι, η ενεργοποίηση των GPCRs που σηματοδοτούν μέσω των Gi/oa, έχει ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση των Gβγ υπομονάδων, οι οποίες ενεργοποιούν έμμεσα τις MAPKs, όπως ERK1/2, JNK (c-Jun Nterminal kinases) και p38, μέσω ενός μηχανισμού που ενδεχομένως περιλαμβάνει το σχηματισμό του σηματοδοτικού συμπλόκου των πρωτεϊνών Shc-Grb2-Sos (Gutkind, 1998, Smrcka, 2008). Με αυτόν τον τρόπο, οι Gβγ υπομονάδες μεσολαβούν στη σηματοδότηση των GPCRs προς τα μονοπάτια ενεργοποίησης της μίτωσης και κυτταρικής ανάπτυξης. Οι Gβγ υπομονάδες ενεργοποιούν, επίσης την γ-PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase, κινάση 3 της φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης), ένα ένζυμο σημαντικό για την έναρξη της μίτωσης στα κύτταρα και τη σηματοδότηση των λευκοκυττάρων στην ανοσολογική απόκριση. Πέραν όμως από τη σηματοδότηση των GPCRs, οι Gβγ υπομονάδες συμμετέχουν και στη ρύθμιση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Έτσι, οι Gβγ υπομονάδες δρουν ως κομβικά μόρια στην σύγκλιση μονοπατιών μεσολαβώντας στη διενεργοποίηση υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης (π.χ. υποδοχείς των PDGF – platelet-derived growth factor και EGF – epidermal growth factor) από τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς. Οι Gβγ υπομονάδες συμμετέχουν, επίσης, στη σηματοδότηση υποδοχέων χημοκινών, όπως είναι ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης 8 (CXCR1 και CXCR2) και ο υποδοχέας-συμπαράγοντας της εισόδου του ιού του AIDS, CXCR4, οι οποίοι συζεύγνυνται με τις Gi πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο οι Gβγ υπομονάδες μεσολαβούν στη χημειοταξία και στην απελευθέρωση παραγόντων φλεγμονής από τα μεταναστεύοντα ανοσοποιητικά κύτταρα (Heuss and Gerber, 2000, Smrcka, 2008). Μελέτες δεικνύουν επίσης ότι οι Gβγ υπομονάδες είναι ο CREB (cAMP response element-binding).

Ο σημαντικός ρόλος των Gβy υπομονάδων στη σηματοδότηση των GPCRs φαίνεται από το γεγονός, ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στους υποδοχείς και δρουν επίσης ως μόρια στρατολόγησης άλλων πρωτεϊνών (Krupnick and Benovic 1998). Πειράματα έδειξαν ότι οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά των M2 και M3 μουσκαρινικών υποδοχέων (M2, M3-mAChR) για να στρατολογήσουν πρωτεΐνες, όπως την GRK2 (G protein-coupled receptor kinase, κινάση των GPCRs), και να σχηματίσουν ένα τριμερές σύμπλοκο που περιλαμβάνει τον υποδοχέα, τις Gβγ υπομονάδες και την GRK2 (Wu et al., 1998, 2000). Συνέπεια αυτής της στρατολόγησης είναι η ενίσχυση της δράσης της GRK2, η οποία φωσφορυλιώνει τον ενεργοποιημένο υποδογέα και οδηγεί στην απευαισθητοποίησή του. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι Gβy υπομονάδες αλληλεπιδρούν απευθείας με το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα 1 της παραθυροειδούς ορμόνης (PTH1R) και αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για την έμμεση πρόσδεση των Ga υπομονάδων σε αυτήν την περιοχή του υποδοχέα (Mahon et al., 2006). Νεώτερες έρευνες έχουν δείξει ότι οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με μέλη της κλάσης III των AGS πρωτεϊνών (activators of G protein signaling, ενεργοποιητές της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών) (Smrcka, 2008). Οι AGS είναι κυτταροπλασμτικές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις υπομονάδες των G πρωτεϊνών και προάγουν τη σηματοδότηση των τελευταίων, χωρίς να υπάρχει ερέθισμα και ενεργοποίηση των
GPCRs. Πειράματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο Gβγ προσδένεται στην AGS8, η οποία μπορεί να προσδένει ταυτόχρονα και τη μη ενεργή Ga υπομονάδα (GaGDP) (Sato et al., 2006). Με αυτόν τον τρόπο το ετεροτριμερές των G πρωτεϊνών δεν αποχωρίζεται, παρόλα αυτά ενεργοποιείται η σηματοδότηση των Gβγ υπομονάδων προς την PLCβ.

Πρόσφατα δεδομένα δεικνύουν επίσης ότι οι Gβγ υπομονάδες δρουν και στο επίπεδο του κυτταρικού πυρήνα (Dupre et al., 2009). Μελέτες έδειξαν ότι το G $\beta_1\gamma_2$  διμερές αλληλεπιδρά άμεσα με την αποακετυλάση 5 των ιστονών (HDAC5) μετά από την ενεργοποίηση του  $a_{2A}$ -AR υποδοχέα (Spiegelberg et al., 2005). Η αλληλεπίδραση του Gβγ συμπλόκου με την HDAC5 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παράγοντα διαφοροποίησης των μυών MEF2 από την HDAC5 και την ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι G $\beta_1$  και G $\beta_2$  υπομονάδες αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και μεταναστεύουν μαζί του στον πυρήνα, παρουσία του γλυκοκορτικοειδούς δεξαμεθαζόνη (Kino et al., 2005). Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από την παρουσία των Gγ υπομονάδων και οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας που προκαλεί ο υποδοχέας των κορτικοειδών.

Δεδομένου του ότι οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τις Ga υπομονάδες, τους GPCRs, τους τελεστές τους, αλλά και άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, είναι πιθανόν να παίζουν έναν βασικό, οργανωτικό ρόλο στο σχηματισμό σηματοδοτικών συμπλόκων που χρησιμοποιούν ως «πλατφόρμα» τους GPCRs. Το γεγονός ότι αυτά τα σύμπλοκα είναι πιθανόν να σχηματίζονται ιδιοσύστατα και πριν τη στόχευση-μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη, προσδίδει στις Gβγ υπομονάδες έναν ενδεχόμενο ρόλο οργανωτή των συμπλόκων ή/και πρωτεΐνης-συνοδού (chaperone) για τις επιμέρους πρωτεΐνες αυτών των συμπλόκων (Dupre et al., 2009). Είναι χαρακτηριστικό ότι υπάρχουν ενδείζεις και για συμμετοχή των Gβγ υπομονάδων στον ομοδιμερισμό υποδοχέων, όπως είναι ο β2-AR (Dupre et al., 2009). Όλα τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν το σημαντικό ρόλο των Gβγ υπομονάδων στη σηματοδότηση των GPCRs και αναδεικνύουν τον πολύπλευρο ρόλο αυτών των υπομονάδων σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες.

## 1.3 Τελεστές των οπιοειδών υποδοχέων

Οι οπιοειδείς υποδοχείς, μετά την ενεργοποίησή τους και τη σύζευξή τους με τις G πρωτεΐνες, μεταβιβάζουν το σήμα τους σε ένζυμα ή ιοντικά κανάλια που καλούνται τελεστές (effectors). Οι κυριότεροι τελεστές των οπιοειδών υποδοχέων είναι η αδενυλική κυκλάση, η PLC, τα ιοντικά κανάλια K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> και οι MAP κινάσες. Οι τελεστές με τη σειρά τους παράγουν δευτερογενή μηνύματα τα οποία οδεύουν στο εσωτερικό του κυττάρου και τροποποιούν τις βιοχημικές λειτουργίες ή επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων (Σχήμα 3).

#### Αδενυλική κυκλάση

Η αδενυλική κυκλάση είναι μια πρωτεΐνη-ένζυμο που αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες και η δράση της είναι να καταλύει τη μετατροπή του ATP σε cAMP. Το cAMP είναι ένας δευτερογενής μηνύτορας που επιδρά σε μια πλειάδα πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου για να ρυθμίσει τις λειτουργίες τους, όπως για παράδειγμα στην πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA ενεργοποιείται από το cAMP και φωσφορυλιώνει πολλά διαφορετικά υποστρώματα όπως GPCRs, άλλες κινάσες, ενδοκυτταρικά κανάλια Ca<sup>+2</sup> και μεταγραφικούς παράγοντες (Lutrell, 2008). Το cAMP ρυθμίζει επίσης ορισμένους παράγοντες ανταλλαγής γουανυλικών νουκλεοτιδίων (GEFs), όπως είναι οι Epac1 και Epac2, οι οποίοι ενεργοποιούν τις GTPάσες μικρού μοριακού βάρους.

Υπάρχουν δέκα υπότυποι της αδενυλικής κυκλάσης που κωδικοποιούνται από αντίστοιχα γονίδια, εκ των οποίων ο ένας δεν είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη, και όλοι περιλαμβάνουν τις 12 διαμεμβρανικές περιοχές, διαφέρουν όμως στην κατανομή στους ιστούς και στην ενεργοποίηση από τις G πρωτεΐνες (Lutrell, 2008). Όπως έχει προαναφερθεί, η αδενυλική κυκλάση ενεργοποιείται από τις Gsa πρωτεΐνες, ενώ αναστέλλεται από τις Gi/oa, μέσω των οποίων σηματοδοτούν οι οπιοειδείς υποδοχείς (Standifer and Pasternak, 1997, Law et al., 2000). Έχει βρεθεί επίσης ότι και οι Gβγ υπομονάδες είναι σε θέση να επιδρούν στη λειτουργία ορισμένων ισομορφών της αδενυλικής κυκλάσης. Έτσι, οι Gβγ υπομονάδες ενεργοποιούν τις II, IV και VII ισομορφές της αδενυλικής κυκλάσης και αναστέλλουν τις I και VIII ισομορφές (Law et al.,, 2000). Εκτός από τις G πρωτεΐνες, η αδενυλική κυκλάση ρυθμίζεται και από άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι κινάσες. Η κινάση PKC φωσφορυλιώνει τις ισομορφές ΙΙ, ΙV και VII αυξάνοντας έτσι τη βασική ενεργότητά τους και κάνοντας τις ευαίσθητες στην επίδραση των Gβγ υπομονάδων (Law et al., 2000). Η κινάση PKA που ρυθμίζεται από την αδενυλική κυκλάση, μπορεί με τη σειρά της να ρυθμίζει επίσης την ενεργότητα διαφόρων ισομορφών της αδενυλικής κυκλάσης (Lutrell, 2008). Εκτός όμως από τις ενδογενείς πρωτεΐνες, η αδενυλική κυκλάση ενεργοποιείται και άμεσα από ενώσεις όπως είναι η φορσκολίνη. Η φορσκολίνη ανήκει στην κατηγορία των διτερπενίων, προέρχεται από το φυτό *Coleus forskohlii* και το αποτέλεσμα της δράσης της είναι η ταχεία αύξηση των επιπέδων του cAMP.

Οι 10 ισομορφές της αδενυλικής κυκλάσης στα θηλαστικά χωρίζονται σε 5 διακριτές οικογένειες ανάλογα με την αμινοξική τους ομοιότητα και τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά (Sunahara and Taussig, 2002, Sadana and Dessauer, 2009). Η πρώτη οικογένεια περιλαμβάνει τις ισομορφές Ι, ΙΙΙ και VIII που είναι ευαίσθητες στην πρωτεΐνη καλμοδουλίνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ιόντα Ca<sup>+2</sup> και ρυθμίζει πολλά κυτταροπλασματικά ένζυμα. Οι ισομορφές ΙΙ, ΙV και VII που ενεργοποιούνται από τις Gβγ υπομονάδες, ορίζουν μια δεύτερη οικογένεια. Οι ισομορφές V και VI ανήκουν στην τρίτη οικογένεια ανήκει η ισομορφή ΙΧ, η οποία δεν είναι ευαίσθητη στη φορσκολίνη και στην πέμπτη οικογένεια περιλαμβάνεται η διαλυτή ισομορφή της αδενυλικής κυκλάσης, η οποία διαφέρει πολύ από όλες τις άλλες και είναι παρόμοια με τις κυκλάσες που απαντώνται στα κυανοβακτήρια. Από τις ισομορφές της αδενυλικής κυκλάσης, πολλές εκφράζονται στον εγκέφαλο, ενώ οι Ι και ΙΙΙ εκφράζονται αποκλειστικά εκεί.

Οι ισομορφές Ι, V, VI και VIII της αδενυλικής κυκλάσης είναι αυτές που ρυθμίζονται από τους οπιοειδείς υποδοχείς (Lutrell, 2008). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι μ-OR και δ-OR μπορούν να ενεργοποιούν την ισομορφή ΙΙ της αδενυλικής κυκλάσης μέσω των Gβγ υπομονάδων (Tsu et al., 1995, Chan et al., 1995). Υπάρχουν επίσης μελέτες που αναφέρουν ότι οι οπιοειδείς υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιήσουν την αδενυλική κυκλάση, υπό συνθήκες όπου προάγεται η σύζευξη με τις Gs πρωτεΐνες (Connor and Christie, 1999, Crain and Shen, 2000).

Χρόνια ενεργοποίηση των υποδοχέων που αναστέλλουν τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης, όπως είναι οι οπιοειδείς υποδοχείς, έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αύξηση της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού cAMP. Αυτό το φαινόμενο, το οποίο εκδηλώνεται συγκεκριμένα μετά την απομάκρυνση του αγωνιστή των ανασταλτικών υποδογέων, αναφέρεται ως υπερευαισθητοποίηση ή υπερενεργοποίηση (superactivation) της αδενυλικής κυκλάσης (Williams et al., 2001, Sunahara and Taussig, 2002, Sadana and Dessauer, 2009). Μετά την αφαίρεση του αγωνιστή, η αδενυλική κυκλάση παρουσιάζεται υπερ-ευαίσθητη σε ακόλουθη ενεργοποίησή της από τις Gsa πρωτεΐνες ή τη φορσκολίνη. Η υπερενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης περιγράφηκε αρχικά σε κύτταρα NG108-15, τα οποία υποβλήθηκαν σε χρόνια κατεργασία με αγωνιστές των οπιοειδών, μουσκαρινικών, αδρενεργικών υποδοχέων ή των υποδοχέων της σοματοστατίνης (Sharma et al., 1975). Φαίνεται επίσης, ότι η ανάπτυξη του φαινομένου της υπερενεργοποίηση εξαρτάται από την ισομορφή της αδενυλικής κυκλάσης. Μελέτες, όπου κύτταρα COS-7 διαμολύνθηκαν με τον μ-OR και διάφορες ισομορφές της αδενυλικής κυκλάσης, έδειξαν ότι η χρόνια κατεργασία με οπιοειδή οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των Ι, V, VI και VIII ισομορφών και σε αναστολή της ενεργότητας των ΙΙ, ΙV και VII ισομορφών (Avidor-Reiss et al., 1997). Τα αυξημένα επίπεδα cAMP δεν δεικνύουν αποσύζευξη των υποδοχέων από τις Gi πρωτεΐνες, αλλά αντικατοπτρίζουν προσαρμοστικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων τύπων αδενυλικής κυκλάσης και αυξημένη ενεργοποίηση της PKA (η οποία προάγει τη φωσφορυλίωση της αδενυλικής κυκλάσης) και του μεταγραφικού παράγοντα CREB (cAMP response element binding protein) (Waldhoer et al., 2004). Η υπερενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοχής και εξάρτησης, που αναπτύσσονται μετά από παρατεταμένη έκθεση σε οπιοειδή. Ο πιθανός μηγανισμός που περιγράφει αυτό το φαινόμενο εξηγεί ότι, η απομάκρυνση του οπιοειδούς από τους προσαγωγούς αισθητικούς νευρώνες μετά από γρόνια έκθεση, οδηγεί εν τέλει σε αύξηση των επιπέδων του cAMP και κατά συνέπεια σε ενισχυμένη ενεργοποίηση της PKA (Williams et al., 2001). Η PKA από την πλευρά της διευκολύνει την αναστροφή του δυναμικού ηρεμίας στους νευρώνες, ενεργοποιώντας τα τασεοεξαρτώμενα κανάλια κατιόντων, και ευθύνεται και για την απελευθέρωση της νευροδιαβιβαστών. Συνεπώς, η αυξημένη ενεργοποίησή της λόγω

υπερενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταφορά ερεθισμάτων πόνου από τους αισθητικούς νευρώνες προς το κεντρικό νευρικό σύστημα.

#### Φωσφολιπάση C (PLC)

Είναι πρωτεΐνη-ένζυμο που βρίσκεται προσκολλημένο στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και η λειτουργία της είναι να υδρολύει την PIP<sub>2</sub>. Υπάρχουν 3 μεγάλες υποοικογένειες της PLC, η PLCβ, η PLCγ και η PLCδ, οι οποίες περιλαμβάνουν συνολικά 20 ισοένζυμα PI-PLC. Η PLC ενεργοποιείται από της G πρωτεΐνες της υποοικογένειας Gq/11, όμως τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι οι οπιοειδείς υποδοχείς έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την PLCβ και μέσω των Gi/ο πρωτεϊνών και των Gβγ υπομονάδων (Law et al., 2000). Η υδρόλυση της PIP<sub>2</sub> από την PLC έχει ως συνέπεια τη δημιουργία των δευτερογενών μηνυμάτων IP<sub>3</sub> και DAG. Η IP<sub>3</sub> με τη σειρά της ενεργοποιεί κανάλια Ca<sup>+2</sup> και προκαλεί απελευθέρωση ιόντων Ca<sup>+2</sup> στο κυτταρόπλασμα. Τα ιόντα Ca<sup>+2</sup> είναι τριτογενή μηνύματα που επιδρούν σε διάφορες βιοχημικές διαδικασίες του κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, η DAG ενεργοποιεί την κινάση PKC, η οποία ως δευτερογενής τελεστής, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια σειρά από ενδοκυτταρικά ένζυμα.

#### MAP κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases)

Οι ΜΑΡ κινάσες ενεργοποιούνται κατά βάση ως απόκριση σε ερεθίσματα από αναπτυξιακούς παράγοντες και κυτοκίνες, και οδηγούν στη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων που υπάρχουν στον πυρήνα του κυττάρου. Είναι κυρίως κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες αποτελούνται από τρεις κατηγορίες κινασών, τις ERK, τις JNK και τις p38. Είναι πλέον δεδομένο ότι οι MAP κινάσες ενεργοποιούνται και από τους GPCRs, εκτός από τους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (Gutkind, 1998). Η ενεργοποίηση των GPCRs έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δευτερογενών μηνυμάτων (cAMP, DAG) από τελεστές όπως η αδενυλική κυκλάση και η PLCβ, και τα δευτερογενή μηνύματα με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις MAP κινάσες. Όσον αφορά τους οπιοειδείς υποδοχείς, έχει βρεθεί ότι μπορούν επίσης να ενεργοποιούν τις ERK1,2 κινάσες, μέσω των Gia και Gβγ υπομονάδων και τη διαμεσολάβηση της PKA κινάσης ή της PI3K

κινάσης αντίστοιχα (Law et al., 2000). Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω ότι οι MAPKs είναι ένας συνδετικός κρίκος μεταξύ της σηματοδότησης των GPCRs – οπιοειδών υποδοχέων και της ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων που συντελείται στον πυρήνα.



Σχήμα 3. Ενεργοποίηση τελεστών από τους οπιοειδείς υποδοχείς. Οι οπιοειδείς υποδοχείς ενεργοποιούνται από οπιοειδείς αγωνιστές και μεταβιβάζουν το ερέθισμα σε μια πλειάδα G πρωτεϊνών. Οι G πρωτεΐνες με τη σειρά τους ενεργοποιούν ή αναστέλλουν διάφορους τελεστές με τελικό αποτέλεσμα επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες ολόκληρου του οργανισμού, πολλές από τις οποίες αναφέρονται ενδεικτικά στον πίνακα του σχήματος.

### Κανάλια Κ<sup>+</sup> και Ca<sup>+2</sup>

Οι ενεργοποιημένοι οπιοειδείς υποδοχείς έχει δειχθεί ότι είναι σε θέση να ρυθμίζουν ιοντικά κανάλια  $K^+$  και  $Ca^{+2}$  (Ikeda et al., 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι μετά την ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων, οι απελευθερωμένες Gβγ υπομονάδες από το ετεροτριμερές των Gi/o πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με τα κανάλια ιόντων  $K^+$  εσωτερικής ανόρθωσης που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες (GIRK) και τα ενεργοποιούν, επιτρέποντας

τη μεταφορά ιόντων K<sup>+</sup> από το εξωτερικό του κυττάρου στο εσωτερικό και βοηθώντας στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων (υπερπόλωση μεμβράνης). Στα θηλαστικά έχουν κλωνοποιηθεί τέσσερα γονίδια που εκφράζουν αντίστοιχες υπομονάδες των GIRK καναλιών. Τα GIRK κανάλια που εκφράζονται στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι κυρίως ετερομερή που αποτελούνται από τις GIRK1 και GIRK2 υπομονάδες και συνυπάρχουν με τους οπιοειδείς υποδοχείς σε πολλούς νευρώνες. Η δράση των GIRK καναλιών φαίνεται ότι έχει άμεσες συνέπειες στην ανάπτυξη του φαινομένου της αναλγησίας στον οργανισμό.

Οι οπιοειδείς υποδοχείς μπορούν επίσης να αναστέλλουν τα τασεο-εξαρτώμενα ιοντικά κανάλια  $Ca^{+2}$  τύπου N-, P/Q- και R- μέσω των Gβγ υπομονάδων των ανασταλτικών Gi πρωτεϊνών (Law et al., 2000, Ikeda et al., 2002). Τα κανάλια  $Ca^{+2}$  αποτελούνται από τρεις τύπους υπομονάδων, τις  $a_{1A}$ ,  $a_{1B}$ ,  $a_{1E}$ , και ευθύνονται για Thv απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών στις προσυναπτικές περιοχές των νευρώνων. Συνεπώς, αναστολή αυτών των καναλιών από τους οπιοειδείς υποδοχείς οδηγεί σε αναστολή της μετάδοσης της νευρικής ώσης. Με αυτόν τον τρόπο οι οπιοειδείς υποδοχείς εμπλέκονται στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών στων νευροδιαβιβαστών από τους οπιοειδείς υποδοχείς εμπλέκονται στην απελευθέρωση των νευροκής ώσης. Με αυτόν τον τρόπο οι οπιοειδείς υποδοχείς εμπλέκονται στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών από προσυναπτικό σε μετασυναπτικό κύτταρα και στην μετάδοση της νευρικής ώσης από προσυναπτικό σε μετασυναπτικό νευρώνα. Μολονότι έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του μ-OR αναστέλλει τα κανάλια  $Ca^{+2}$  στην περιοχή της περιϋδραγωγού φαιάς ουσίας, η οποία είναι σημαντικό τμήμα του συστήματος ρύθμισης του πόνου στον εγκέφαλο (Connor et al., 1999), ωστόσο δεν υπάρχουν άμεσες αποδείξεις για τη συμμετοχή των καναλιών  $Ca^{+2}$  στην αναλγησία μέσω

## 1.4 Μεταγωγή της πληροφορίας των οπιοειδών υποδοχέων μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορες πρωτεΐνες

## 1.4.1 Ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις οπιοειδών υποδοχέων και λειτουργικά χαρακτηριστικά αυτών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σηματοδότηση των GPCRs γίνεται κυρίως μέσω των G πρωτεϊνών, τα τελευταία, όμως, χρόνια πολλαπλά βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν στο ότι πολλές από τις φυσιολογικές αποκρίσεις των GPCRs γίνονται και μέσω της παρέμβασης πρωτεϊνών πέρα από τις G πρωτεΐνες. Πράγματι, με τεχνικές ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών, όπως συντηγμένες (γιμαιρικές) πρωτεΐνες (fusion proteins), yeast two hybrid screening (Y2H, σύστημα 2 υβριδίων), πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης και άλλες μεθόδους, δείγθηκε ότι οι επταελικοειδείς υποδοχείς αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου εκτός από τις G πρωτεΐνες (Hall et al., 1999, Heuss and Gerber 2000, Brzostowski and Kimmel 2001, Alfaras-Melainis et al., 2009). Δεδομένα συνηγορούν επίσης ότι οι GPCRs είναι δυναμικές οντότητες και μπορούν να αλληλεπιδράσουν και μεταξύ τους δημιουργώντας διμερή ή ολιγομερή σύμπλοκα (George et al., 2000, Bouvier 2001, Milligan, 2004, Milligan, 2008). H απόδειξη της αλληλεπίδρασης των υποδοχέων αυτών τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί της κυτταρικής σηματοδότησης των GPCRs είναι πιο πολύπλοκοι από ότι μέχρι σήμερα ήταν γνωστό. Με βάση τα νέα αυτά δεδομένα οι αλληλεπιδράσεις των GPCRs μπορούν να ταξινομηθούν, εκτός από α) τις αλληλεπιδράσεις υποδογέα – G πρωτεϊνών, και σε β) αλληλεπιδράσεις υποδοχέα – υποδοχέα και γ) αλληλεπιδράσεις υποδοχέα με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, ανεξάρτητες των G πρωτεϊνών.

#### α) Αλληλεπιδράσεις οπιοειδών υποδοχέων – G πρωτεϊνών

Οι υπότυποι των οπιοειδών υποδοχέων, εκτός από την εξειδίκευση που παρουσιάζουν στην πρόσδεση αγωνιστών, ενεργοποιούν τελικά και διαφορετικούς τελεστές. Αυτό οφείλεται εν μέρει στη διαφορετική ρύθμιση των γονιδίων των υποδοχέων, αλλά και στην παρουσία διαφορετικών υποτύπων G πρωτεϊνών στους

διάφορους κυτταρικούς τύπους και ιστούς. Η κλασσική φαρμακολογία θεωρεί ότι οι προσδέτες ενός υποδοχέα διακρίνονται σε πλήρεις αγωνιστές, μερικούς αγωνιστές, ουδέτερους αγωνιστές και αντίστροφους αγωνιστές, ανάλογα με τη διαμόρφωση την οποία ωθούν τον υποδογέα να λάβει, προσδενόμενοι σε αυτόν (Urban et al., 2007). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η ικανότητα ενός προσδέτη να μεταδίδει ή όχι ένα ερέθισμα όταν προσδένεται στον υποδοχέα, είναι ιδιοσύστατη ιδιότητα του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα, και πάντα ίδια για το συγκεκριμένο ζεύγος προσδέτη-υποδοχέα, ανεξάρτητη από το κυτταρικό σύστημα μελέτης. Για το λόγο αυτό, οι διαφορές που παρατηρούνται στη σηματοδότηση ενός υποδοχέα μεταξύ κυττάρων/ιστών οφείλονται κυρίως στις διαφορές στην πυκνότητα του υποδοχέα ή/και στην ισχύ της σύζευξης του προσδέτη και στην ικανότητα αυτού να μεταφέρει το ερέθισμα. Παρόλα αυτά, μελέτες της τελευταίας δεκαετίας δείγνουν ότι ορισμένοι προσδέτες προκαλούν διαφορετικές λειτουργικές αποκρίσεις στον ίδιο υποδογέα. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι, ενώ ένας προσδέτης προκαλεί μια μοναδική και εξειδικευμένη διαμόρφωση στον υποδοχέα που προσδένεται, η μετάδοση του ερεθίσματος τελικά ακολουθεί διαφορετικά μονοπάτια σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα. Αυτή η διαφορική «ενεργοποίηση» δεν οφείλεται σε διαφορές στη συγγένεια του προσδέτη για τον υποδοχέα του, αλλά υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που θεωρούνται υπεύθυνοι: 1) ενδιάμεσες διαμορφώσεις του υποδοχέα λόγω σύζευξης του προσδέτη με αυτόν, 2) ποικιλία στις G πρωτεΐνες, στις πρωτεΐνεςικριώματος και στις πρωτεΐνες-συνεργάτες (partners) με τις οποίες αλληλεπιδρά ο υποδοχέας και 3) δημιουργία ολιγομερών υποδοχέων (διμερισμένων κλπ).

Στην περίπτωση των οπιοειδών υποδοχέων έχει δειχθεί ότι ο αγωνιστής DAMGO προκαλεί σημαντική ενδοκύττωση στον μ-OR, όπως και η μεθαδόνη, σε αντίθεση με τη πρόσδεση της μορφίνης στον υποδοχέα, που δεν προκαλεί ενδοκύττωση. Παρόλα αυτά, η μορφίνη έχει την ίδια επίδραση στους τελεστές με τη μεθαδόνη, ενεργοποιώντας τα κανάλια GIRK μέσω του μ-OR με μια εγγενή ενεργότητα ίδια ή μεγαλύτερη της μεθαδόνης. Συνεπώς μπορεί να υπάρχουν δυο διαφορετικές ενεργές διαμορφώσεις του υποδοχέα που προκαλούνται ή επιλέγονται από τον ίδιο προσδέτη (Urban et al., 2007). Στοιχεία δείχνουν ότι ενδεχομένως η διαφορική φωσφορυλίωση του μ-OR να είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο οι τελεστές μπορούν να διακρίνουν τις διαφορετικές επιδράσεις των προσδετών.

Όπως προαναφέρθηκε, οι G πρωτεΐνες αποτελούν την πρώτη άμεσα αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη των οπιοειδών υποδοχέων. Οι οπιοειδείς υποδοχείς, εφόσον ανήκουν στην υπεροικογένεια των GPCRs, μεταδίδουν το σήμα τους στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της σύζευξής τους με διάφορα μέλη της οικογένειας των G πρωτεϊνών και συζεύγνυνται ειδικότερα με την οικογένεια των Gi/o πρωτεϊνών (Milligan, 2005). Μελέτες με αντισώματα έναντι συγκεκριμένων περιοχών των Gi/Go υπομονάδων έδειξαν ότι οι μ-OR και δ-OR συζεύγνυνται με αυτές τις G πρωτεΐνες (Georgoussi et al., 1993, 1995). Πιο συγκεκριμένα, πειράματα με χρήση μεμβρανών από ινοβλάστες αρουραίου που εκφράζουν σταθερά τον μ-OR, έδειξαν ότι ο μ-OR αλληλεπιδρά με τις Gia2 και Gia3 υπομονάδες, και αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύεται όταν ο υποδοχέας ενεργοποιείται με DAMGO (Georgoussi et al., 1997). Σε άλλα πειράματα σε κυτταρικές μεμβράνες από ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SHSY5Y που επωάστηκαν με [α- $^{32}$ PIGTP azidoanilide, δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση του δ-OR με αγωνιστές οδήγησε στη ραδιοσήμανση των Gia1 υπομονάδων, έναντι της ενεργοποίησης του μ-OR που οδήγησε στη σήμανση των Gia3, ενώ κανένας από τους δυο υποδοχείς δεν σημαίνει τις Gia2 υπομονάδες (Laugwitz et al., 1993). Παρά την αδύναμη αλληλεπίδραση της Gia<sub>2</sub> με τον δ-OR, η ίδια υπομονάδα χρησιμοποιείται από τον δ-OR υποδοχέα για την μετακίνηση του ασβεστίου ενδοκυτταρικά σε κύτταρα ND8-47 (neuroblastoma x dorsal root ganglion, υβρίδιο νευροβλαστικών με νευρικά κύτταρα γαγγλίων ραχιαίας ρίζας), τα οποία έχουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα των Gia<sub>1</sub> υπομονάδων (Tang et al., 1995). Συνεπώς, οι υποδοχείς εμφανίζουν εξειδίκευση στη σύζευξη για συγκεκριμένες G πρωτεΐνες, τελικά όμως δεν αλληλεπιδρούν πάντα με αυτές. Μια πιθανή εξήγηση της ασυμφωνίας μεταξύ των G πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με έναν υποδοχέα και αυτών των G πρωτεϊνών που χρειάζονται για τη σύζευξη είναι η «αναδιοργάνωση»-αλλαγή των G πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με έναν υποδογέα κατά την ενεργοποίηση. Με μεθόδους ανοσο-συγκατακρήμνισης υποδοχέων-G υπομονάδων, δείχθηκε ότι ο διαλυτοποιημένος δ-OR αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες Gia1, Gia3, Goa και Gβ1.2 στην ανενεργή κατάσταση, ενώ αλληλεπιδρά με τις Gia<sub>2</sub>, Gia<sub>3</sub> και G $\beta_{1,2}$  παρουσία αγωνιστή (Law and Reisine, 1997). Έτσι, η αλληλεπίδραση με την Gia<sub>2</sub> υπομονάδα ανιχνεύθηκε μόνο για τον ενεργό υποδοχέα, ενώ η Goa αλληλεπιδρά μόνο με τον ανενεργό υποδοχέα. Στην περίπτωση του μ-OR, μελέτες έδειξαν ότι επίδραση με τον αγωνιστή DAMGO έχει ως

αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Gia<sub>2</sub> και Gia<sub>3</sub> πρωτεϊνών (Georgoussi et al., 1997). Σε επιπλέον μελέτες φάνηκε ότι ο μ-OR μπορεί να αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες της οικογένειας των Gqa, όπως είναι οι G<sub>15</sub>α και G<sub>16</sub>α (Offermanns and Simon, 1995), καθώς επίσης με τις Gz, ενώ έχει αναφερθεί αλληλεπίδραση των μ-OR και δ-OR με τις Gs πρωτεΐνες υπό συγκεκριμένες συνθήκες, που όμως χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης (Connor and Christie, 1999, Crain and Shen, 2000).

#### β) Αλληλεπιδράσεις υποδοχέα με υποδοχέα – ολιγομερισμός

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι οι επταελικοειδείς υποδοχείς δεν λειτουργούν μόνο ως αυτόνομες οντότητες αλλά μπορούν και δημιουργούν σύμπλοκα με άλλους επταελικοειδείς υποδοχείς, συγγενείς ή όχι, σχηματίζοντας διμερή ή ολιγομερή (Milligan, 2000, Bouvier, 2001, Milligan, 2004, Milligan, 2008). Ο σκοπός του διμερισμού ή ολιγομερισμού αυτών των υποδοχέων δεν είναι απόλυτα γνωστός όπως δεν είναι επίσης γνωστό, ποια είναι η φυσιολογική δράση των διμερισμένων μορφών των υποδογέων αυτών. Γεγονός είναι πάντως, ότι ο διμερισμός οδηγεί σε αλλαγές της φαρμακολογίας των επιμέρους υποδογέων, δηλαδή σε αλλαγές της ικανότητας πρόσδεσης των διαφόρων αγωνιστών και ανταγωνιστών για τον κάθε υποδοχέα, καθώς παρέχει περισσότερες της μιας θέσεις για ταυτόχρονη αλληλεπίδραση προσδετών και έρχεται να ανατρέψει την μέχρι πρόσφατα κρατούσα άποψη της φαρμακολογίας των υποδοχέων αυτών. Ο ολιγομερισμός των GPCRs οδηγεί επίσης σε αλλαγές της κυτταρικής σηματοδότησης των επιμέρους GPCRs, διότι ενεργοποιούνται ταυτόχρονα όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων που συμμετέχουν ή ενεργοποιούνται εντελώς νέοι σηματοδοτικοί δίαυλοι (Kroeger et al., 2004). Έχει δειχθεί, επίσης, ότι ο ολιγομερισμός των GPCRs μεταβάλλει το ρυθμό εσωτερίκευσης και απευαισθητοποίησης των υποδοχέων (Cvejic and Devi, 1997, Bouvier, 2001). Σχετικές μελέτες επισημαίνουν ότι δυο μεταλλαγμένοι υποδοχείς (π.χ. αδρενεργικοίμουσκαρινικοί), που στερούνται ικανότητας πρόσδεσης αγωνιστών, μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικά ετεροδιμερή ή ολιγομερή μέσω ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Οι διμερισμένες μορφές υποδοχέων αποκαθιστούν τη λειτουργία των υποδοχέων που από μόνοι τους δεν είναι λειτουργικοί (Maggio et al., 1993, Milligan, 2000).

Πρόσφατα δείχθηκε από διάφορες επιστημονικές ομάδες ότι οι οπιοειδείς υποδοχείς μπορούν να διμερίζονται (Cvejic and Devi 1997, Jordan and Devi, 1999, Milligan, 2004, Milligan, 2008, van Rijn et al., 2010). Πράγματι, και οι τέσσερις τύποι των οπιοειδών υποδοχέων θεωρείται ότι σχηματίζουν ομομερή και ετερομερή σύμπλοκα (Devi, 2001, Milligan, 2004, van Rijn et al., 2010). Σήμερα οι ερευνητές θεωρούν ότι κάθε οπιοειδής υποδοχέας είναι σε θέση να δημιουργεί ένα ετεροδιμερές με οποιονδήποτε άλλο οπιοειδή υποδοχέα. Υπάρχουν επίσης αναφορές για ετεροδιμερισμό των οπιοειδών υποδοχέων με υποδοχείς από άλλες κατηγορίες GPCRs της ίδιας οικογένειας, όπως για παράδειγμα ο σχηματισμός διμερών μεταξύ κ- και δ-OR με τον  $β_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα ( $β_2$ -AR) και ο διμερισμός του μ-OR με τον  $α_{2A}$ -αδρενεργικό υποδοχέα ( $α_{2A}$ -AR) (Jordan et al., 2003).

Ο ετεροδιμερισμός έχει δειχθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη φαρμακολογία των οπιοειδών υποδοχέων (Milligan, 2004, Milligan, 2008, van Rijn et al., 2010), μεταβολές στις ιδιότητες των οπιοειδών προσδετών (Jordan and Devi, 1999, George et al., 2000), επίδραση στη σύζευξη των υποδοχέων με τους τελεστές, καθώς και τροποποιήσεις της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των υποδοχέων αυτών σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Jordan et al., 2001). *In vivo* μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι ο μ-OR μπορεί να ολιγομερίζεται με τον εαυτό του και να ενδοκυττώνεται ως απόκριση στη μορφίνη, όταν αυτή χορηγείται μαζί με πολύ μικρή δόση DAMGO (He et al., 2002). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι, ενώ ο δ-OR εσωτερικεύεται όταν ενεργοποιείται από αγωνιστές, σε αντίθεση με τον κ-OR, το ετεροδιμερές δ-OR/κ-OR έχει διαφορετικές ιδιότητες και η συμπεριφορά του κ-OR υπερισχύει, οδηγώντας σε μειωμένη εσωτερίκευση του ετεροδιμερούς όταν εκτίθεται σε αγωνιστές είτε του δ-OR, είτε του κ-OR (Jordan and Devi, 1999).

Πέραν, όμως, από τον ολιγομερισμό των οπιοειδών υποδοχέων μεταξύ τους, υπάρχουν και αλληλεπιδράσεις με άλλους υποδοχείς που οδηγούν σε αλλαγές στη σηματοδότηση και στην εμφάνιση ετεροδιμερών με διαφορετική φαρμακολογία από κάθε υποδοχέα ξεχωριστά (Milligan, 2008). Μελέτες με τη χρήση της τεχνολογίας BRET έδειξαν ότι ο υποδοχέας των καναβιδοειδών CB1 και οι μ-, δ- και κ- οπιοειδείς υποδοχείς αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ετεροδιμερή (Rios et al., 2006). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης του μ-OR στις MAPK κινάσες,

όταν κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν και τους δυο υποδοχείς ενεργοποιούνται με τον αγωνιστή WIN του CB1 υποδοχέα. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση και των δυο υποδοχέων σε κύτταρα Neuro-2A που τους εκφράζουν, οδήγησε σε αναστολή της φωσφορυλίωσης των Src και STAT3 μεταγραφικών παραγόντων και στη μείωση της νευριτογένεσης. Νεώτερες μελέτες με συνέκφραση του μ-OR με μια μορφή του α<sub>2A</sub>-αδρενεργικού υποδοχέα, η οποία είναι δυνατόν να ανιχνεύσει αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα μέσω τεχνολογίας FRET (Fluoresence Resonance Energy Transfer), έδειξαν ότι οι δυο υποδοχείς διμερίζονται και ότι η μορφίνη μπορεί να προάγει μεταβολές στη στερεοδιαμόρωση του  $\alpha_{2A}$ -αδρενεργικού υποδοχέα (Vilardaga et al., 2008). Αυτές οι μεταβολές στο μόριο του αδρενεργικού υποδοχέα είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή της ρύθμισης της δράσης των ERK κινασών που προκαλεί η σηματοδότηση του α<sub>2A</sub>αδρενεργικού υποδοχέα. Άλλες μελέτες δεικνύουν ότι ο δ-OR μπορεί να αλληλεπιδρά και να σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον υποδοχέα των χημοκινών CXCR2 που προσδένει την ιντερλευκίνη 8 (Parenty et al., 2008). Στις ίδιες μελέτες φάνηκε επίσης ότι ένας ανταγωνιστής του CXCR2 υποδογέα, ο οποίος δεν προσδένεται στον δ-OR, ενισχύει τη δράση διαφόρων πεπτιδικών ή αλκαλοειδών αγωνιστών του δ-OR, μέσω ενός αλλοστερικού μηχανισμού στο ετεροδιμερές σύμπλοκο των δυο υποδοχέων.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, φαρμακολογικές μελέτες διαπιστώνουν την παρουσία συγκεκριμένων υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων πέραν των ήδη γνωστών, οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί γενετικά, καθώς δεν έχουν ανακαλυφθεί τα αντίστοιχα γονίδια στο γονιδίωμα. Η κατανόηση του φαινομένου του ετεροδιμερισμού ενδεχομένως να εξηγεί την παρουσία αυτών των υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων, που είναι πιθανόν προϊόντα αλληλεπίδρασης/ολιγομερισμού διαφορετικών υποδοχέων (Bouvier, 2001, van Rijn et al., 2010).

## γ) Αλληλεπιδράσεις οπιοειδών υποδοχέων με πρωτεΐνες ανεξάρτητες των G πρωτεϊνών

Οι GPCRs είναι δυναμικές οντότητες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν και να συζεύγνυνται με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ανεξάρτητες των G πρωτεϊνών (Σχήμα 4). Αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η περαιτέρω τροποποίηση της δυναμικής της σηματοδότησης των GPCRs (Milligan, 2005, Georgoussi, 2008).

#### i) Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση των G πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη που βρέθηκε πρωταρχικά ότι αλληλεπιδρά απευθείας με τους οπιοειδείς υποδοχείς και δεν ανήκει στις G πρωτεΐνες είναι η καλμοδουλίνη (calmodulin). Η καλμοδουλίνη είναι πρωτεΐνη που προσδένει ιόντα Ca<sup>+2</sup> και ρυθμίζει τη λειτουργία κυτταροπλασματικών ενζύμων όπως κινάσες και φωσφατάσες, αλλά και άλλων πρωτεϊνών όπως η αδενυλική κυκλάση και ιοντικά κανάλια. Σε πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια από τις ενδοκυτταρικές περιοχές του μ-OR και του δ-OR φάνηκε ότι η καλμοδουλίνη αλληλεπιδρά απευθείας με τους υποδοχείς και έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών σε συνθήκες ενεργοποίησης ή μη από αγωνιστή (Wang et al., 1999). Μελέτες επίσης δεικνύουν ότι η καλμοδουλίνη ανταγωνίζεται την πρόσδεση των G πρωτεϊνών στους οπιοειδείς υποδοχείς και είναι δυνατόν να απελευθερώνεται και να λειτουργεί ως δεύτερος μηνύτορας μετά από την ενεργοποίηση των υποδοχέων (Wang et al., 2000).

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι στους οπιοειδείς υποδοχείς μπορεί να προσδένεται μια νέα πρωτεΐνη που καλείται περιπλακίνη (periplakin) (Feng et al., 2003). Η πρωτεΐνη αυτή προσδένεται στην ακτίνη και τα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού στα κερατινοκύτταρα, αλλά και στα νευρικά κύτταρα και είναι πιθανόν να παρεμβαίνει στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων. Πράγματι, σε πειράματα ενεργοποίησης κυττάρων HEK293 με τον αγωνιστή DAMGO (Human Embryonic Kidney, κύτταρα ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού) που συνεκφράζουν τον μ-OR και την περιπλακίνη, βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών μειώνεται χωρίς να επηρεάζεται αντίστοιχα η εσωτερίκευση του υποδοχέα (Feng et al., 2003).

## <u>ii) Αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την φωσφορυλίωση,</u> απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση των υποδοχέων.

Μια από της κατηγορίες πρωτεϊνών που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν απευθείας με τους ενεργοποιημένους GPCRs είναι οι ονομαζόμενες **GRKs** (G protein-coupled receptor kinases, κινάσες των GPCRs) (Pitcher et al., 1998). Οι GRKs φωσφορυλιώνουν

τους GPCRs, οδηγώντας τους έτσι στο πρώτο στάδιο της αποσύζευξης από τις G πρωτεΐνες και απευαισθητοποίησης. Μελέτες έχουν δείξει ότι μέλη των GRK πρωτεϊνών όπως η κινάση 1 του β-αδρενεργικού υποδοχέα (β-adrenergic receptor kinase 1, betaARK1) και η GRK5 αλληλεπιδρούν με τον δ-OR και υπερέκφραση αυτών σε κύτταρα HEK293 οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης αυτού του υποδοχέα μετά από ενεργοποίηση με αγωνιστή (Pei et al., 1995). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης, ότι η φωσφορυλίωση του δ-OR από την GRK2 συμβάλλει σημαντικά στην εσωτερίκευση και ανακύκλωση του υποδοχέα (Zhang et al., 2008). Πειραματικά δεδομένα εμπλέκουν επίσης την GRK2 στην εσωτερίκευση και αποικοδόμηση-μειορύθμιση του κ-OR (Li et al., 2000).

Στους ενεργοποιημένους υποδογείς που έχουν φωσφορυλιωθεί προσδένεται μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών που καλούνται β-αρρεστίνες (β-arrestins) και έχει δειχθεί ότι είναι κρίσιμες για την απευαισθητοποίηση των GPCRs, καθώς αναστέλλουν σε δεύτερο στάδιο την αλληλεπίδραση των G πρωτεϊνών με τους υποδοχείς και αλληλεπιδρούν με την κλαθρίνη, την AP-2 (adaptor protein, πρωτεΐνη προσαρμογής της κλαθρίνης) και την πρωτεΐνη NSF (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein), επάγοντας την ενδοκύττωση των υποδοχέων μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Μελέτες σε κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν τον κ-OR, έδειξαν ότι η συνέκφραση της β-αρρεστίνης 1 οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών μετά από την διέγερση του υποδογέα με αγωνιστή (Cheng et al., 1998), ενώ αντίστοιχες μελέτες για τους μ- και δ-OR έδειξαν ότι η β-αρρεστίνη 2 οδηγεί σε απευαισθητοποίηση των υποδοχέων (Kovoor et al., 1997). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η β-αρρεστίνη 2 μπορεί να προσδένεται και στο μη φωσφορυλιωμένο δ-OR, οδηγώντας σε απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση των υποδοχέων, ενώ οι β-αρρεστίνες παίζουν ρόλο και στην ανακύκλωση (αρρεστίνη 1) ή αποικοδόμηση (αρρεστίνη 2) του δ-OR (Zhang et al., 2008, Zhang et al., 2005).

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μοριακά ικριώματα για τη δημιουργία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, ξεχωριστό ρόλο έχει η σπινοφιλίνη (spinophilin, SPL), μια πρωτεΐνη με πολλές διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης με άλλες πρωτεΐνες. Η σπινοφιλίνη παίρνει μέρος στην οργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και στη μορφολογία των δενδριτικών ινών, στην συναπτική πλαστικότητα και στη μετανάστευση

των νευρώνων (Sarrouilhe et al., 2006). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η σπινοφιλίνη αλληλεπιδρά απευθείας με τον μ-OR στους νευρώνες του ραβδωτού σώματος εγκεφάλου ποντικού και αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνεται με την τοπική χορήγηση μορφίνης (Charlton et al., 2008), ρυθμίζοντας έτσι τη σηματοδότηση του υποδοχέα και την ενδοκυττάρωσή του. Σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού, απάλειψη του γονιδίου της σπινοφιλίνης οδηγεί σε μειωμένη αναλγησία στην στιγμιαία χορήγηση μορφίνης, και σε αυξημένη ανοχή και εξάρτηση στη μορφίνη σε περιπτώσεις χρόνιας χορήγησης.



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση ορισμένων αλληλεπιδράσεων των οπιοειδών υποδοχέων με πρωτεΐνες εκτός των G πρωτεϊνών. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τον οπιοειδή υποδοχέα γίνεται μέσω της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού του άκρου.

## iii) Αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την κυκλοφορία και τη λυσοσωμική στόχευση

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για να μελετηθεί η πορεία των οπιοειδών υποδοχέων μετά από την ενδοκύττωση έδειξαν ότι το καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR ευθύνεται για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με μια πρωτεΐνη που καλείται GPCR-associated sorting protein-1 (GASP-1) (Whistler et al., 2002). Η GASP-1 είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και η δράση της είναι ουσιαστική για τη λυσοσωμική μετατόπιση του δ-OR και άλλων GPCRs. Βρέθηκε ότι η GASP-1 αλληλεπιδρά με τον δ-OR και τον οδηγεί στα λυσοσώματα μετά την ενδοκύττωσή του με κυστίδια κλαθρίνης,

φαινόμενο που δεν παρατηρείται για τον μ-OR, ο οποίος μετά την ενδοκύττωση ανακυκλώνεται στην επιφάνεια όπου και επανευαισθητοποιείται (Whistler et al., 2002).

Έρευνες που έγιναν για να εξακριβώσουν τον τρόπο με τον οποίο επιλέγεται η ενδοκυτταρική τύχη του κ-OR (ανακύκλωση ή λύση) αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη **EBP50/NHERF** (ERM binding protein 50/ Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor) ανοσοσυγκατακρημνίζεται με τον κ-OR σε ζωντανά κύτταρα (Li et al., 2002). Η πρωτεΐνη EBP50/NHERF περιλαμβάνει ποικίλα δομικά μοτίβα, μεταξύ των οποίων και δυο PDZ περιοχές, και μπορεί να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που προσδένονται στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η πρόσδεση στον κ-OR δεν επηρεάζει την εσωτερίκευση του υποδοχέα που προκαλείται από αγωνιστή, αλλά αυξάνει το ρυθμό ανακύκλωσης του εσωτερικευμένου υποδοχέα αποτρέποντας την στόχευσή του στα λυσοσώματα. Αντίθετα με τον κ-OR, οι μ-OR και δ-OR δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την EBP50/NHERF.

#### iv) Αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που διαθέτουν μεταγραφική ενεργότητα

Με βάση το γεγονός ότι οι GPCRs έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που διαθέτουν μεταγραφική ενεργότητα, μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι οι μ- και δ- οπισειδείς υποδοχείς αλληλεπιδρούν με μέλη της οικογένειας των STAT (Signal transducers and activators of transcription)  $\mu$ εταγραφικών παραγόντων. Πράγματι, πειραματικά δεδομένα από pull-down πειράματα πειράματα και συνανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η STAT5A προσδένεται απευθείας στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR και ειδικότερα στο συντηρημένο μοτίβο YXXL, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση με αγωνιστή (Mazarakou and Georgoussi, 2005). Λειτουργικά πειράματα σε κύτταρα COS-7 παροδικά διαμολυσμένα με τον μ-OR και την STAT5A, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του υποδογέα με τον ειδικό αγωνιστή DAMGO ή με μορφίνη οδηγεί σε φωσφορυλίωση την STAT5A, μέσω μιας διαδικασία που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Src αλλά δεν περιλαμβάνει τις Gi/o πρωτεΐνες. Στις ίδιες μελέτες δεικνύεται ότι η ενεργοποίηση με μορφίνη κυττάρων ΗΕΚ293 που εκφράζουν μόνιμα τον μ-OR οδηγεί επίσης σε φωσφορυλίωση της STAT5A και ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας.

Νεώτερες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι αντίστοιχα ο STAT5B μεταγραφικός παράγοντας αλληλεπιδρά ιδιοσύστατα με τον δ-OR (Georganta et al., 2010). Πειράματα σε κύτταρα HEK293 που εκφράζουν μόνιμα τον δ-OR, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα με τον ειδικό αγωνιστή DSLET οδηγεί σε φωσφορυλίωση της STAT5B και ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητάς της. Στις ίδιες μελέτες φάνηκε επίσης ότι η ενεργοποίηση της STAT5B από τον δ-OR γίνεται μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τις Gi/o πρωτεΐνες, τις Gβγ υπομονάδες και την c-Src κινάση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η STAT5B δημιουργεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες και σε συνεργασία με τις Gβγ υπομονάδες και την ενεργοποιημένη Src. Αυτά τα σχηματιζόμενα πολύ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα χρησιμοποιούν ως πλατφόρμα τον δ-OR και ο σχηματισμός τους εξαρτάται από την κατάσταση ενεργοποίησης του υποδοχέα.

## 1.4.2 Περιοχές των οπιοειδών υποδοχέων που ευθύνονται για τις ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις

Πολλαπλά βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν στο γεγονός ότι τα ενδοκυτταρικά τμήματα των GPCRs είναι αυτά που ευθύνονται κυρίως για την μεταγωγή της πληροφορίας από τους υποδοχείς στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον τους και την εν γένει επικοινωνία με τα υπόλοιπα σηματοδοτικά μόρια. Πράγματι, παρατηρήσεις που αποκομίσθηκαν από προσεγγίσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια, μικρογονίδια και χιμαιρικοί υποδοχείς (Lutrell et al., 1993, Hawes et al., 1994, Taylor et al., 1994, Gilchrist et al., 1999, 2001, Wess, 1998), υποδεικνύουν ότι η κυτταροπλασματική πλευρά των GPCRs και ειδικότερα η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά και το καρβοζυτελικό άκρο είναι σημαντικά, τόσο για τη μετάδοση του σήματος στις G πρωτεΐνες, όσο και για την αλληλεπίδραση με μια μεγάλη ποικιλία από πρωτεϊνικά μόρια που είναι σε θέση να ρυθμίζουν τη σηματοδότηση των GPCRs.

Όσον αφορά τους οπιοειδείς υποδοχείς, μελέτες διαφόρων ερευνητών αλλά και του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά και το καρβοξυτελικό άκρο των υποδοχέων αυτών ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις με τις διάφορες πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν. Αυτό οφείλεται στο ότι στην τρίτη θηλιά και το καρβοξυτελικό

άκρο των οπιοειδών υποδοχέων εδράζονται σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα και δομικά μοτίβα που μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση με αντίστοιχες λειτουργικές περιοχές των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών και τα οποία αναλύονται παρακάτω.

#### Τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά

Η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά των οπιοειδών υποδοχέων είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των τριών υποτύπων μ-, δ- και κ-OR και περιλαμβάνει ένα δομικό μοτίβο, το BBXXB, κοντά στην έκτη διαμεμβρανική έλικα (όπου B ένα βασικό αμινοξύ και X ένα οποιοδήποτε άλλο). Μια πληθώρα εργασιών στους GPCRs, έχουν αποδείξει τον θεμελιώδη ρόλο της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς στη σύζευξη με τις G πρωτεΐνες και την ενεργοποίηση των τελεστών (Law et al., 1999). Η δεύτερη ενδοκυτταρική θηλιά εμπλέκεται πιθανότερα στην ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών, όμως η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά είναι αυτή που θεωρείται ως ο βασικός καθοριστής της εξειδίκευσης στη σύζευξη μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων των G πρωτεϊνών (Gether, 2000).

Στην περίπτωση των οπιοειδών υποδοχέων, μελέτες του εργαστηρίου μας με πεπτίδια που αντιστοιχούν στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά των μ-OR και δ-OR, τα οποία περιλαμβάνουν το BBXXB δομικό μοτίβο και δρουν ανταγωνιστικά με τους υποδογείς, απέδειξαν την σπουδαιότητα αυτής της περιοχής για τη σύζευξη των G πρωτεϊνών και την ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, τα πειράματα αυτών των μελετών απέδειξαν την συνεισφορά του αρχικού και τελικού τμήματος της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς στη σύζευξη των Gia<sub>2</sub> και Gia<sub>3</sub> υπομονάδων με τους μ- και δ-ORs και στην ενεργοποίησή τους καθώς και στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης που είναι ο κύριος τελεστής τους (Merkouris et al., 1996, Georgoussi et al., 1997, Megaritis et al., 2000). Νεώτερες μελέτες του εργαστηρίου ήρθαν σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, όπου φάνηκε ότι η έκφραση ενός μικρογονιδίου, που κωδικοποιεί ολόκληρη την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του δ-OR, μπορεί να παρεμποδίζει τη σύζευξη των G πρωτεϊνών με τους οπιοειδείς υποδοχείς αλλά και με άλλους γενικότερα GPCRs, και εμπλέκεται στην μεταγωγή της πληροφορίας από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα σε συστατικά καθοδικά του υποδοχέα (downstream components) (Morou and Georgoussi, 2005). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά των οπιοειδών υποδοχέων μεσολαβεί στην ειδική ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών από συγκεκριμένους αγωνιστές και ότι η αλληλεπίδραση του μοτίβου BBXXB με τις G πρωτεΐνες εξαρτάται από τους αγωνιστές αυτούς (Chaipatikul et al., 2003). Με τη χρήση μ-OR/δ-OR χιμαιρικών υποδοχέων, πιστοποιήθηκαν οι θέσεις της πρωτοταγούς δομής των GPCRs, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την σύζευξη και την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και των τελεστών και για την εν γένει λειτουργικότητα και ετερογένεια αυτών των υποδοχέων (Chan et al., 2003).

Πέραν όμως από τη σημασία της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς στη σύζευξη των οπιοειδών υποδοχέων με τις G πρωτεΐνες, φαίνεται ότι αυτή η περιοχή ευθύνεται και για την αλληλεπίδραση με πολλές από τις άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν καθώς και για τη αλλαγή του σηματοδοτικού μονοπατιού της πληροφορίας που διαβιβάζεται. Έτσι, έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση της καλμοδουλίνης γίνεται στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του μ-OR και δ-OR, στην ίδια περιοχή όπου προσδένονται και οι G πρωτεΐνες, και ο ανταγωνισμός στην πρόσδεση οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση των G πρωτεΐνων (Wang et al., 1999). *In vitro* πειράματα pulldown πρόσδεσης έδειξαν ότι η τρίτη θηλιά του δ-OR είναι επίσης σημείο αλληλεπίδρασης με τις β-αρρεστίνες 1 και 2 (Cen et al., 2001β). Πειράματα πρόσδεσης με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά που περιέχει σημειακές μεταλλαγές, έδειξαν ότι η Ser249 και η Ser255 σε αυτό το τμήμα του δ-OR παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την β-αρρεστίνη 1 (Cen et al., 2001α).

#### Καρβοξυτελικό άκρο

Το καρβοξυτελικό άκρο των GPCRs είναι πλέον εδραιωμένο ως μια δυναμική περιοχή για την ρύθμιση των υποδοχέων αυτών, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ερεθίσματος, στην αναδίπλωση, όπως επίσης και στην ενεργοποίηση των GPCRs (Bockaert et al., 2003). Επιπλέον, η ανακάλυψη της αλληλεπίδρασης διαφόρων πρωτεϊνών με το καρβοξυτελικό άκρο των GPCRs, αναδεικνύει την σημασία του ενδοκυτταρικού αυτού τμήματος στην πολυπλοκότητα της σηματοδότησης των υποδοχέων αυτών (Bockaert et al., 2004α, β). Τα καρβοξυτελικά άκρα των μ-, δ- και κ-OR έχουν παρόμοιο μέγεθος, αποτελούμενα από 63 αμινοξέα για τον μ- υποδοχέα, 55 αμινοξέα για τον δ- υποδοχέα και 51 αμινοξέα για τον κ- υποδοχέα, διαφέρουν όμως στο μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας τους. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα τμήματα των

οπιοειδών υποδοχέων διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή κοντά στην έβδομη διαμεμβρανική περιοχή, κοινή και για τους τρεις υποτύπους οπιοειδών υποδοχέων. Η περιοχή αυτή αποτελείται από την αμινοξική αλληλουχία YAFLDENFKRCFRXXC, από το τέταρτο αμινοξύ της οποίας θεωρείται ότι σχηματίζεται μια τέταρτη ενδοκυτταρική θηλιά με μορφή έλικας (έλικα VIII), μέσω της παλμιτυλίωσης μιας συντηρημένης κυστεΐνης στη θέση 351 για τον  $\mu$ -OR, στη θέση 333 για τον δ-OR και στη θέση 345 για τον κ-OR (Palczewski et al., 2000, Lu et al., 2002, Σχήμα 1 και 11A). Αντίθετα, το υπόλοιπο τμήμα των καρβοξυτελικών άκρων των οπισειδών υποδοχέων δεν εμφανίζει καμιά ομοιότητα. Ακριβώς πριν από αυτήν τη συντηρημένη περιοχή των καρβοξυτελικών άκρων των οπιοειδών υποδοχέων εντοπίζεται ένα μοτίβο που είναι συντηρημένο στους GPCRs και αποτελείται από τα αμινοξέα NPXXY, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ (Probst et al., 1992). Το μοτίβο αυτό θεωρείται ότι λειτουργεί ως αλληλουχία-σήμα εσωτερίκευσης για τους GPCRs. Στην περίπτωση των οπιοειδών υποδοχέων, το συγκεκριμένο μοτίβο φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τις διαμεμβρανικές περιοχές 2 και 6 καθώς και με την έλικα VIII για να διατηρήσει τον υποδοχέα στην μη ενεργή διαμόρφωση (Xu et al., 2005), ενώ η τυροσίνη του μοτίβου είναι σημαντική για την εσωτερίκευση των υποδοχέων και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (βλ. παρακάτω, μοτίβο YXXL) (Kramer et al., 2000, Mazarakou and Georgoussi, 2005, Georgoussi et al., 2010).

Παλιότερες μελέτες του εργαστηρίου της Δρ. Γεωργούση έδειξαν ότι ένα πεπτίδιο το οποίο αντιστοιχεί στην προβλεπόμενη τέταρτη ενδοκυτταρική θηλιά των οπιοειδών υποδοχέων κοντά στην έβδομη διαμεμβρανική περιέλιξη (πεπτίδιο i4, DENFKRCFRQLC), δεν μεταβάλλει την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών, μειώνει όμως την ειδική πρόσδεση του αγωνιστή DSLET στον δ-OR και του αγωνιστή DAMGO στον μ-OR, δεικνύοντας με αυτά τα αποτελέσματα τη σημασία και συμβολή αυτής της περιοχής στην αλληλεπίδραση με τις G πρωτεϊνες (Merkouris et al., 1996, Georgoussi et al., 1997).

Τα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων είναι περιοχές αλληλεπίδρασης για πάνω από 10 GIPs (Milligan, 2005, Georgoussi, 2008). Για παράδειγμα η περιπλακίνη, που έχει προαναφερθεί ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη των δ-OR και μ-OR, έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την προβλεπόμενη τέταρτη ενδοκυτταρική θηλιά του

καρβοξυτελικού άκρου των οπισειδών υποδοχέων (Feng et al., 2003). Το καρβοξυτελικό άκρο των οπιοειδών υποδογέων είναι επίσης στόχος φωσφορυλίωσης για τις GRKs και άλλες κινάσες, καθώς περιέχει πολλά κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης. Για παράδειγμα, όταν στον δ-OR αντικατασταθούν 3 αμινοξέα-κλειδιά στο καρβοξυτελικό άκρο, η GRK δεν μπορεί πλέον να προσδεθεί στον υποδοχέα και να τον φωσφορυλιώσει. (Guo et al., Δεδομένου ότι το καρβοζυτελικό άκρο των οπισειδών υποδογέων 2000). φωσφορυλιώνεται, θα μπορούσε επίσης να αποτελεί περιοχή αλληλεπίδρασης με τις αρρεστίνες. Πράγματι, πειράματα pulldown πρόσδεσης και τεχνικές surface plasmon resonance (SRF) έδειξαν ότι οι β-αρρεστίνες μπορούν και προσδένονται στο καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR και του κ-OR και μάλιστα η αλληλεπίδραση συμβαίνει σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης, ενώ φάνηκε ότι το καρβοζυτελικό άκρο του δ-OR παίζει σημαντικό ρόλο στην απευαισθητοποίηση του υποδογέα (Kovoor et al., 1997, Cen et al., 2001α, β). Παρόμοιες μελέτες όπου πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλαγές αμινοξέων έδειξαν ότι κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του κ-OR παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της β-αρρεστίνης 1 στον συγκεκριμένο οπιοειδή υποδοχέα, ενώ η ίδια αρρεστίνη δεν μπορεί να προσδεθεί στον μ-OR (Cheng et al., 1998).

Οσον αφορά την GASP-1 πρωτεΐνη, αυτή δείχθηκε ότι αλληλεπιδρά με την περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου των οπιοειδών υποδοχέων που αντιστοιχεί στην έλικα VIII και μάλιστα με δυο συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα (Phe 325 και Lys 326 για τον δ-OR). Η GASP-1 βρέθηκε επίσης να αλληλεπιδρά με έναν ελλειμματικό στο καρβοξυτελικό άκρο μ-OR, από τον οποίο έχει αφαιρεθεί η περιοχή που ευθύνεται για την ανακύκλωση του υποδοχέα, με συνέπεια όχι μόνο να αναστέλλεται η ανακύκλωση του υποδοχέα, με συνέπεια όχι μόνο να αναστέλλεται η ανακύκλωση του υποδοχέα, με συνέπεια όχι μόνο να αναστέλλεται η ανακύκλωση του υποδοχέα, με συνέπεια όχι μόνο να αναστέλλεται η ανακύκλωση του υποδοχέα, αλλά και να προάγεται η αποικοδόμηση του (Thompson et al., 2007). Αντιστοίχως, οι STAT5A/B μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με τα καρβοξυτελικά άκρα των μ-OR και δ-OR, και η πρόσδεση γίνεται στο YXXL συντηρημένο μοτίβο (όπου Y οποιοδήποτε αμινοξύ) που υπάρχει και στους τρεις οπιοειδείς υποδοχείς όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, δεικνύοντας ότι το καρβοξυτελικό άκρο των μ-OR και δ-OR χρησιμεύει ως πλατφόρμα για το σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που περιλαμβάνουν τις STAT5 και μέλη των Gα και Gβγ υπομονάδων (Mazarakou and Georgoussi, 2005, Georganta et al., 2010). Άλλες

πρωτεΐνες όπως ο παράγοντας EBP50/NHERF που διαθέτουν PDZ μοτίβα στην αλληλουχία τους, δείχθηκε ότι αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό άκρο των οπιοειδών υποδοχέων.

Όλα αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά και το καρβοξυτελικό άκρο των οπιοειδών υποδοχέων αποκτούν μια συγκεκριμένη στερεοδιαμόρφωση εσωτερικά της μεμβράνης, όπου δημιουργείται μια «πλατφόρμα» πάνω στην οποία μπορούν να προσδένονται διάφορες πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η δημιουργία συμπλόκων ενδοκυτταρικά του υποδοχέα, τα οποία ευθύνονται για την εξειδίκευση της σηματοδότησης, για τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα, τη φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών, για τον τερματισμό του σήματος και τέλος για την ενδοκύττωση του υποδοχέα και τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων.

#### 1.4.3 RGS πρωτεΐνες

#### Ιστορική αναδρομή και γενικά χαρακτηριστικά

Όπως προαναφέρθηκε, το κλασσικό μοντέλο σηματοδότησης των GPCRs ήταν περιορισμένο σε ένα σύστημα τριών στοιχείων: υποδοχέας, G πρωτεΐνες και τελεστές. Στο μοντέλο αυτό, η διάρκεια της σηματοδότησης των GPCRs μέσω των G πρωτεϊνών ορίζεται κυρίως από τη διάρκεια ζωής της Ga υπομονάδας, δηλαδή από το γρονικό διάστημα που η Ga υπομονάδα βρίσκεται στην ενεργή της διαμόρφωση (δεσμευμένη με GTP). Η εγγενής ενεργότητα GTPάσης των Ga υπομονάδων θεωρείτο ότι έπαιζε ρόλοκλειδί στη ρύθμιση του κύκλου ενεργοποίησης-απενεργοποίησης των G πρωτεϊνών (Neubig and Siderovski, 2002, Jean-Baptiste et al., 2006). Πρώιμα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι Ga υπομονάδες μπορούσαν να υδρολύουν το GTP, ο ρυθμός αυτός της αυτο-απενεργοποίησης, όμως, είναι συνήθως αργός και δεν δικαιολογούσε την γρήγορη απόκριση σε ερεθίσματα και τον ταχύ τερματισμό της σηματοδότησης των GPCRs σε διάφορα συστήματα (Gilman, 1987). Απομονωμένες Gta υπομονάδες σε διάλυμα είγαν αργό ρυθμό υδρόλυσης (1 με 2 αντιδράσεις ανά λεπτό) του GTP (μικρή ενεργότητα GTPάσης), όπου η ταχύτητα υδρόλυσης του GTP περιορίζεται μόνο από το ρυθμό απελευθέρωσης του GDP από την Ga υπομονάδα μετά την υδρόλυση. Αντίθετα, η επαναφορά των φωτοευαίσθητων κυττάρων στα ραβδία μετά από ένα φωτεινό ερέθισμα είναι πολύ πιο γρήγορη (περίπου 200 msec) (Arshavsky and Pugh Jr, 1998). Σε τεχνητά ανασυσταθέντα συστήματα που περιελάμβαναν τον υποδοχέα και τις G πρωτεΐνες, η ενεργοποίηση του πρώτου δεν προκαλούσε τον ίδιο βαθμό υδρόλυσης του GTP στην Ga, με αυτόν που παρατηρείται σε κυτταρικά συστήματα (Wilkie, 2000). Αυτό ώθησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι ενδεχομένως υπάρχουν επιπλέον στοιχεία που επιταχύνουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP της Ga υπομονάδας. Εκτεταμένες μελέτες έδειξαν ότι πρωταγωνιστικό ρόλο παίζει η παρουσία μιας νέας οικογένειας πρωτεϊνών, των αποκαλούμενων ρυθμιστών της κυτταρικής σηματοδότησης μέσω G πρωτεϊνών (Regulators of G protein Signaling, RGS), οι οποίες επιταχύνουν τον τερματισμό του ερεθίσματος με την επαναφορά των Ga υπομονάδων στην ανενεργή τους κατάσταση και την επακόλουθη δημιουργία της ετεροτριμερούς μορφής των G πρωτεϊνών (Berman et al., 1996α, β, Siderovski et al., 1996, Hepler, 1999, Sierra et al., 2000, McCudden et al., 2005).

Η εκτίμηση του σημαντικού ρόλου των RGS πρωτεϊνών στον τερματισμό της σηματοδότησης των GPCRs έγινε για πρώτη φορά στη ζύμη (Saccharomyces cerevisiae) και ακολούθησε ο νηματώδης σκώληκας (*Caenorhabditis elegans*). Το γονίδιο sst2 της ζύμης ταυτοποιήθηκε πριν από περίπου τρεις δεκαετίες, μετά από τη μελέτη μεταλλαγών που οδηγούσαν στη δημιουργία στελεχών ανίκανων να ξεπεράσουν την παροδική αναστολή της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην S (μια απόκριση στη φερομόνη του ζευγαρώματος, διαμεσολαβούμενη από GPCRs) (Chan and Otte, 1982). Αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκε το γονίδιο egl-10 του νηματώδους σκώληκα C. elegans, μετά από μελέτες στις οποίες απώλεια του συγκεκριμένου γονιδίου από μεταλλαγή είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη συστροφή του σώματος και τη γέννηση ελαττωμένου αριθμού αυγών, συμπεριφορές που αναστέλλονται παρουσία της σεροτονίνης. Στις ίδιες μελέτες φάνηκε ότι η υπερέκφραση της EGL-10 πρωτεΐνης είγε ίδιο αποτέλεσμα με αυτό της απουσίας έκφρασης της Goa υπομονάδας. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η EGL-10 αναστέλλει τη σηματοδότηση της σεροτονίνης μέσω παρεμπόδισης της ενεργοποίησης της Goa (Koelle and Horvitz, 1996). Η ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας αρχικά των EGL-10 και SST2 πρωτεϊνών αποκάλυψε μια κοινή περιοχή ~120 αμινοξέων που είχε επίσης παρατηρηθεί σε πρωτεΐνες θηλαστικών με άγνωστες ως τότε βιοχημικές λειτουργίες. Μερικά παραδείγματα αυτών των πρωτεϊνών είναι η πρωτεΐνη G0S8 (αργότερα γνωστή ως RGS2) που αρχικά βρέθηκε ότι έχει σχέση με την ενεργοποίηση των T κυττάρων, η πρωτεΐνη GAIP (G alpha interacting protein ή αργότερα γνωστή ως RGS19) που δεσμεύει την ενεργοποιημένη Gia<sub>3</sub> και η πρωτεΐνη RGS7 που αναγνωρίσθηκε ως η ομόλογη της EGL-10 (Wu et al., 1995, De Vries et al., 1995, Koelle and Horvitz, 1996). Η επιβεβαίωση της σύνδεσης των δυο αυτών ομάδων πρωτεϊνών έγινε με πειράματα που έδειξαν ότι η έκφραση της RGS2 στη ζύμη ανέστειλε πλήρως τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που επάγεται από τη φερομόνη και οδήγησε στην ιδέα ότι η ομοιότητα στην αλληλουχία της RGS2 και των SST2 και EGL-10 υποδεικνύει κοινή δράση στην αναστολή της σηματοδότησης των GPCRs (Siderovski et al., 1996, Druey et al., 1996).

Η περιοχή αυτή των ~120 αμινοξέων ονομάστηκε "RGS domain" (περιοχή RGS) ή "RGS-Box" (RGS κουτί) (Σχήμα 5) και αποτελεί πλέον το χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας νέας οικογένειας πρωτεϊνών, της οικογένειας των RGS πρωτεϊνών. Ο πρωταρχικός ρόλος των RGS πρωτεϊνών είναι να αλληλεπιδρούν απευθείας με την ενεργοποιημένη GaGTP των G πρωτεϊνών μέσω του RGS box και να επιταχύνουν σημαντικά το ρυθμό υδρόλυσης του GTP (GTPase activating proteins, GAP ενεργότητα), σταματώντας τη μεταφορά του ερεθίσματος από τους υποδοχείς στους τελεστές και μεταβάλλοντας έτσι την αποτελεσματικότητα και την κινητική μετάδοσης της πληροφορίας των GPCR υποδοχέων (Berman et al., 1996β, Watson et al., 1996).



Σχήμα 5. Διάγραμμα-κορδέλα της τριτοταγούς δομής της περιοχής Box της RGS4. Η περιοχή box αποτελείται από 9 έλικες που δημιουργούν δυο υποπεριοχές: η τελική υποπεριοχή αποτελείται από τις έλικες α1-3, 8 και 9 και η υποπεριοχή σχήματος δέσμης από τις έλικες α4-7. Τα τέσσερα διαφορετικά χρώματα απεικονίζουν τέσσερα κύρια τμήματα του RGS-Box (Tesmer et al., 1997).

#### Ταξινόμηση των RGS πρωτεϊνών

Σύγκριση των δομικών χαρακτηριστικών των RGS πρωτεϊνών αποδεικνύει ότι όλες οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν την συντηρημένη περιοχή RGS-Box μέσω της οποίας προσδένονται απευθείας στις ενεργοποιημένες Ga υπομονάδες, διαφέρουν όμως στα υπόλοιπα δομικά χαρακτηριστικά τους. Έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη περισσότερων από 30 πρωτεϊνών οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια αυτή και φέρουν την ακολουθία του RGS Box ή την περιοχή RGS-like. Με βάση τις ομοιότητες αυτές στην αμινοξική ακολουθία του RGS Box, αλλά και των υπόλοιπων δομικών στοιχείων και των ρυθμιστικών ρόλων των πρωτεϊνών αυτών, οι RGS πρωτεΐνες των θηλαστικών ταξινομήθηκαν σε 9 υποοικογένειες (Jean-Baptiste et al., 2006), τις εξής (Σχήμα 6):

<u>A/RZ</u>. Περιλαμβάνει την RGSZ2 ή αλλιώς RGS17 (κύριο μέλος), την GAIP ή αλλιώς RGS19, την RGSZ1 ή αλλιώς RGS20 και την RET-RGS1 που εντοπίζεται μόνο στον αμφιβληστροειδή. Εκτός από την περιοχή RGS, όλες οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής περιλαμβάνουν μια αμινοτελική περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης, που πιθανόν εμπλέκεται στη στόχευση των πρωτεϊνών αυτών στη μεμβράνη και σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Jones, 2004). Η RGSZ1 είναι μια GAP εξειδικευμένη για τις Gza πρωτεΐνες, η RGSZ2 έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τη σηματοδότηση των Gi/oa, Gza και Gqa, ενώ οι RET-RGS1 και GAIP είναι σχεδόν αποκλειστικές GAPs για τις Gia.

<u>B/R4</u>. Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει μια σειρά μικρών πρωτεϊνών, όπως η RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16, RGS18 και RGS21, και θεωρείται η μεγαλύτερη υποοικογένεια των RGS πρωτεϊνών. Με εξαίρεση την RGS3, η οποία διαθέτει ένα αμινοτελικό άκρο περίπου 300 αμινοξέων, η δομή τους αποτελείται από μια μικρή αμινοτελική ακολουθία και μια μικρότερη καρβοξυτελική περιοχή. Οι πρωτεΐνες RGS4, 5 και 16 περιέχουν επίσης μια υψηλώς συντηρημένη ομάδα από βασικά κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο τους γνωστή ως αμφιπαθική έλικα, καθώς και συντηρημένα αμινοξέα κυστεΐνης που θεωρούνται ότι παλμιτυλιώνονται και ενέχονται στην αγκυροβόληση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Η RGS21 είναι η πιο μικρή RGS πρωτεΐνη που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα και αντιπροσωπεύει την πιο βασική RGS πρωτεΐνη. Τα περισσότερα μέλη της υποοικογένειας B/R4 έχει δειχθεί σε *in vitro* 

πειράματα ότι λειτουργούν ως GAPs για τις Gqa και Gi/oa πρωτεΐνες χωρίς να παρουσιάζουν συγκεκριμένη εξειδίκευση στην πρόσδεση με συγκεκριμένους υποτύπους των Ga υπομονάδων, όμως οι ίδιες RGS πρωτεΐνες παρουσιάζουν πιο εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με τις Ga υπομονάδες *in vivo* (Xu et al., 1999, Sierra et al., 2000, Abramow-Newerly et al., 2006).



Σχήμα 6. Πίνακας των υποοικογενειών και κυριότερα μέλη των RGS πρωτεϊνών. Σε μπλε κουτί φαίνεται η RGS περιοχή (RGS Box), ενώ στα κουτιά με άλλα χρώματα φαίνονται τα επιπλέον δομικά μοτίβα των RGS πρωτεϊνών. Στο κίτρινο πλαίσιο υπερτονίζεται η B/R4 υποοικογένεια στην οποία ανήκει η RGS4 και άλλες απλές, μικρές RGS πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν (με εξαίρεση την RGS3) μια αμφιπαθική έλικα στο αμινοτελικό άκρο τους (Bansal et al., 2007).

#### Η RGS4 πρωτεΐνη

Η RGS4 πρωτεΐνη ανήκει στην υποοικογένεια B/R4, η οποία πήρε το όνομά της από αυτήν την πρωτεΐνη. Η RGS4 εμφανίζει ενεργότητα GAP για τις Gia και Gqa και, όπως τα περισσότερα μέλη της υποοικογένειας B/R4, είναι μια πρωτεΐνη με λίγα δομικά στοιχεία, πέραν της RGS περιοχής. Η RGS4 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, αλλά και στην καρδιά και στους πνεύμονες (Gold et al., 1997, Moratz et al., 2004), ενώ έχουν βρεθεί 5 διαφορετικές ισομορφές της στον εγκέφαλο του ανθρώπου (Ding et al., 2007). Η RGS4 διαθέτει μια αμινοτελική αμφιπαθική έλικα (Σχήμα 7) σημαντική για τον εντοπισμό της στη μεμβράνη και τις αλληλεπιδράσεις της με τους υποδοχείς (Zeng et al., 1998). Είναι ενδιαφέρον ότι η RGS4, μπορεί να παλμιτυλιώνεται σε κυστεΐνες του αμινοτελικού της άκρου, αλλά αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση δεν απαιτείται για την μετατόπισή της από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη, όπου δρα στη σηματοδότηση των υποδοχέων. Αντίθετα, ολόκληρο το αμινοτελικό άκρο της φαίνεται να είναι απαραίτητο για τη μετατόπισή της στην κυτταρική μεμβράνη (Srinivasa et al., 1998).



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών της RGS4 πρωτεΐνης. Με κόκκινο απεικονίζεται το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει μια αμφιπαθική α-έλικα, ενώ δεικνύονται και οι δυο κυστεΐνες που παλμιτυλιώνονται (Cys2 και Cys12, κίτρινο). Με μπλε απεικονίζεται η συντηρημένη RGS περιοχή ενώ με πράσινο το μικρό καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Η δομή του συμπλόκου RGS4-Gia υπομονάδας από μελέτες με περίθλαση ακτίνων X (Tesmer et al., 1997), έδωσε στοιχεία για τον μοριακό μηχανισμό της επιτάχυνσης της ενεργότητας GTPάσης για όλες τις RGS πρωτεΐνες (Σχήμα 8). Όπως δείχθηκε από τη μελέτη αυτή, το RGS4-Box (4Box) έρχεται σε επαφή με τις τρεις περιοχές-διακόπτες (switch regions) της Ga υπομονάδας και σταθεροποιεί τη στερεοδιαμόρφωση της Ga υπομονάδας στη μεταβατική κατάσταση μεταξύ της ενεργής GaGTP και της ανενεργής GaGDP διαμόρφωσης (Berman et al., 1996α).



Σχήμα 8: Σύμπλοκο RGS4-Gia<sub>1</sub>. (A) Το RGS-box αποτελείται από τέσσερα τμήματα που ορίζονται από τα χρώματα μωβ, κίτρινο, πράσινο και μπλε. Η α-έλικα της Gia απεικονίζεται με ανοιχτό γκρι. Οι τρεις περιοχές-διακόπτες (switch regions) της Gia<sub>1</sub> ορίζονται με κόκκινο χρώμα και δεικνύονται με βέλη. (B) Από αυτήν την άποψη του συμπλόκου φαίνεται το GDP-Mg<sup>2+</sup> που είναι δεσμευμένο στην ενεργή θέση της Gia<sub>1</sub> (μοντέλο με ράβδους και σφαίρες) (Tesmer et al., 1997).

Ο καθορισμός της κρυσταλλικής δομής της RGS4 σε σύμπλοκο με το Gia<sub>1</sub>-GDP-AlF<sub>4</sub><sup>-1</sup> (μια απομίμηση της Gα-GTP που παραμένει σταθερή και προσομοιάζει τη μεταβατική κατάσταση της υδρόλυσης, βλ. Σχήμα 9) αποκάλυψε ότι το RGS-Box (4Box) σχηματίζει μια δέσμη από εννιά α-έλικες (Σχήματα 5, 8) που έρχονται σε επαφή με την Gia<sub>1</sub> σε τρεις διαφορετικές θέσεις. Δυο κατάλοιπα στην επιφάνεια της Gia<sub>1</sub> (Thr182 και Gly183) φαίνονται να παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις υψηλής συγγένειας μεταξύ της Gα και της RGS, παρόλο που και άλλα κατάλοιπα είναι επίσης σημαντικά. Η θρεονίνη στη θέση 182 της Gia<sub>1</sub> είναι συντηρημένη ανάμεσα στα μέλη των οικογενειών Gia και Gqa, αλλά όχι στις Gsa και G<sub>12</sub>α και αυτό εξηγεί την προτίμηση των RGS πρωτεϊνών για δέσμευση τους στις Gi ή Gq (Tesmer et al., 1997). Η GAP δράση των RGS πρωτεϊνών έχει δειχθεί ότι είναι ευαίσθητη σε μια ευρεία ποικιλία παραγόντων, π.χ. κατιόντα  $K^+$  ή  $Na^+$  ή  $Mg^{+2}$  (Wang et al., 1997) και φωσφολιπίδια όπως η 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη (PIP<sub>3</sub>) και η φωσφατιδιλοσερίνη (Ishii et al., 2002, Tu et al., 2001).



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση της GAP δράσης των RGS πρωτεϊνών και του ρόλου των ιόντων AIF<sup>4</sup>. Οι ενεργές GaGTP υπομονάδες (κόκκινο), αφού δράσουν στους τελεστές, ασκούν τη δράση GTPάσης που διαθέτουν στο προσδεδεμένο GTP. Στη μεταβατική κατάσταση αυτής της κατάλυσης (πορτοκαλί), οι Ga υπομονάδες έχουν προσδεδεμένο το GDP και μια πυροφωσφορική ρίζα Pi, και μπορούν εύκολα να μεταβούν ξανά στην ενεργή διαμόρφωση (GaGTP) χωρίς να απενεργοποιηθούν. Μια RGS πρωτεΐνη προσδένεται στη μεταβατική κατάσταση των Ga υπομονάδων και τη σταθεροποιεί, ωθώντας με αυτόν τον τρόπο την αντίδραση κατάλυσης του GTP προς τα δεξιά, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πυροφωσφορικής ρίζας Pi και τη μετάβαση στην ανενεργή διαμόρφωση GaGDP (πράσινο). Τα ιόντα AIF<sup>4</sup> μαζί με ιόντα Mg<sup>+2</sup> (παράγοντας AMF) αντικαθιστούν το πυροφωσφορικό οξύ στη μεταβατική κατάσταση των Ga υπομονάδων και ωθούν την ανενεργή GaGDP υπομονάδα σε μια τεχνητά πολύ σταθερή μεταβατική διαμόρφωση. Σε αυτή τη διαμόρφωση της Ga υπομονάδας μπορεί πολύ εύκολα να προσδεθεί μια RGS πρωτεΐνη.

<u>C/R7</u>. Περιλαμβάνει RGS πρωτεΐνες όπως είναι οι RGS6, RGS7 (κύριο μέλος), RGS9 και RGS11. Όλα τα μέλη διαθέτουν μια Disheveled/EGL-10/Pleckstrin (DEP) αμινοτελική περιοχή που εμπλέκεται στην αγκυροβόληση των RGS στη μεμβράνη και την στόχευσή τους σε συγκεκριμένους GPCRs. Οι RGS αυτές διαθέτουν επίσης μια Gγ protein-like (GGL) περιοχή που αλληλεπιδρά με τις Gβ<sub>5</sub> υπομονάδες, ενδεχομένως για να τις σταθεροποιήσει (Chen et al., 2003). Οι R7/RGS λειτουργούν ως GAPs για τις Gia υπομονάδες.

<u>D/R12</u>. Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει μόνο τρία μέλη, την RGS10, την RGS12 (κύριο μέλος) και την RGS14, οι οποίες λειτουργούν ως GAP για τις Gia πρωτεΐνες. Η RGS10 είναι μια μικρή πρωτεΐνη 173 αμινοξέων διαθέτει ένα πολύ μικρό αμινοτελικό άκρο εκτός από την RGS περιοχή, και η δομή της προσομοιάζει αυτή των μελών της B/R4 υποοικογένειας. Οι RGS12 και RGS14 πρωτεΐνες όμως, περιλαμβάνουν επίσης λειτουργικές περιοχές όπως είναι η Ras-binding domain (RBD), το Gi/oα-Loco (GoLoco) μοτίβο, η phospotyrosine-binding (PTB) περιοχή και η PDZ περιοχή (Snow et al., 1997).

<u>E/RA</u>. Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Axin και Conductin, ενώ οι πρωτεΐνες Axin2 και Axil είναι οι ομόλογες ισομορφές της conductin για τον άνθρωπο και τον αρουραίο αντίστοιχα. Και οι δυο πρωτεΐνες διαθέτουν μια RGS περιοχή, δεν παρουσιάζουν όμως GAP ενεργότητα ούτε ρυθμίζουν αρνητικά τη σηματοδότηση των G πρωτεΐνών, παρόλο που η Axin αλληλεπιδρά απευθείας με την Gsa υπομονάδα. Οι RGS πρωτεΐνες αυτές είναι κύριοι ρυθμιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-Catenin (Behrens et al., 1998).

<u>F/GEF</u>. Αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, τις p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF και Leukemia-Associated RhoGEF ή αλλιώς LARG, γνωστές ως Ras homology (Rho)specific Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF), οι οποίες ενεργοποιούν τις Rho πρωτεΐνες (Snyder et al., 2002). Η p115-RhoGEF ταυτοποιήθηκε πρώτη και περιλαμβάνει εκτός από την RGS περιοχή, μια Dbl-homology (DH) και μια pleckstrinhomology (PH) περιοχή. Οι PDZ-RhoGEF και LARG περιέχουν επιπλέον μια αμινοτελική PDZ περιοχή.

<u>G/GRK</u>. Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει κινάσες σερίνης/θρεονίνης που διαθέτουν μια RGS περιοχή, μια κεντρική καταλυτική περιοχή κινάσης και ένα καρβοξυτελικό άκρο που φέρει, είτε μοτίβα μεμβρανικής αγκυροβόλησης και μεταφοράς, είτε περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη (Siderovski et al., 1996). Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί επτά cDNAs θηλαστικών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες GRK, οι οποίες είναι οι GRK1, GRK2, GRK3, GRK4, GRK5, GRK6 και GRK7. Οι κινάσες αυτές συγγενεύουν με αυτές της οικογένειας των PKC και PKA και εμπλέκονται στην ομόλογη απευαισθητοποίηση, εσωτερίκευση και αποικοδόμηση/ανακύκλωση των GPCRs (παράγραφος 1.4.1, γ-ii). Μελέτες έχουν δείξει ότι η GRK2 έχει ασθενή GAP ενεργότητα για την Gq/11α υπομονάδα, όμως η GAP ενεργότητα της RGS αλληλουχίας των μελών της GRK οικογένειας δεν έχει ακόμα πλήρως χαρακτηριστεί (Carman et al., 1999).

<u>H/SNX (Sortin nexin)</u>. Οι sorting nexins αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που απαριθμούν 29 μέλη και συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική κυκλοφορία των ενδοσωμικών κυστιδίων (Carlton et al., 2005). Τρεις από τις sorting nexins περιέχουν μια RGS περιοχή και αποτελούν την H/SNX υποοικογένεια των RGS πρωτεϊνών: SNX13 (RGS-PX1), SNX14 και SNX25. Η SNX13 εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική τύχη του EGF υποδοχέα, ενώ υπάρχει μια αναφορά για αυτήν την πρωτεΐνη που την δεικνύει ως την πρώτη και μοναδική RGS που εμφανίζει ενεργότητα GAP έναντι των Gsa υπομονάδων (Zheng et al., 2001).

<u>I/D-AKAP2</u>. Οι D-AKAP2 και RGS22 είναι μη τυπικές RGS πρωτεΐνες. Η D-AKAP2 (dual A kinase anchoring protein 2) ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της PKA (Wang et al., 2001). Περιλαμβάνει δυο πιθανές RGS περιοχές, όμως δεν έχει δειχθεί αλληλεπίδραση ή GAP ενεργότητα για τις G πρωτεΐνες. Η RGS22 φέρει τρεις πιθανές RGS περιοχές και βρέθηκε πρόσφατα ότι εκφράζεται αποκλειστικά στους όρχεις, ενώ φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τις Ga<sub>11</sub>, Ga<sub>12</sub>, και Ga<sub>13</sub> και λαμβάνει μέρος στη διαδικασία της σπερμιογένεσης (Hu et al., 2008).

Τα ποικίλα δομικά χαρακτηριστικά, μοναδικά για κάθε υποοικογένεια, δίνουν τη δυνατότητα στις RGS πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση των RGS, στην υποκυτταρική τους στόχευση και στη ρύθμιση των λειτουργιών τους. Οι μικρότερες RGS πρωτεΐνες (κυρίως των υποοικογενειών A/RZ και B/R4) πιστευόταν μέχρι πρόσφατα ότι παίζουν αποκλειστικά το ρόλο αρνητικών ρυθμιστών στη σηματοδότηση των G πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, συνεχώς αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα δεικνύουν ότι οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών ελέγχονται διαμέσου του σχηματισμού πρωτεϊνικών συμπλόκων, ώστε τελικά να διαμορφώνεται μια συνεργιστική δράση που δεν προάγει απαραίτητα την αναστολή

της σηματοδότησης των G πρωτεϊνών. Από την άλλη πλευρά, τα μέλη των οικογενειών που αποτελούν τις μεγαλύτερες RGS πρωτεΐνες, περιλαμβάνουν πολλές διαφορετικές δομικές περιοχές με την ικανότητα να δεσμεύουν όχι μόνο τις G πρωτεΐνες, αλλά και άλλα σηματοδοτικά μόρια. Με αυτόν τον τρόπο, οι πολύπλοκες και πολυλειτουργικές αυτές RGS πρωτεΐνες ολοκληρώνουν τη σηματοδότηση των G πρωτεϊνών, πιθανά ως νέα μόρια-τελεστές ή πρωτεΐνες-ικριώματα.

#### Ιστοειδικός εντοπισμός των RGS πρωτεϊνών

Τα mRNAs των RGS πρωτεϊνών έχουν βρεθεί σε όλους τους ιστούς και όλα τα κύτταρα με αναλύσεις *in situ* υβριδισμού και Northern. Τα mRNAs κάποιων RGS πρωτεϊνών, όπως της RGS2, RGS3, RGS10 και RGS19 εμφανίζουν ευρεία κατανομή στους ιστούς υποδηλώνοντας μια γενική λειτουργία (Chen et al., 1997, Koelle and Horvitz, 1996, De Vries et al., 1995, Moratz et al., 2004), ενώ αυτά κάποιων άλλων όπως των RGS5 (καρδιά, μύες, εγκέφαλος), RGS16 (συκώτι και υπόφυση), RET-RGS1 (αμφιβληστροειδής), RGS8 και RGSZ1 (εγκέφαλος), και RGS1 (λεμφοκύτταρα), φαίνεται να παίζουν πιο εξειδικευμένους ρόλους, αφού βρίσκονται σε συγκεκριμένους ιστούς (Chen et al., 1997, Faurobert and Hurley, 1997, Saitoh et al., 1997, Wang et al., 1998, Moratz et al., 2000, Moratz et al., 2004). Τουλάχιστον εννιά διαφορετικά RGS

# 1.4.3.1 Ιδιότητες, λειτουργικά χαρακτηριστικά και εξειδίκευση (specificity) της ρυθμιστικής δράσης των RGS πρωτεϊνών

Η ενεργοποιημένη Gα-GTP ή/και το Gβγ διμερές μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι «κυκλοφορεί» μεταξύ των GPCRs και των τελεστών (Chidiac, 1998). Ο ρόλος των RGS σε αυτό το πλαίσιο θα ήταν να «αναχαιτίζουν» τις ενεργοποιημένες G πρωτεΐνες. Το δόγμα, όμως, της μετακίνησης αυτής έχει αμφισβητηθεί (Chidiac 1998, Levitzki and Klein, 2002) και μια εναλλακτική θεωρία έχει αναπτυχθεί, η οποία αναφέρει ότι τα ερεθίσματα μεταδίδονται μέσω πολυπρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων που περιλαμβάνουν GPCRs, G πρωτεΐνες, τελεστές και πιθανώς άλλες πρωτεΐνες κυτταροπλασματικές ή μη (Rebois and Hebert, 2003, Abramow-Newerly et al., 2006). Οι

RGS πρωτεΐνες φαίνεται ότι είναι σημαντικά στοιχεία των σχηματιζόμενων σηματοδοτικών συμπλόκων των GPCRs, διότι είναι ικανές να αλληλεπιδρούν τόσο με τις Ga υπομονάδες, όσο και με τους υποδοχείς, τους τελεστές, αλλά και άλλες πρωτεΐνες, ώστε να εναρμονίζεται η σηματοδότηση των GPCRs (Σχήμα 10).

Στην αλληλεπίδραση των RGS πρωτεϊνών με άλλες πρωτεϊνες βρίσκεται και το «κλειδί» για την εξειδίκευση της δράσης των RGS πρωτεϊνών. Η εξειδίκευση αυτή μπορεί να διακριθεί σε μοριακό επίπεδο και σε επίπεδο ιστού. Κάθε ιστός εκφράζει ένα ξεχωριστό πληθυσμό RGS πρωτεϊνών με αποτέλεσμα η δράση των RGS να είναι μοναδική και ξεχωριστή για κάθε ιστό. Από την άλλη πλευρά, η κάθε RGS πρωτεΐνη στον ίδιο ιστό είναι δυνατόν να εμφανίζει ποικιλομορφία ως προς το ρυθμιστικό της ρόλο, καθώς τα διάφορα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά μπορούν να τροποποιούν τη δράση των εκάστοτε RGS πρωτεϊνών σε μοριακό επίπεδο: α) επιλεκτική αλληλεπίδραση των RGS πρωτεϊνών, β) επιλεκτική ρύθμιση της δράσης τους μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένους «ξεχωριστούς» υποδοχείς, αλλά και άλλες πρωτεΐνες, όπως προαναφέρθηκε (Neubig and Siderovski, 2002).

#### Αλληλεπίδραση RGS πρωτεϊνών με Ga υπομονάδες

Ο κύριος τρόπος δράσης των RGS πρωτεϊνών ως αρνητικοί ρυθμιστές επιτελείται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις Gα πρωτεΐνες και είναι, όπως προαναφέρθηκε, η ενεργότητα GAP (GTPase activating proteins) που διαθέτουν (Hepler, 1999). Βιοχημικές και δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότερες από τις RGS πρωτεΐνες (αλλά όχι όλες, π.χ. D-AKAP2 και τα μέλη της E/RA υποοικογένειας, σελ. 45-46) από τις RGS πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί διεγείρουν σε μεγάλο βαθμό (100-1000 φορές) την ενεργότητα GTPάσης των Gα υπομονάδων-στόχων τους (Watson et al., 1996). Οι RGS πρωτεΐνες δρουν ως GAPs για συγκεκριμένες υποοικογένειες όπως οι Gia και Gqa υπομονάδες, ενώ δεν επιδρούν ως GAPs στις Gsa, παρά το γεγονός ότι σε μερικές περιπτώσεις αλληλεπιδρούν απευθείας με αυτές (Tseng and Zhang, 1998, Ko et al., 2001, Roy et al., 2006).

Η ανακάλυψη, όμως, ότι υπάρχουν RGS πρωτεΐνες που περιέχουν πολλά διαφορετικά δομικά μοτίβα (αλληλουχίες DEP, GGL, GoLoco, PDZ, RhoGEF, GRK), οδήγησε σε μια νέα θεωρία για αυτές τις πρωτεΐνες σύμφωνα με την οποία οι RGS παίζουν και άλλους σημαντικούς ρόλους στη σηματοδότηση των υποδοχέων που ξεπερνά την GAP δράση τους (De Vries et al., 2000, Siderovski et al., 1999, Neubig and Siderovski, 2002, Jean-Baptiste et al., 2006). Έτσι, οι RGS πρωτεΐνες λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης μέσω G πρωτεϊνών διότι α) περιορίζουν το χρόνο κατά τον οποίο το GTP είναι προσδεδεμένο στην Gα υπομονάδα, επιταχύνοντας τον ρυθμό υδρόλυσής του σε GDP (GAP ενεργότητα), β) παρεμποδίζουν την απελευθέρωση του GDP και την εκ νέου δέσμευση ενός μορίου GTP στην Gα υπομονάδα (GDI ενεργότητα) γ) προσδένονται στις Gα πρωτεΐνες ή στους τελεστές και παρεμποδίζουν τη φυσική αλληλεπίδραση της Gα υπομονάδας με τους τελεστές. Με αυτόν τον τρόπο οι RGS πρωτεΐνες δρουν ως ανταγωνιστές των τελεστών, δ) αναστέλλουν τη σηματοδότηση ανεξάρτητα από την GAP ενεργότητά τους (Hepler, 1999, Watson et al., 1996, Berman et al., 1996β, Anger et al., 2004, Burchett, 2005).

Η δράση των RGS ως ανταγωνιστές των τελεστών έχει περιγραφεί εκτενώς από διάφορες μελέτες (Burchett, 2005). Ερευνητές έχουν δείξει ότι η RGS2 διαθέτει την ικανότητα να ανταγωνίζεται τον τελεστή PLCβ που ενεργοποιείται από τον M1 μουσκαρινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (M1-mAChR) και παρεμποδίζει τη σηματοδότηση του υποδοχέα (Bernstein et al., 2004). Η δράση αυτή παρατηρείται απουσία επιταχυμένης GAP ενεργότητας. Άλλες μελέτες με *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι οι RGS12 και RGS14 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μέσω των GoLoco μοτίβων τους με τις ανενεργές Gia<sub>1</sub>, Gia<sub>2</sub> και Gia<sub>3</sub> και αποτρέπουν την ανταλλαγή του GDP με το GTP κατά την ενεργοποίηση των Gα υπομονάδων (GDI ενεργότητα) (Kimple et al., 2001).

Οι RGS πρωτεΐνες είναι ικανές να επηρεάζουν και τη σηματοδότηση μέσω των Gβγ υπομονάδων, οι οποίες ως γνωστών δρουν επίσης σε διάφορους τελεστές. Το γεγονός αυτό συμβαίνει γιατί αυξάνουν το ρυθμό απενεργοποίησης της Ga υπομονάδας, και κατά συνέπεια το ρυθμό επανασχηματισμού του ετεροτριμερούς των G πρωτεϊνών, ελαττώνοντας έτσι τον πληθυσμό των Gβγ υπομονάδων που επιδρά στους διάφορους τελεστές (Yan et al., 1997). Από την άλλη πλευρά, η δέσμευση της RGS πρωτεΐνης στην Ga υπομονάδα αποκλείει τη φυσική αλληλεπίδραση με το Gβγ σύμπλοκο και υπάρχουν περιπτώσεις όπου η παρατεταμένη πρόσδεση της RGS στην Ga μετά την υδρόλυση του GTP είναι ικανή να καθυστερήσει την επανασύνδεση της Ga με την Gβγ, με αποτέλεσμα την παράταση της σηματοδότησης του Gβγ συμπλόκου (Tesmer et al., 1997).

Η σηματοδότηση των RGS πρωτεϊνών περιπλέκεται ακόμα περισσότερο, καθώς αποκαλύφθηκε ένας επιπλέον λειτουργικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών ως τελεστές των Ga πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η p115RhoGEF αλληλεπιδρά μέσω του RGS-Box της με την ενεργή Ga<sub>13</sub> και αυτό της επιτρέπει αφενός να δράσει ως GAP για αυτή την Ga υπομονάδα, αφετέρου να ενεργοποιήσει με τη σειρά της την RhoA. Οι Rho πρωτεΐνες ανήκουν στην Ras υπεροικογένεια των μικρών GTPaσών και ρυθμίζουν διάφορες μορφές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροϊνιδίων. Η ενεργοποίηση της RhoA από την p115RhoGEF έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού και στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική μορφολογία και μετανάστευση, την αγγειογένεση και την απόπτωση (Hart et al., 1998), συνδέοντας το μονοπάτι των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών με αυτό των G πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους.

#### Αλληλεπίδραση μεταξύ RGS πρωτεϊνών και GPCRs

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν την δυνατότητα λειτουργικών αλληλεπιδράσεων μελών της οικογένειας των RGS πρωτεϊνών με τους GPCR υποδοχείς, όπως οι μουσκαρινικοί, ντοπαμινεργικοί, αδρενεργικοί και οι αγγειοτενσινικοί υποδοχείς (Πίνακας 1). Η αλληλεπίδραση των RGS πρωτεϊνών με τους GPCRs έχει ως στόχο την αλλαγή της διαμόρφωσης των υποδοχέων με αποτέλεσμα την τροποποίηση της μεταγωγής του σήματος των υποδοχέων αυτών από τις RGS πρωτεΐνες (Sierra et al., 2000, Neubig and Siderovski, 2002, Abramow-Newerly et al., 2006, Neitzel and Hepler, 2006). Από την άλλη πλευρά, οι GPCRs είναι σε θέση μέσω της αλληλεπίδρασης αυτής, να επηρεάζουν την ίδια τη δράση των RGS πρωτεϊνών στις αλληλεπίδρασεις της με τις G πρωτεΐνες (Wilkie, 2000, Hollinger and Hepler, 2002, Chidiac and Roy, 2003). Πράγματι έχει βρεθεί ότι όταν μια G πρωτεΐνη ανασυσταθεί σε φωσφολιπιδικά κυστίδια μαζί με έναν GPCR, τόσο η συγγένεια συγκεκριμένων RGS πρωτεϊνών για την G πρωτεΐνη, όσο
και ο ρυθμός επιτάχυνσης της ενεργότητας GTPάσης μπορεί να αυξηθούν (Ingi et al., 1998).

Σε in vitro πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες, καθαρές RGS και Ga πρωτεΐνες φάνηκε ότι μέλη της υποοικογένειας B/R4 των RGS πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες τάξεις των Ga υπομονάδων, όπως η Gi/o ή/και Gq/11 (Neitzel and Hepler, 2006). Τα αποτελέσματα αυτά δεικνύουν ότι υπάρχει ένας βαθμός εξειδίκευσης μεταξύ των RGS και Ga πρωτεϊνών, που ορίζεται από τις επιφάνειες επαφής τους (De Vries et al., 2000, Ross and Wilkie, 2000, Hollinger and Hepler, 2002, Siderovski and Willard, 2005). Πρόσφατα όμως, πολλές μελέτες έδειξαν ότι οι RGS πρωτεΐνες της B/R4 υποοικογένειας μπορούν να «επιλέγουν» τους GPCRs που αλληλεπιδρούν με την ίδια κατηγορία Ga πρωτεϊνών, για να ρυθμίσουν ειδικά το σήμα σε ένα κυτταρικό περιβάλλον, ανάλογα με την ταυτότητα του ενεργοποιημένου υποδοχέα: προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση των RGS1, RGS2, RGS4 και RGS16 διαφοροποιείται για τους υποδοχείς mAChR, βομβεσίνης (BB-P) και γολοκυστοκινίνης (CCK-R), οι οποίοι ελέγγουν τα επίπεδα Ca<sup>+2</sup> μέσω των ίδιων G πρωτεϊνών (Gqa) και του ίδιου τελεστή PLCβ (Xu et al., 1999). Αυτή η μελέτη παρείχε τις πρώτες έμμεσες αλλά και πειστικές αποδείξεις ότι οι RGS πρωτεΐνες δημιουργούν λειτουργικά ζευγάρια με τους GPCRs σε κύτταρα για να αναστείλουν διαφορικά τη σηματοδότηση των G πρωτεϊνών.

Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα ήταν μελέτη που έδειξε ότι οι RGS4, RGS10 και RGSZ1 πρωτεΐνες ρυθμίζουν επιλεκτικά τη σηματοδότηση του υποδοχέα 5HT1A της σεροτονίνης μέσω των Gia υπομονάδων, έναντι της σηματοδότησης των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων (D2-R) που συζεύγνυνται με τις ίδιες G πρωτεΐνες, σε κύτταρα CHO-K1 (κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ) (Ghavami et al., 2004). Άλλες μελέτες με τη χρήση knock-down στρατηγικών σε κύτταρα A-10 (αορτικά λεία μυϊκά) έδειξαν ότι οι RGS3 και RGS5 ρυθμίζουν επιλεκτικά τη σηματοδότηση των M3-mAChR και AT<sub>1A</sub>-R (αγγειοτενσινικός) αντίστοιχα (Wang et al., 2002). Ακόλουθες μελέτες με πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού έδειξαν ότι η RGS2 στρατολογείται εξειδικευμένα στη μεμβράνη των HEK293 κυττάρων μετά από την συνέκφραση των β2-AR και AT<sub>1A</sub>-R υποδοχέων ή των αντίστοιχων G πρωτεϊνών τους, ενώ η RGS4 στρατολογείται στη μεμβράνη μετά από την συνέκφραση του M2-mAChR (Roy et al., 2003).

	/	° /	<i>4 1</i>	0	-7-
- Λειτουονικές αλληλεπιδράσεις	ποωτεινων	UE UTODOVELC TOU	συ(ευγνυνται	. ЦЕ ( i	ποωτεινες
i iou oppinion in interesting and one			00,00,000	pro 0	

RGS πρωτεΐνη	Υποδοχέας	Κύτταρα μελέτης	Τρόπος αλληλεπίδρασης	Βιβλιογραφία
RGS1	M3-mAChR	Παγκρεατικά κυψελιδικά	Έμμεσος*	Xu et al., 1999
RGS2	M3-mAChR, CCK-R β2-AR, AT <sub>1A</sub> -R	Παγκρεατικά κυψελιδικά ΗΕΚ293	Έμμεσος Υποκυτταρικός συνεντοπισμός	Xu et al., 1999 Roy et al., 2003
	M1-mAChR	CHO-K1	In vitro	Bernstein et al., 2004
	α1-AR	CHO-K1, απομονωμένες πρωτεΐνες	In vitro	Hague et al., 2005
	β2-AR	ΗΕΚ293, απομονωμένες πρωτεΐνες	In vitro, έμμεσος	Roy et al., 2006
	CCK2-R	cos-7	Συν-ανοσοκατακρήμνιση, έμμεσος	Langer et al., 2009
RGS3	M3-mAChR	A-10	Έμμεσος	Wang et al., 2002
RGS4	M3-mAChR > BB-R >> CCK-R	Παγκρεατικά κυψελιδικά	Έμμεσος	Xu et al., 1999
	M2-mAChR	HEK293	Υποκυτ. συνεντοπισμός	Roy et al., 2003
	5-HT1A	CHO-K1	Έμμεσος	Ghavami et al., 2004
	μ-OR	Συναπτοσωμικές μεμβράνες PAG	Συν-ανοσοκατακρήμνιση	Garzon et al., 2005β
	mGluR5	Ραβδωτό σώμα	Συν-ανοσοκατακρήμνιση	Schwendt and McGinty, 2007
RGS5	AT <sub>1A</sub> -R	A-10	Έμμεσος	Wang et al., 2002
RGS8	M1-mAChR	ΗΕΚ293, απομονωμένες πρωτεΐνες	In vitro, υποκυτ. συνεντοπισμός	Itoh et al., 2006
RGS9-2	D2-R	CHO. PC-12	Υποκυτ. συνεντοπισμός	Kovoor et al., 2005
	μ-OR	PAG εγκεφάλου ποντικού	Συν-ανοσοκατακρήμνιση	Garzon et al., $2005\beta$
	μ-OR	PC12	Συν-ανοσοκατακρήμνιση, υποκυτ.συνεντοπισμός	Psifogeorgou et al., 2007
RGS10	5-HT1A	CHO-K1	Έμμεσος	Ghavami et al., 2004
RGS12	CXCR2	Απομονωμένες πρωτεΐνες	In vitro	Snow et al., 1998
RGS14	μ-OR	Συναπτοσωμικές μεμβράνες PAG	Συν-ανοσοκατακρήμνιση	Garzon et al., 2005β
RGS16	M3-mAChR >> CCK-R	Παγκρεατικά κυψελιδικά	Έμμεσος	Xu et al., 1999
RGS17 (RGSZ2)	μ-OR	Συναπτοσωμικές μεμβράνες PAG	Συν-ανοσοκατακρήμνιση	Garzon et al., 2005β
RGS20 (RGSZ1)	μ-OR	Συναπτοσωμικές μεμβράνες PAG	Συν-ανοσοκατακρήμνιση	Garzon et al., 2005β
	5-HT1A	CHO-K1	Έμμεσος	Ghavami et al., 2004
LARG	PAR	HEK293T, PC-3	si RNAs	Wang et al., 2004a
PDZ- RhoGEF	LPA-R	НЕК293Т, РС-3	si RNAs	Wang et al., 2004α

Πίνακας 1: Αλληλεπιδράσεις των RGS πρωτεϊνών με τους GPCR υποδοχείς. \*Εμμεσος τρόπος αλληλεπίδρασης: η αλληλεπίδραση έχει ανιχνευθεί έμμεσα με λειτουργικές μεθόδους.

Οι Bernstein et al. έδειξαν για πρώτη φορά ότι η RGS2 αλληλεπιδρά με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του M1-mAChR και σχηματίζεται ένα τριμερές σύμπλοκο μεταξύ των M1-mAChR – Gqa – RGS2 (Bernstein et al., 2004) (πίνακας 1). Παρόμοιες μελέτες στον α1-AR έδειξαν επίσης ότι η RGS2 αλληλεπιδρά με τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys219, Ser220 και Arg238 της τρίτης ενδοκυτταρική θηλιάς του α1-AR, και αναστέλλει τη σηματοδότηση του υποδοχέα (Hague et al., 2005). In vitro πειράματα έδειξαν, επίσης, ότι η RGS2 αλληλεπιδρά με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του β2-AR (Roy et al., 2006), ενώ με τη χρήση της τεχνικής BRET δείχθηκε η άμεση αλληλεπίδραση της RGS8 με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του M1-mAChR, σε διαμολυσμένα HEK293 κύτταρα (Itoh et al., 2006). Η RGS4 δείχθηκε σε πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης ότι μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα με τον mGluR5 υποδοχέα, καθώς επίσης και με τις Gq/11α και PLCβ<sub>1</sub>, σε κύτταρα του ραβδωτού σώματος αρουραίου (Schwendt and McGinty, 2007), ενώ συν-ανοσοκατακρημνίζεται και με τον μ-OR (Garzon et al., 2005 β). Η RGS2 αλληλεπιδρά σε πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης με το καρβοξυτελικό άκρο του CCK2-R και ρυθμίζει αρνητικά τη συσσώρευση της φωσφορικής ινοσιτόλης που προκαλείται από την ενεργοποίηση του υποδογέα σε κύτταρα COS-7 (Langer et al., 2009).

Όσον αφορά πρωτεΐνες από την υποοικογένεια C/R7 των RGS πρωτεϊνών, βρέθηκε ότι η RGS9-2 συνεντοπίζεται με τον D2 ντοπαμινεργικό υποδοχέα (D2-R) σε κύτταρα CHO και PC-12 (φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου). Τελικό αποτέλεσμα είναι η ειδική επιτάχυνση του τερματισμού της σηματοδότησης του D2-R (Kovoor et al., 2005). Η RGS9-2 βρέθηκε, επίσης, να αλληλεπιδρά με τον μ-OR σε μεμβράνες από PAG του εγκεφάλου ποντικού (Garzon et al., 2005β και γ), αν και δεν αποδείχτηκε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του ελέγχου της δράσης των Gα υπομονάδων από τον υποδοχέα στην RGS9-2, σε ποντίκια που έχουν αναπτύξει ανοχή στη χορήγηση μορφίνης. Νεώτερες μελέτες έδειξαν ότι η RGS9-2 συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τον μ-OR σε κύτταρα PC12 και ότι αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύεται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα με τη μορφίνη (Psifogeorgou et al., 2007). Ο λειτουργικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης δείχθηκε ότι είναι η καθυστέρηση της εσωτερίκευσης του ενεργοποιημένου μ-OR, καθώς και η αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα στις MAP κινάσες. Η RGS12, που ανήκει όπως προαναφέρθηκε στην D/R12 υποοικογένεια, εμφανίζεται με πολλές μορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος, κάποιες από τις οποίες περιλαμβάνουν ένα PDZ μοτίβο. Η πρώτη αναφερθείσα απευθείας αλληλεπίδραση μιας RGS με έναν GPCR συμπεριλάμβανε την RGS12 και τον υποδοχέα B της ιντερλευκίνης 8 (IL-8, υποδοχέας CXCR2) (Snow et al., 1998), όπου η πρόσδεση γίνεται μέσω της PDZ περιοχής της RGS12 και της συμπληρωματικής περιοχής στο καρβοζυτελικό άκρο του υποδοχέα, αν και η φυσιολογική σημασία αυτής της πρόσδεσης δεν είναι γνωστή. Από την άλλη πλευρά, η RGS14 έχει βρεθεί να συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τον μ-OR σε ομογενοποιήματα της PAG εγκεφάλου ποντικού (Garzon et al., 2005β). Άλλες μελέτες σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη έδειξαν ότι οι υποδοχείς της θρομβίνης και του λυσοφωσφατιδικού οξέος (PAR και LPA-R αντίστοιχα) χρησιμοποιούν ξεχωριστές RhoGEF για την εξειδικευμένη ρύθμιση των G<sub>12/13</sub>α υπομονάδων και την σηματοδότησή τους, δεικνύοντας λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των PAR, LPA-R και των LARG, PDZ-RhoGEF αντίστοιχα (Wang et al., 2004α).

Τέλος, οι RGSZ1 και RGSZ2 πρωτεΐνες που ανήκουν όπως έχει προαναφερθεί στην υποοικογένεια των A/RZ RGS πρωτεϊνών, δείχθηκε ότι αλληλεπιδρούν με τον μ-OR, σε πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης σε μεμβράνες από την περιοχή της περιϋδραγωγού φαιάς ουσίας ποντικού (Garzon et al., 2005β). Η αλληλεπίδραση αυτή αυξάνεται όταν χορηγηθεί μορφίνη απευθείας στον εγκέφαλο του ποντικού, ενώ φαίνεται να λειτουργούν ως ανταγωνιστές των τελεστών γιατί απομονώνουν τις Gz υπομονάδες. Με αυτόν τον τρόπο οι RGSZ1 και RGSZ2 επηρεάζουν τη σηματοδότηση του μ-OR, καθώς μειώνουν την αναλγητική δράση αγωνιστών όπως η μορφίνη και το DAMGO.

# <u>Αλληλουχίες αμινοξέων (μοτίβα) που βοηθούν στην εξειδίκευση πρόσδεσης με τους</u> <u>υποδοχείς</u>

Η εξειδίκευση στην πρόσδεση και ρύθμιση των RGS με τους GPCRs φαίνεται ότι οφείλεται στα ιδιαίτερα μοτίβα που οι RGS πρωτεΐνες διαθέτουν. Οι RGS πρωτεΐνες της B/R4 υποοικογένειας που δεν έχουν συγκεκριμένα μοτίβα (με εξαίρεση την RGS3), οφείλουν μέρος της ειδικότητάς τους σε απλές δομές όπως για παράδειγμα το αμινοτελικό τους άκρο. Πράγματι, το αμινοτελικό άκρο των B/R4 RGS πρωτεϊνών έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης των RGS πρωτεϊνών με τον

υποδοχέα. Η RGS4 αγρίου τύπου είναι πιο αποτελεσματική στο να αναστέλλει τη σηματοδότηση των ιόντων  $Ca^{+2}$ , σε σύγκριση με το απομονωμένο RGS-Box (Zeng et al., 1998). Επιπλέον, το απομονωμένο αμινοτελικό άκρο της RGS8 είναι ικανό να ρυθμίζει τη ροή των ιόντων K<sup>+</sup> στα κανάλια GIRK που προκαλείται από τη νορεπινεφρίνη, υποδηλώνοντας ότι αυτή η περιοχή της RGS8 προάγει τη σύζευξη των υποδοχέων με τις G πρωτεΐνες (Jeong and Ikeda, 2001). Στην περίπτωση της RGS2 πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τον M1-mAChR και τον α1-AR, η πρόσδεση μεσολαβείται από το αμινοτελικό άκρο της RSG2, ενώ η πρόσδεση στην Gqa γίνεται μέσω της RGS περιοχής (RGS-Box) (Bernstein et al., 2004, Hague et al., 2005). Από αυτά τα δεδομένα φαίνεται ότι το αμινοτελικό άκρο των RGS πρωτεϊνών είναι απαραίτητο δομικό χαρακτηριστικό, διότι δίνει το πλεονέκτημα στις RGS πρωτεΐνες να είναι ταυτόχρονα προσδεδεμένες με τις Ga υπομονάδες και τους GPCRs σχηματίζοντας πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Neitzel and Hepler, 2006). Από την άλλη πλευρά, οι RGS3, RGS12, PDZ-RhoGEF και LARG περιέχουν ένα PDZ μοτίβο, το οποίο ευθύνεται για τις ειδικές αλληλεπιδράσεις αυτών των πρωτεϊνών με τους υποδοχείς ή άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν τη συμπληρωματική αμινοξική αλληλουχία (Burchett, 2000, Neitzel and Hepler, 2006). Άλλες RGS πρωτεΐνες όπως η RGS9-2, διαθέτουν την περιοχή DEP, η οποία ευθύνεται για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των RGS πρωτεϊνών και την αλληλεπίδρασή τους με τους GPCRs. Μελέτες έχουν δείξει ότι η DEP περιοχή της RGS9-2 πρωτεΐνης εμπλέκεται στη εξειδικευμένη στόχευση αυτής της RGS πρωτεΐνης και στο συνεντοπισμό της με τον υποδοχέα D2-R (Kovoor et al., 2005). Επιπλέον, από τις ίδιες μελέτες φάνηκε ότι στην DEP περιοχή οφείλεται η εξειδίκευση της δράσης της RGS9-2 στον υποδοχέα D2-R, καθώς ένα μετάλλαγμα της RGS9-2 που του λείπει η DEP περιοχή δεν μπορεί να επιταχύνει εξειδικευμένα τον τερματισμό της σηματοδότησης του D2-R έναντι του υποδογέα M2mAChR.

#### Αλληλεπίδραση RGS πρωτεϊνών με μόρια-τελεστές

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι RGS πρωτεΐνες λειτουργούν ως ανταγωνιστές των τελεστών, προσδενόμενες είτε στους τελεστές είτε στις Ga και αποτρέπουν τη φυσική αλληλεπίδραση αυτών, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη σηματοδότηση. Παρόλα αυτά, η αλληλεπίδραση μιας RGS με έναν τελεστή δεν έχει απαραίτητα αρνητική επίδραση στη σηματοδότηση. Είναι δυνατόν η αλληλεπίδραση RGS-τελεστή να ενισχύει τη σηματοδότηση των GPCRs, με το να δημιουργεί για παράδειγμα ένα σύμπλοκο μεταξύ της ενεργοποιημένης G πρωτεΐνης και του τελεστή, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη γρηγορότερη μετάδοση του σήματος.

Αδενυλική κυκλάση (AC): Πολλές RGS πρωτεΐνες αναστέλλουν τη δράση της Gia στην απενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης ως αποτέλεσμα της GAP ενεργότητάς τους (Berman and Gilman, 1998). Επιπρόσθετα όμως, ένας αριθμός RGS πρωτεϊνών όπως οι RGS2, 3, 4, 10, 13 αναστέλλουν την ενεργότητα της αδενυλικής κυκλάσης από τις Gsa υπομονάδες (Roy et al., 2003, Chatterjee et al., 1997, Salim et al., 2003, Ghavami et al., 2004) και αυτό δεν οφείλεται στην GAP ενεργότητα των RGS πρωτεϊνών, διότι 1) καμία από αυτές τις RGS πρωτεΐνες δεν μπορεί να αυξάνει το ρυθμό υδρόλυσης του GTP στις Gsa (Chidiac and Roy, 2003), 2) οι RGS πρωτεΐνες μπορούν και αναστέλλουν την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, που επάγεται από την προσθήκη φορσκολίνης, απουσία ενεργοποιημένης Gsa (Sinnarajah et al., 2001), 3) η αναστολή συμβαίνει όταν η Ga υπομονάδα είναι προσδεδεμένη με το μη υδρολυόμενο ανάλογο GTPγS (Sinnarajah et al., 2001, Salim et al., 2003). Σύμφωνα με τα τρία αυτά δεδομένα, η αναστολή της ενεργότητας της αδενυλικής κυκλάσης από τις RGS πρωτεΐνες μπορεί να οφείλεται σε απευθείας φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των RGS πρωτεϊνών και της Gsa ή μεταξύ των RGS πρωτεϊνών και της αδενυλικής κυκλάσης ή ακόμα και παράλληλη αλληλεπίδραση των RGS και με τις δυο πρωτεΐνες. Πράγματι, βρέθηκε ότι η RGS2 μειώνει την παραγωγή του cAMP απουσία της Gsa, που επάγεται από φορσκολίνη σε μεμβράνες από κύτταρα εντόμων Sf9 που εκφράζουν τις ισομορφές ΙΙΙ, V και VI της αδενυλικής κυκλάσης (Sinnarajah et al., 2001). Αυτά τα πειράματα υποδηλώνουν εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ της RGS2 και συγκεκριμένων ισομορφών της αδενυλικής κυκλάσης. Σε νεώτερες μελέτες βρέθηκε επίσης ότι η RGS2 αλληλεπιδρά απευθείας με την C1 κυτταροπλασματική περιοχή της αδενυλικής κυκλάσης V σε εκχυλίσματα κυττάρων (Salim et al., 2003). Η μελέτη αυτή δεικνύει επίσης ότι, ενώ η RGS περιοχή είναι περιττή για την αλληλεπίδραση μεταξύ της RGS2 και της αδενυλικής κυκλάσης, το αμινοτελικό άκρο (19 αμινοξέα) της RGS2 είναι απαραίτητο για την πρόσδεση της RGS2 και την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, η οποία ενεργοποιείται από τον υποδοχέα β<sub>2</sub>-AR και τις Gsa υπομονάδες. Αντίστοιχες μελέτες με πειράματα *in vitro* πρόσδεσης και με τη μέθοδο BRET σε ζωντανά κύτταρα HEK293, έδειξαν ότι η έκφραση και μόνο της αδενυλικής κυκλάσης στρατολογεί την RGS2 στην πλασματική μεμβράνη και ότι η RGS2 προσδένεται στις ισομορφές ΙΙ και VI της αδενυλικής κυκλάσης (Roy et al., 2006). Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε στις ίδιες μελέτες με πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης. Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι η RGS2 ενδεχομένως σχηματίζει ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο με τις Gsa υπομονάδες και την αδενυλική κυκλάση για να ρυθμίσει αρνητικά τη σηματοδότηση που επάγεται από τις Gsa πρωτεΐνες, δεικνύοντας έτσι τη λειτουργική σημασία της RGS2.



Σχήμα 10. Διαγραμματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των RGS πρωτεϊνών με διάφορες πρωτεϊνες. Οι RGS πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με μια πλειάδα πρωτεϊνών όπως υποδοχείς, τελεστές (κόκκινα βέλη), ρυθμιστικές πρωτεΐνες (μαύρα βέλη) και ρυθμίζουν τη δράση τους

<u>GIRK κανάλια</u>: Έχει δειχθεί από διάφορες μελέτες ότι οι RGS1, 3, 4, 5, 8 πρωτεΐνες ρυθμίζουν τον ρυθμό ενεργοποίησης (άνοιγμα και κλείσιμο) των GIRK καναλιών που ενεργοποιούνται από GPCRs. Η απενεργοποίηση (κλείσιμο) των GIRK καναλιών έχει δειχθεί ότι εξαρτάται από την GAP ενεργότητα των RGS πρωτεϊνών που ασκούν στις Ga, ενώ η ενεργοποίηση (άνοιγμα) των καναλιών δεν εξαρτάται από τον ίδιο μηχανισμό.

Οι ξεχωριστές αυτές δράσεις των RGS πρωτεϊνών στη λειτουργία των GIRK καναλιών έχουν τη βάση τους σε ξεχωριστές περιοχές στο μόριο της RGS. Η απενεργοποίηση του καναλιού, που εξαρτάται από τη δράση GTPάσης, απαιτεί ένα ακέραιο RGS Box, αλλά η ενεργοποίηση του καναλιού όχι. Πειράματα σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων αρουραίου έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο (όχι όμως η RGS περιοχή) της RGS8 επιταχύνει την ενεργοποίηση των GIRK καναλιών (Jeong and Ikeda, 2001). Υπάρχουν πλέον αποδείξεις που υποστηρίζουν το φυσικό σχηματισμό πολύ-πρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων μεταξύ RGS-GIRK καναλιών, καθώς οι Fujita et al., 2000 απέδειξαν για πρώτη φορά ότι τα Kir 3.1 και Kir 3.4 κανάλια K<sup>+</sup> μπορούν να ανοσοσυγκατακρημνιστούν με την RGS4 πρωτεΐνη.

<u>Φωσφολιπάση Cβ (PLCβ</u>): Η PLCβ ενεργοποιείται κυρίως από την Gqa πρωτεΐνη και τις Gβγ υπομονάδες, και υδρολύει φωσφατίδυλο-ινοσιτίδια (PIP<sub>2</sub>) για να δημιουργηθούν οι δεύτεροι μηνύτορες IP<sub>3</sub> και διακυλογλυκερόλη. Πολλές RGS πρωτεΐνες, λόγω της GAP ενεργότητας για την Gqa, μπορούν να αναστείλουν την ενεργότητα της PLCβ (Chidiac et al., 2002). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι RGS2, 3, 4, 10 παρεμποδίζουν επίσης την ενεργοποίηση της PLCβ από την Gqa-GTPγS, πράγμα το οποίο δηλώνει ότι μπορούν να αναστέλλουν τη σηματοδότηση της PLCβ ανεξάρτητα από την GAP ενεργότητά τους (Hepler et al., 1997, Heximer et al., 1997). Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι αυτές οι RGS πρωτεΐνες αναστέλλουν απευθείας την αλληλεπίδραση μεταξύ Gqa και PLCβ με το να προσδένονται στην Gqa και να ανταγωνίζονται την αλληλεπίδραση Gqa-PLCβ. Εναλλακτικά, άλλη μελέτη έδειξε ότι η RGS4 μπορεί να προσδένεται απευθείας με την PLCβ και την Gqa ταυτόχρονα, αποδεικνύοντας ότι η RGS4 μπορεί να παραμένει αγκυροβολημένη σε ένα Gqa – Gβγ – PLCβ σηματοδοτικό σύμπλοκο ώστε να βρίσκεται κοντά και να τερματίζει γρήγορα το σήμα, λόγω της GAP ενεργότητάς της (Dowal et al., 2001).

<u>Κανάλια Ca<sup>+2</sup></u>: Μελέτες έδειξαν ότι σε ανασυσταμένα συστήματα ο ρυθμός έναρξης και ο ρυθμός τερματισμού της απενεργοποίησης των καναλιών Ca<sup>+2</sup> από τις ενεργοποιημένες Gza, Gqa και Gi/oa, επιταχύνεται παρουσία των RGS2, RGS4, RGS10, RGS12 (Melliti et al., 2001, Schiff et al., 2000, Jeong and Ikeda, 2000). Όπως και με τα GIRK κανάλια, έτσι και στην περίπτωση των καναλιών Ca<sup>+2</sup> η επιτάχυνση της απενεργοποίησης

(κλείσιμο) των καναλιών δεν οφείλεται στην GAP ενεργότητα των RGS πρωτεϊνών. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός για αυτήν τη δράση των RGSs στα κανάλια είναι ότι οι RGS πρωτεΐνες προκαλούν συσσώρευση των Gq υπομονάδων και μέσω μιας άγνωστης διαδικασίας παρεμποδίζουν τις ανασταλτικές δράσεις των Ga στην απενεργοποίηση των καναλιών Ca<sup>+2</sup> που προκαλείται από τις Gβγ υπομονάδες (Kammermeier et al., 2000). Ένας δεύτερος μηχανισμός προτείνει ότι οι RGS πρωτεΐνες, προσδενόμενες με τις Ga υπομονάδες, αφήνουν διαθέσιμες τις Gβγ, οι οποίες με τη σειρά τους αναστέλλουν τη ροή ιόντων Ca<sup>+2</sup> (Melliti et al., 2000). Η RGS12 που περιλαμβάνει πολλά δομικά μοτίβα από την άλλη πλευρά, είναι δυνατόν λόγω της απευθείας αλληλεπίδρασής της με τα κανάλια Ca<sup>+2</sup> να ευθύνεται για την επιτάχυνση της αναστολής των καναλιών αυτών. Πράγματι βρέθηκε ότι η PTB περιοχή (Ταξινόμηση RGS πρωτεϊνών, υποοικογένεια D/R12, σελ. 45) της RGS12 αλληλεπίδρα με την α<sub>1</sub> υπομονάδα του Ν-τύπου καναλιού Ca<sup>+2</sup> και αυτή η αλληλεπίδραση αποσταθεροποιεί την πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο κανάλι Ca<sup>+2</sup> και αναστέλλει τη λειτουργία του (Richman et al., 2005).

<u>ΜΑΡ κινάσες:</u> Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα για απευθείας αλληλεπίδραση των RGS πρωτεϊνών με τις MAP κινάσες. Παρόλα αυτά, οι RGS πρωτεΐνες φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των MAP κινασών (Chidiac and Roy, 2003, Bansal et al., 2007). Πειράματα σε κύτταρα COS-7 που εκφράζουν τον υποδοχέα της βομβεσίνης BB-R, ο οποίος συζεύγνυται με Gq/11, ή τον ντοπαμινεργικό D2-R, ο οποίος συζεύγνυται με Gi, έδειξαν ότι η υπερέκφραση της RGS4 οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης των MAP κινασών (Yan et al., 1997). Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της RGS3, όπου η έκφρασή της σε κύτταρα BHK (νεφρικά κύτταρα χάμστερ) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της φωσφορυλίωσης των ERK1,2 που προκαλείται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα του λυσοφωσφατιδικού οξέος LPA-R (Chatterjee et al., 1997). Δεδομένα από άλλες μελέτες δείγνουν, επίσης, ότι η RGS2 μπορεί και αναστέλλει την ενεργοποίηση των MAP κινασών από τον M2mAChR, όταν γίνεται ανασύσταση της RGS2, των M2-mAChR και της Gia1 σε φωσφολιπιδικά κυστίδια (Ingi et al., 1998). Αντίστοιχα, βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση των MAP κινασών από την ενδοθηλίνη ενισγύεται όταν γίνεται σίγηση της ενδογενούς RGS3 με τη χρήση antisense ολιγονουκλεοτιδίων σε NIH3T3 κύτταρα (ινοβλάστες ποντικού) (Dulin et al., 1999). Μελέτες έχουν δείξει, επίσης, ότι η RGS16 αναστέλλει την ενεργοποίηση των MAP κινασών που προκαλείται από Gi πρωτεΐνες μέσω του M2mAChR, και μάλιστα η δράση αυτή της RGS16 οφείλεται μόνο εν μέρει στην GAP ενεργότητά της (Derrien and Druey, 2001). Δεδομένα από μελέτες με χρήση ριβοενζύμων σε κύτταρα A-10 υποδηλώνουν ότι η RGS3 αναστέλλει ειδικά την ενεργοποίηση των MAP κινασών που προκαλείται από τον M3-mAChR, ενώ η RGS5 αναστέλλει ειδικά την ενεργοποίηση των MAP κινασών που προκαλείται από τον M3-mAChR, ενώ η RGS5 αναστέλλει ειδικά την ενεργοποίηση των MAP κινασών που προκαλείται από τον M3-mAChR, ενώ η RGS5 αναστέλλει ειδικά την ενεργοποίηση των MAP κινασών από τον AT<sub>1A</sub>-R (Wang et al., 2002). Νεώτερες μελέτες έδειξαν ότι η RGS9-2 αναστέλλει την ενεργοποίηση των ERK1,2 σε κύτταρα PC-12 που εκφράζουν τον μ-OR και ενεργοποιούνται με μορφίνη και DAMGO (Psifogeorgou et al., 2007). Υπάρχουν και περιπτώσεις που δείχνουν ότι μια RGS πρωτεΐνη μπορεί να δράσει ως σύνδεσμος για τη «συνομιλία» (crosstalk) των σηματοδοτικών μονοπατιών GPCRs με άλλους υποδοχείς όπως είναι οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων (Lou et al., 2001), οδηγώντας έτσι σε αναστολή της ενεργοποίησης των MAP κινασών.

Πέραν όμως από την επίδραση των RGS πρωτεϊνών στη σηματοδότηση των MAP κινασών, υπάρχουν και δεδομένα που συνηγορούν στο ότι οι MAP κινάσες με τη σειρά τους ρυθμίζουν την ενεργότητα των RGS πρωτεϊνών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα των RGS πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν με τους στόχους τους μπορεί να ρυθμίζεται από αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσής τους. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της GAIP που προάγεται από τις Gi πρωτεΐνες, εξαρτάται από τη δράση της ERK2 και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητάς της ως GAP (Ogier-Denis et al., 2000). Αντίστοιχα, η SST2 στη ζύμη φωσφορυλιώνεται από την MAP κινάση ως απόκριση στην ενεργοποίηση του υποδοχέα των φερομονών, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησής της και αύξηση της διαθεσιμότητάς της για να αλληλεπιδρά με τις G πρωτεΐνες-στόχους (Garrison et al., 1999).

#### Αλληλεπιδράσεις των RGS πρωτεϊνών με ρυθμιστικές πρωτεΐνες

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις των RGS πρωτεϊνών με τα κύρια συστατικά του μονοπατιού σηματοδότησης των GPCRs, έχουν περιγραφεί και αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών αυτών με ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες-ικριώματα, οι οποίες είναι καθοριστές για τη σύζευξη μεταξύ μιας RGS και ενός GPCR (RGS-GPCR ζεύγος)

(Abramow-Newerly et al., 2006, Neitzel and Hepler, 2006). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επηρεάζουν επίσης τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τη λειτουργία και τη σταθερότητα των RGS πρωτεϊνών (De Vries et al., 2000). Η πλειονότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των RGS και άλλων πρωτεϊνών γίνεται από τις περιοχές του μορίου των RGS εκτός της RGS περιοχής. Εντούτοις έχουν ανακαλυφθεί και αλληλεπιδράσεις που γίνονται και με την περιοχή RGS, γεγονός που δεικνύει πολυπλοκότητα στο ρόλο των RGS *in vivo*. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η RGS περιοχή αλληλεπιδρά με μικρές GTPάσες, την PKA και μέλη του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού (De Vries et al., 2000). Μερικές από αυτές τις βοηθητικές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι RGS παρατίθενται παρακάτω:

<u>Kalμoδoυλίνη</u>: Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρωτεΐνη καlμοδουλίνη προσδένει ιόντα Ca<sup>+2</sup>, αllάζει τη στερεοδιαμόρφωσή της και ρυθμίζει ποllές σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Η Ca<sup>+2</sup>/καlμοδουlίνη προσδένει τις RGS1, 2, 4, 10, 16, 19 πρωτεΐνες και αυτή καθεαυτή η πρόσδεση δεν μεταβάllει την GAP ενεργότητά τους (Popov et al., 2000), παρόlο που η ενεργότητα αυτών των RGS αυξάνεται με την πρόσδεση. Αυτό που συμβαίνει είναι ότι η Ca<sup>+2</sup>/καlμοδουlίνη ανταγωνίζεται με την PIP<sub>3</sub> για την πρόσδεση της στην RGS4 – η δε πρόσδεση της PIP<sub>3</sub> στην RGS4 αναστέllει την GAP ενεργότητα της RGS4 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Popov et al., 2000). Η ρύθμιση της δράσης της RGS4 με την αμοιβαίως αποκlειόμενη πρόσδεση των Ca<sup>+2</sup>/καlμοδουlίνη και PIP<sub>3</sub> υποδηλώνει ένα κομψό μηχανισμό εlέγχου των αυξομειώσεων του ενδοκυτταρικού Ca<sup>+2</sup>. Η καlμοδουlίνη και η PIP<sub>3</sub> δεσμεύονται στο καρβοζυτεlικό τμήμα της τέταρτης έlικας της RGS περιοχής της RGS4. Αυτή η θέση δέσμευσης είναι καlά συντηρημένη σε διάφορες RGS πρωτεΐνες και αυτό υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο της πρόσδεσης της PIP<sub>3</sub> και του συμπλόκου Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουlίνη στη ρύθμιση πολλών υποτύπων RGS πρωτεϊνών (Ishii et al., 2005).

<u>Σπινοφιλίνη</u>: Η σπινοφιλίνη (SPL) είναι μια πρωτεΐνη με πολλά δομικά μοτίβα-περιοχές που της δίνουν τη δυνατότητα να προσδένεται σε διάφορα μόρια συμπεριλαμβανομένων των GPCRs, όπως είναι οι D2-R,  $a2_A$ -AR,  $a2_B$ -AR. Η σπινοφιλίνη μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τις RGS1, 2, 4, 16, 19 πρωτεΐνες, όπως φάνηκε σε *in vitro* πειράματα pulldown (Wang et al., 2005). Η πρόσδεση της σπινοφιλίνης στους υποδοχείς γίνεται μέσω της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς αυτών των υποδοχέων και δημιουργείται ένα

σύμπλοκο SPL-GPCR-RGS. Αυτό υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή παίζει ένα ρόλο πρωτεΐνης-ικριώματος, καθώς στρατολογεί τις RGS πρωτεΐνες πιο κοντά στους υποδοχείς. Η αλληλεπίδραση του ζεύγους RGS-SPL με τους GPCRs μπορεί να αποτελεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό άμεσης εξασθένησης της σηματοδότησης, καθώς η πρόσδεση της σπινοφιλίνης αποκλείει την πρόσδεση των αρρεστινών και τη λειτουργία του μηχανισμού απευαισθητοποίησης μέσω αυτών των πρωτεϊνών, καθότι η σπινοφιλίνη, προσδενόμενη στους υποδοχείς, ανταγωνίζεται την πρόσδεση της GRK2, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τις αρρεστίνες (Wang et al., 2004β).

*Άλλες πρωτεΐνες*: H GIPC (GAIP Interacting Protein C terminus) είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο της GAIP (De Vries et al., 1998), προσδένεται όμως και σε διάφορους GPCRs, όπως είναι οι D2-, D3-R (Jeanneteau et al., 2004α, β), ο β1-AR (Hu et al., 2003) καθώς και σε υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (IGF-1, insulinlike growth factor 1, TGF $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ). To  $\sigma \dot{\nu} \mu \pi \lambda \sigma \kappa \sigma$  GIPC-GAIP είναι αγκυροβολημένο στη μεμβράνη και εντοπίζεται κυρίως στα κυστίδια κλαθρίνης, σκοπός του δε φαίνεται ότι είναι η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, κι όχι απλά ο τερματισμός της σηματοδότησης μέσω της GAP ενεργότητας. Το σύμπλοκο δρα δηλαδή ως γέφυρα μεταξύ των GPCRs και άλλων σηματοδοτικών μορίων, ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση μέσω μηγανισμών ανεξάρτητων από τις G πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες R9AP (RGS9 associated protein) (Hu and Wensel, 2002) και R7BP (R7 binding protein) (Martemyanov et al., 2005, Drenan et al., 2005) προσδένονται στις RGS6, 7, 9, 11 πρωτεΐνες μέσω των DEP περιοχών των τελευταίων. Λειτουργούν ως πρωτεΐνεςικριώματα που καθορίζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό των RGS και τη στόχευσή τους στις G πρωτεΐνες. Η R9AP είναι απαραίτητη στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών για το γρήγορο «κλείσιμο» των ενεργοποιημένων από τη ροδοψίνη σημάτων τρανσντιουσίνης από την RGS9-1. Η R9AP προσδένεται στην RGS9 και RGS11 και η R7BP προσδένεται και στα 4 μέλη της R7 υποοικογένειας (Martemyanov et al., 2005). Ο φυσιολογικός ρόλος των περισσότερων από τις αλληλεπιδράσεις αυτές βρίσκεται υπό διερεύνηση αν και η παρουσία της R7BP φάνηκε πρόσφατα σε HEK293 κύτταρα ότι είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση των R7 RGS πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη (Drenan et al., 2005). Υπάρχουν επίσης οι πρωτεΐνες DMAP1 και SCG10 που προσδένονται στην RGS6 και στις RGS6, 20 αντίστοιχα, μέσω των GGL περιοχών των τελευταίων (Liu and Fisher, 2004, Liu et al., 2002, Nixon et al., 2002). Η DMAP1 είναι ένας παρεμποδιστής της μεταγραφής, ο οποίος αλληλεπιδρά με την RGS6 και η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί αλλαγές στη μεταγραφή, δηλώνοντας τη συμμετοχή των RGS πρωτεϊνών στη ρύθμιση των γονιδίων (Liu and Fisher, 2004). Η SCG10, μια πρωτεΐνη που αποσταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους και εμπλέκεται στην ανάπτυξη των νευρώνων, συνεντοπίζεται με τις RGS6 και 20 και αυτό έχει ως συνέπεια την διαφοροποίηση ή όχι των PC-12 κυττάρων που επάγεται από τον παράγοντα NGF (nerve growth factor) (Liu et al., 2002, Nixon et al., 2002) (σχέση RGS πρωτεϊνών με διαφοροποίηση νευρώνων μέσω μηχανισμών που δεν περιλαμβάνουν G πρωτεΐνες). Τέλος, οι 14-3-3 πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες ικριώματος, αλληλεπιδρούν με τις RGS3, 4, 7, 8 και η πρόσδεση αυτή αναστέλλει την GAP ενεργότητα των RGS πρωτεϊνών (Benzing et al., 2000).

#### 1.4.3.2 Ρόλος των RGS σε λειτουργίες του εγκεφάλου

Πολλές από τις RGS πρωτεΐνες εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε διάφορες περιογές του εγκεφάλου (Gold et al., 1997), υποδηλώνοντας ότι είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών του εγκεφάλου. Ένας αριθμός παρατηρήσεων δηλώνει ότι οι RGS πρωτεΐνες ενδεχομένως μπορούν να ρυθμίζουν την επαγωγή ή συντήρηση της συναπτικής πλαστικότητας που ελέγγεται από το σύστημα κορτικοειδών-ραβδωτού σώματος και βασίζεται κυρίως στη σηματοδότηση τον ντοπαμινεργικών υποδογέων (Burchett, 2005). Υπάρχουν μελέτες που δεικνύουν ότι η υπερέκφραση της RGS9-2 στον επικλινή πυρήνα οδηγεί σε ελάττωση των κινητικών επιδράσεων (locomotor effects) των D2 αγωνιστών και μειώνει την ανταμοιβή που οφείλεται στην χορήγηση κοκαΐνης σε αρουραίους (Rahman et al., 2003). Επίσης, διήθηση (dialysis) της RGS9-2 μέσα σε χολινεργικούς νευρώνες του ραβδωτού σώματος έδειξε ότι μειώνει την ενεργοποίηση της ροής ιόντων των καναλιών Ca<sup>+2</sup> Ν-τύπου που προκαλείται από τους D2 ντοπαμινεργικούς υποδοχείς (Cabrera-Vera et al., 2004). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τον ρυθμιστικό ρόλο της RGS9-2 στη σηματοδότηση των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στο ραβδωτό σώμα και κατ'επέκταση τη συμβολή αυτής της πρωτεΐνης σε λειτουργίες όπως η μάθηση και σε ψυχοκινητικές ανωμαλίες, που δημιουργούνται από την κατάχρηση ναρκωτικών ή την ασθένεια του Parkinson. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι στιγμιαία ή επαναλαμβανόμενη χορήγηση αμφεταμίνης μεταβάλλει την ποσότητα του mRNA των RGS2, 3, 4, 5, 8, 9-2 στο θωρακικό ραβδωτό σώμα του αρουραίου (Burchett et al., 1998, Bishop et al., 2002, Gonzalez-Nicolini and McGinty, 2002), ενώ ελαττωμένα επίπεδα των mRNAs των RGS3 και RGS12 παρατηρούνται στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο (Ventral Tegmental Area, VTA) θυμάτων από υπερβολική δόση κοκαΐνης (Tang et al., 2003).

Η RGS4 πρωτεΐνη, ειδικότερα, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συγκεκριμένα στην στιβάδα των κυττάρων Purkinje της παρεγκεφαλίδας, στον φλοιό, στην αμυγδαλή, στο ραβδωτό σώμα, στον θάλαμο και στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου (Gold et al., 1997, Ingi et al., 1998). Υπάρχουν πολλά στοιχεία που φανερώνουν ότι η RGS4 συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες του εγκεφάλου (Neubig and Siderovski, 2002). Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι η έκφραση της RGS4 αλλάζει μετά από στρες ή χορήγηση γλυκοκορτικοειδών (Ni et al., 1999). Η RGS4, επίσης, ρυθμίζει αρνητικά τους υποδοχείς mGluR1/5 που συζεύγνυνται με τις Gqa υπομονάδες στους νευρώνες (Saugstad et al., 1998).

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν έναν νέο ρόλο για τις RGS πρωτεΐνες στην εκδήλωση ψυχιατρικών διαταραχών. Σε αναλύσεις διαφορικής έκφρασης περίπου 8.000 γονιδίων σε μικροσυστοιχίες cDNA (cDNA microarrays), παρουσιάστηκε μείωση του mRNA της RGS4 στον προμετωπιαίο, κινητικό και οπτικό φλοιό του εγκεφάλου ασθενών με σχιζοφρένεια. Αυτό υποδεικνύει ότι τα χαμηλά επίπεδα της RGS4 θα μπορούσαν να ευθύνονται για την ανάπτυξη της σχιζοφρένειας (Mirnics et al., 2001, Levitt et al., 2006).

Όλες αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν αποδείξεις ότι οι RGS πρωτεΐνες είναι στρατηγικά τοποθετημένες να επηρεάζουν εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως το ντοπαμινεργικό σύστημα. Δεδομένου ότι το ντοπαμινεργικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη των νευρώνων, οι RGS πρωτεΐνες ενδεχομένως εμπλέκονται στη συναπτική πλαστικότητα, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως επί παραδείγματι στην κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών.

#### 1.4.3.3 Ρόλος των RGS στην οπιοειδή δράση

Το πρόγραμμα χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) και οι μελέτες σε άλλα γονιδιώματα προτείνουν ότι μια δυνατή γενετική σύνδεση μεταξύ δυο γονιδίων δεν υποδηλώνει μόνο συντονισμένη μεταγραφή και κοινούς μηχανισμούς ρύθμισης, αλλά υποδηλώνει επίσης και ρυθμιστική σχέση (Xie and Palmer, 2005). Κατά αντιστοιχία οι RGS πρωτεΐνες, όχι μόνο βρίσκονται σε ομάδες μαζί με γονίδια που έχουν σχέση με τις G πρωτεΐνες, όπως είναι τα GNA, GNG και GPRKs (Ga, Gγ υπομονάδες και κινάσες των G πρωτεΐνών αντίστοιχα), αλλά συνδέονται επίσης ισχυρά και με τα γονίδια των οπιοειδών υποδοχέων. Έτσι, γονίδια όπως αυτά των GAIP, RGS20 και RGS17 συνδέονται γενετικά με τους υποδοχείς ORL1, κ-OR και μ-OR αντίστοιχα και αυτό υποδεικνύει ότι τα γονίδια των οπιοειδών υποδοχέων υποδοχέων και των RGS

Οι RGS πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην οπιοειδή δράση και στην ανοχή μετά από χρόνια χορήγηση οπιοειδών αγωνιστών (Xie and Palmer, 2005). Μελέτες δείχνουν ότι οι RGS πρωτεΐνες των υποοικογενειών RZ, R4 και R7 συμμετέχουν καθοριστικά στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων μέσω των οπιοειδών αναλόγων. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι υπεύθυνες μόνο για την απενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και τον τερματισμό της οπιοειδούς δράσης, αλλά κυρίως είναι στοιχείακλειδιά για την απευαισθητοποίηση, εσωτερίκευση, ανακύκλωση και αποικοδόμηση των οπιοειδών υποδοχέων και πιθανόν να αποτελούν την σύνδεση μεταξύ της στιγμιαίας απευαισθητοποίησης των οπιοειδών υποδοχέων και της χρόνιας ανοχής στα οπιοειδή (Xie and Palmer, 2005). Μελέτες έχουν δείξει ότι η GAIP όχι μόνο επιταχύνει την ενεργότητα GTPάσης των Ga υπομονάδων αλλά επίσης διευκολύνει την εσωτερίκευση και ανακύκλωση των οπιοειδών υποδογέων μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Elenko et al., 2003). Πράγματι, πειράματα ανοσοφθορισμού σε ΗΕΚ293 κύτταρα έδειξαν ότι, στην κατάσταση ηρεμίας, η GAIP εντοπίζεται σε περιοχές της μεμβράνης που καλύπτονται από κλαθρίνη, ενώ ο δ-OR με τις G πρωτεΐνες σε περιοχές της μεμβράνης χωρίς κλαθρίνη. Μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα, οι τρεις πρωτεΐνες δ-OR – G πρωτεΐνες – GAIP συνεντοπίζονται σε περιοχές με κλαθρίνη και αυτό οδηγεί σε ενδοκύττωση του υποδοχέα που ακολουθείται από ανακύκλωση ή αποικοδόμησή του (Elenko et al., 2003). Με δεδομένο το γεγονός ότι η απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση των υποδοχέων είναι το κλειδί για την οπιοειδή σηματοδότηση και την ανοχή στα οπιοειδή, εύκολα συμπεραίνει κανείς το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η GAIP σε αυτούς τους μηχανισμούς. Πειράματα σίγησης της έκφρασης των GAIP και RGS20 έδειξαν ότι οι δυο αυτές πρωτεΐνες έχουν άμεση σχέση με την υπερνωτιαία αναλγητική δράση των αγωνιστών του μ-OR, κι ότι η αναστολή της έκφρασης αυτών των RGS πρωτεϊνών διευκολύνει την ανάπτυξη στιγμιαίας και χρόνιας ανοχής στη μορφίνη (Garzon et al., 2004).

Στην περίπτωση της RGS9-2, έχει βρεθεί ότι αυτή η RGS εκφράζεται στο ραβδωτό σώμα, στην περιϋδραγωγό φαιά ουσία και στον νωτιαίο μυελό, όπου συνεντοπίζεται με τους οπιοειδείς υποδοχείς και με την Gβ<sub>5</sub> υπομονάδα, με την οποία αλληλεπιδρά μέσω της GGL περιοχής της. Υπερέκφραση της RGS9-2 σε μελανοφόρα κύτταρα του Xenopus που εκφράζουν ενδογενώς τον μ-OR, ελαχιστοποιεί τη συσσώρευση των χρωστικών κοκκίων που προκαλείται από τη χορήγηση μορφίνης (Rahman et al., 1999). Από την άλλη πλευρά, οι Garzon et al. έδειξαν ότι η αναστολή της έκφρασης της RGS9-2 με antisense ολιγονουκλεοτίδια μεγενθύνει τη δράση και διάρκεια των αναλγητικών ιδιοτήτων της μορφίνης και του DAMGO, ενώ εμποδίζει την ανάπτυξη στιγμιαίας ανοχής στη μορφίνη (Garzon et al., 2001, 2003).

Η RGS9-2 όμως έχει επίδραση και στην χρόνια ανοχή στη μορφίνη, καθώς αποσιώπηση της έκφρασής της σε ένα σύστημα κυτταρικής καλλιέργειας νευροβλαστικών κυττάρων του ιππόκαμπου αναστέλλει την αυξορύθμιση της ενεργότητας της αδενυλικής κυκλάσης που προκαλείται από χρόνια χορήγηση μορφίνης (Xu et al., 2004). Παράλληλα, μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η στιγμιαία χορήγηση μορφίνης αυξάνει την παραγωγή του mRNA και την έκφραση της πρωτεΐνης RGS9-2 σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, ενώ χρόνια έκθεση σε μορφίνη μειώνει την έκφραση αυτής (Zachariou et al., 2003). Στις ίδιες μελέτες, RGS9-knockout ποντίκια έδειξαν σε πειράματα προσδιορισμού της συμπεριφοράς δραματική αύξηση της αναλγησίας και της αίσθησης της ανταμοιβής που παρατηρείται παρουσία μορφίνης, επιδεικνύοντας καθυστέρηση σε φαινόμενα ανοχής. Από την άλλη πλευρά, τα εθισμένα στη μορφίνη RGS9-knockout ποντίκια εμφανίζουν μεγαλύτερη φυσική εξάρτηση, σε σύγκριση με αντιστοίχως εθισμένα φυσιολογικά ποντίκια. Όλα αυτά δεικνύουν ότι η RGS9-2 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του μ-OR και παίζει γενικότερο ρόλο στην ανοχή και εξάρτηση.

Μελέτες με τη χρήση antisense ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία χορηγούνται απευθείας σε περιοχές του εγκεφάλου ποντικού έδειξαν ότι και άλλα μέλη της R7 υποοικογένειας, όπως είναι οι RGS6, 7 και 11, ρυθμίζουν αρνητικά τη δράση της μορφίνης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρατηρείται διαφορετική επίδραση στη σηματοδότηση των μ-OR και δ-OR. Για παράδειγμα, η αναστολή της RGS6 αυξάνει κατά πολύ τη δραστικότητα και διάρκεια της αναλγησίας από μορφίνη, όμως μειώνει την δραστικότητα αλλά αυξάνει τη διάρκεια των αναλγητικών δράσεων των δ-OR αγωνιστών. Αναστολή της RGS11 μειώνει τη δραστικότητα και διάρκεια στη δράση της αναστολή της δραστικότητα και διάρκεια στη δράση την απόκριση στους μ-OR και δ-OR αγωνιστών (Garzon et al., 2003).

Οσον αφορά στην RGS4, η ρυθμιστική της δράση φαίνεται ότι στοχεύει ειδικότερα και τους οπιοειδείς υποδοχείς (Jean-Baptiste et al., 2006). Μέλη της οικογένειας R4, όπως είναι οι RGS2, 4 και 8, ρυθμίζουν την οπιοειδή δράση κυρίως μέσω της GAP ενεργότητας που διαθέτουν, βασιζόμενες στην τοπική και χρονική συνέκφρασή τους με τους οπιοειδείς υποδοχείς σε νευρικά κύτταρα και ιστούς. Έρευνες έδειξαν ότι η εξωγενώς χορηγούμενη RGS4 προκαλεί αναστροφή της αναστολής των επιπέδων cAMP που προκαλείται από ενεργοποίηση του δ-OR σε κύτταρα NG-108 (υβριδική σειρά neuroblastoma x glioma), λόγω της GAP δράσης της στις Gi και Go πρωτεΐνες (Hepler et al., 1997). Η RGS4 επίσης ρυθμίζει τη δράση των μ-OR και κ-OR καθώς υπερέκφρασή της σααστέλλεται από την ενεργοποίηση του μ-OR (Garnier et al., 2003), ενώ επιταχύνει την απενεργοποίηση των GIRK καναλιών μετά από τερματισμό της σηματοδότησης του μ-OR (Ulens et al., 2000).

Η RGS4 όχι μόνο ρυθμίζει αρνητικά την οπιοειδή σηματοδότηση, αλλά αντίστοιχα και η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση και λειτουργία αυτής. Μελέτες έδειξαν ότι το mRNA της RGS4 αυξορυθμίζεται όταν ενεργοποιούνται οι οπιοειδείς υποδοχείς για σύντομο χρονικό διάστημα, σε PC12 κύτταρα που εκφράζουν τον μ-OR και κ-OR (Nakagawa et al., 2001). H RGS4 και RGS2

εκτός από το να ρυθμίζουν τη στιγμιαία οπιοειδή σηματοδότηση, εμπλέκονται και σε μηχανισμούς της οπιοειδούς ανοχής. Μελέτες έδειξαν ότι η χρόνια χορήγηση μορφίνης αυξάνει επίσης τα επίπεδα mRNA σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην οπιοειδή αναλγησία και στις αποκρίσεις στη φυσική εξάρτηση και την στέρηση (Bishop et al., 2002), ενώ τα επίπεδα τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης των RGS2 και RGS4 μεταβάλλονται σε εθισμένα πειραματόζωα που υποβάλλονται σε στέρηση (Gold et al., 2003). Οι παραπάνω μελέτες δεικνύουν ένα μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης κατά τον οποίο η σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων επάγει την αυξο-ρύθμιση του mRNA και της πρωτεΐνης μιας RGS, η οποία με τη σειρά της τερματίζει γρήγορα το οπιοειδές σήμα. Όλα αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν το γεγονός ότι η RGS2 και RGS4 είναι πιθανοί λειτουργικοί ρυθμιστές στην ανάπτυξη της οπιοειδούς ανοχής και παίζουν ενεργό ρόλο στη στέρηση που παρατηρείται μετά από παρατεταμένη χορήγηση οπιοειδών αναλόγων, έρευνα που χρήζει διερεύνησης.

# 2. Σκοπός

Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης και λειτουργίας των οπιοειδών υποδοχέων μας δίνει τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε σε κυτταρικό επίπεδο τα μονοπάτια σηματοδότησης που ευθύνονται για μια σειρά φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η αναλγησία, η ευφορία, η μνήμη-μάθηση, αλλά και η ανοχή και εξάρτηση σε οπιοειδή ανάλογα. Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των GPCR υποδοχέων και αλληλεπιδρούν με μέλη της Gi<sub>0</sub> υποοικογένειας των G πρωτεϊνών. Το ερώτημα που τίθεται είναι πώς οι υποδοχείς αυτοί, επιλέγουν με ποιους εξειδικευμένους υποτύπους των G πρωτεϊνών θα συζευχθούν ώστε να οδηγήσουν τη μετάδοση του ερεθίσματος στους διάφορους τελεστές. Τελευταία δεδομένα συνηγορούν, ότι η εξειδίκευση στη σηματοδότηση, τόσο των GPCRs γενικότερα όσο και των οπιοειδών υποδοχέων, οφείλεται στην αλληλεπίδραση των υποδοχέων αυτών με άλλες πρωτεϊνές εκτός των G πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιορίσουμε α) κατά πόσο οι οπιοειδείς υποδοχείς αλληλεπιδρούν με νέες πρωτεΐνες και β) ποια η σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων στην οπιοειδή δράση. Οι RGS πρωτεΐνες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στον κύκλο ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών. Επιπλέον είναι γνωστό, ότι οι RGS πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τους GPCRs καθώς και με διάφορες άλλες πρωτεΐνες (τελεστές, πρωτεΐνες ικριώματος) και λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης των GPCRs. Μέχρι σήμερα δεν είναι κατανοητή η συμβολή των πρωτεϊνών αυτών στην κυτταρική σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων. Για να διερευνήσουμε κατά πόσο οι RGS πρωτεΐνες, και συγκεκριμένα η RGS4 αλληλεπιδρούν και εμπλέκονται στη ρύθμιση και λειτουργία των γιμαιρικές οπιοειδών υποδογέων, γρησιμοποιήσαμε αρχικά πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύουν τα ενδοκυτταρικά τμήματα των μ-OR και δ-OR σε in vitro πειράματα. Γνωρίζοντας ότι οι μ-OR και δ-OR περιέχουν μια συντηρημένη περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο, διερευνήσουμε εάν υπάρχει μια συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία αναγνώρισης για την πρόσδεση της RGS4 μεταξύ των υποδοχέων αυτών.

Επιπλέον, μελετήσαμε ποιες περιοχές της RGS4 πρωτεΐνης ευθύνονται για την πρόσδεση με τους οπιοειδείς υποδοχείς.

Ένας άλλος ρόλος των RGS πρωτεϊνών είναι αυτός του ικριώματος και η συμμετοχή τους στο σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων, χρησιμοποιώντας ως πλατφόρμα τους υποδοχείς. Για το λόγο αυτό, διερευνήσαμε κατά πόσο α) η πρόσδεση της RGS4 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία λειτουργικών, ετεροτριμερών συμπλόκων μεταξύ αυτής, των οπιοειδών υποδοχέων (μ-, δ-) και των G πρωτεϊνών, και β) κατά πόσο τα δημιουργούμενα σύμπλοκα εξαρτώνται από το είδος ή/και τη διαμόρφωση του υποδοχέα (ενεργή ή ανενεργή). Για μια πιο λεπτομερή ανάλυση του ρόλου της RGS4 στην κυτταρική σηματοδότηση, ελέγξαμε εάν η σύζευξη της RGS4 με τους οπιοειδείς υποδοχείς οδηγεί τους υποδοχείς αυτούς να επιλέγουν με ποιες G πρωτεΐνες θα αλληλεπιδράσουν, μετά από την ενεργοποίηση ή μη των υποδοχέων.

Τέλος ελέγξαμε το ρυθμιστικό ρόλο που παίζει η RGS4 καθοδικά των υποδοχέων ως τροποποιητής (αρνητικός ή θετικός) της οπιοειδούς δράσης. Για τον λόγο αυτό, μελετήσαμε το μηχανισμό μέσω του οποίου η RGS4 παρεμβαίνει στη λειτουργία διαφόρων τελεστών, όπως είναι η αδενυλική κυκλάση και οι MAP κινάσες. Παράλληλα, ελέγξαμε κατά πόσο η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων τροποποιεί τον υποκυτταρικό εντοπισμό της RGS4.

# 3. Υλικά και Μέθοδοι

# Α. Υλικά

Χρησιμοποιήθηκε καθαρή, ετεροτριμερής τρανσντιουσίνη (Gtaβy, transducin) ή καθαρές GtaGDP και Gβy υπομονάδες από αμφιβληστροειδή βοός, απομονωμένες όπως αναφέρουν οι Mazzoni et al., 1991, ευγενική προσφορά της Καθ. Η.Ε. Hamm, Πανεπιστήμιο του Vanderbilt, Νάσβιλ, Τένεσσι, ΗΠΑ. Τα cDNA της ανασυνδιασμένης RGS4 πρωτεΐνης καθώς και της RGS περιοχής της (4Box), που είναι επισημασμένες με τον επίτοπο 6xHis (His-RGS4 και His-4Box αντίστοιχα) σε βακτηριακό φορέα pQE60, ήταν ευγενική προσφορά του Δρ. Τ.Μ. Wilkie, Πανεπιστήμιο του Τέξας, Ντάλας, Τέξας, ΗΠΑ. Οι πρωτεΐνες αυτές απομονώθηκαν όπως περιγράφεται από τους Popov et al., 1997 και Yowe et al., 2002. Το cDNA του μ-οπιοειδούς υποδοχέα από αρουραίο (στον pRC/CMV φορέα) μας το παρείχε ο Δρ G. Bell από το Πανεπιστήμιο του Σικάγο, Ιλινόις, ΗΠΑ. Ο μ-οπιοειδής υποδοχέας από αρουραίο, επισημασμένος με τον επίτοπο myc (σε φορέα pcDNA3), ήταν ευγενική προσφορά της Δρ. S. George από το Πανεπιστήμιο του Τορόντο, Καναδάς. Το cDNA της RGS4 ανθρώπου επισημασμένης με τον επίτοπο αιμαγλουτινίνης (hemagglutinin, HA: YPYDVPDYA) στο καρβοξυτελικό άκρο, το αντι-Goa (OC1) αντίσωμα και το αντι-Gia<sub>2</sub> (SG3) αντίσωμα μας τα παρείχε ο Kaθ. G. Milligan από το Πανεπιστήμιο της Γλασκόβης, Γλασκόβη, Σκοτία, Ηνωμένο Βασίλειο. Ο φορέας pcDNA3-HA ήταν ευγενική προσφορά του Αναπλ. Καθ. Γ. Μόσιαλου, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Οι GST-γιμαιρικές μεταλλάξεις του μ-CT (Y336→A, Y336 $\rightarrow$ A και K344 $\rightarrow$ Q, ΔYXXL) περιγράφονται από τους Mazarakou and Georgoussi, 2005.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ρυθμιστικών και άλλων διαλυμάτων, αγοράστηκαν από την εταιρεία SIGMA-ALDRICH Co. Τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των κυττάρων προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Gibco (Invitrogen), Biochrom AG και PAA Laboratories GmbH. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν συντέθηκαν από την εταιρεία MWG Biotech AG και από την Invitrogen. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αγοράστηκαν από την εταιρεία New England Biolabs Inc. (NEB) και τα dNTPs από την Promega. Η Taq DNA πολυμεράση αγοράστηκε από την NEB (M0273), η Pfu DNA πολυμεράση από τη Fermentas (EP0571) και το Platinum PCR SuperMix από την Invitrogen (11306-016). Η Τ4 λιγάση προμηθεύτηκε από την NEB (M0202) και την Fermentas (EL0014).

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε επωαστήρα διοξειδίου του άνθρακα Napco. Series 5400, CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific). Για τον χειρισμό των κυτταρικών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε ειδικός αποστειρωτικός θάλαμος νηματικής ροής LaminAir Safe 2000 της εταιρείας Holten και για την παρατήρηση των κυττάρων μικροσκόπιο Axiovert 25 της Zeiss. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και του DNA χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Lambda 16 UV/Vis Spectrometer (PerkinElmer). Ειδικότερα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε επίσης η συσκευή ND-1000 Spectrophotometer της Nanodrop. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στην συσκευή T3 Thermocycler της Biometra και η ανίγνευση της αλληλουγίας των νουκλεοτιδίων των cDNA κλώνων που παρασκευάσαμε (dideoxynucleotide sequencing) πραγματοποιήθηκε στον ABI Prism 377 DNA Sequencer του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», και από την εταιρεία BioGenomica. Για τις φυγοκεντρήσεις χρησιμοποιήθηκε η Sigma Zentrifugen 3-1, η MSE-Sanyo Harrier 18/80, η Beckman Coulter Optima MAX 130K με κεφαλή MLA-130, η Beckman L8-80M Ultra Centrifuge με κεφαλή 75Ti, η φυγόκεντρος Sorval RC5C με τις κεφαλές GSA και SS-34, καθώς και η επιτραπέζια φυγόκεντρος της Eppendorf, μοντέλο 5415C και 5414 (fullspeed). Για τη συνεστιακή μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης MRC-1024 της Bio-Rad συνδεδεμένο με σύστημα απεικόνισης και επεξεργασίας εικόνας Nikon Eclipse E600.

# **Β.** Μέθοδοι

# 3.1 Χειρισμός και κατεργασία κυττάρων

# 3.1.1 Βακτηριακά κύτταρα

# 3.1.1.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων

<u>Διαλύματα και υλικά</u>:

LB (Lysogeny Broth ή πιο γνωστό ως Luria-Bertani broth): 170 mM NaCl (1% κ.ο.), 0,5% κ.ο. εκχύλισμα ζύμης, 1% κ.ο. βακτηριακή τρυπτόνη Αντιβιοτικά: αμπικιλλίνη 100 mg/mL, καναμυκίνη 100 mg/mL Λοιπά υλικά: γλυκερόλη 100%

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα DH5α, BL21 (στέλεχος DE3) και JM109 του γένους *Escherichia coli*. Τα πλασμίδια με τα οποία επιμολύνονται τα βακτήρια περιέχουν ένα γονίδιο που προσδίδει στα βακτήρια ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη ή καναμυκίνη, ανάλογα με το πλασμίδιο. Για αυτό το λόγο, τα βακτήρια καλλιεργούνται σε υγρό, αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB που περιλαμβάνει και αντιβιοτικό 100 μg/mL αμπικιλλίνη ή 30 μg/mL καναμυκίνη. Οι βακτηριακοί κλώνοι διατηρούνται στους -80°C, σε θρεπτικό υλικό LB που περιέχει 37,5% κ.ο. γλυκερόλη (glycerol stock). Για τις στερεές καλλιέργειες τα βακτηριακά στελέχη καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm που περιέχουν αποστειρωμένο LB με άγαρ (πολυσακχαρίτης που στερεοποιείται σε θερμοκρασία μικρότερη των 40°C), παρουσία 100 μg/mL αμπικιλλίνης.

# 3.1.1.2 Παρασκευή κυττάρων E.coli δεκτικών σε μετασχηματισμό (competent cells)

Η προετοιμασία δεκτικών κυττάρων είναι διαδικασία που αποσκοπεί στην προετοιμασία βακτηριακών στελεχών, έτσι ώστε να μπορεί να εισαχθεί σε αυτά πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο του μετασχηματισμού. Η όλη διαδικασία γίνεται κοντά σε λύχνο για την αποστείρωση του περιβάλλοντος και των υλικών που χρησιμοποιούνται.

## Διαλύματα και υλικά:

**LB**: βλ. παράγραφος 3.1.1.1

Διάλυμα A: 5 mM Tris-HCl, pH 7, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> Διάλυμα B: 5 mM Tris-HCl, pH 7, 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> Αντιβιοτικά: αμπικιλλίνη 100 mg/mL, καναμυκίνη 100 mg/mL Λοιπά υλικά: πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου, διάλυμα γλυκερόλης 80%

## Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά ακολουθείται διαδικασία εμβολιασμού βακτηριακών κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια, κατά την οποία ξύσμα από τους βακτηριακούς κλώνους των στελεχών DH5α ή BL21 που βρίσκονται στους -80°C καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB (5 mL) για 12-16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Τα ανεπτυγμένα βακτήρια μεταφέρονται σε 500 mL θρεπτικού υλικού LB και επωάζονται 2-3 ώρες στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν, μέχρι η απορρόφηση της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm να φτάσει σε εύρος τιμών 0,5-0,7. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται στον πάγο, όπου και παραμένουν για 10 λεπτά. Τα ανεπτυγμένα βακτήρια φυγοκεντρούνται σε αποστειρωμένα ειδικά πλαστικά δοχεία στα 2.600 x g (4.000 rpm, φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή GSA) για 15 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και ακολουθεί επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 200 mL αποστειρωμένου και παγωμένου διαλύματος Α. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται εκ νέου στα 2.600 x g (4.000 rpm) για 15 λεπτά, στους 4 °C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 mL αποστειρωμένου και παγωμένου διαλύματος Β και τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2.600 x g (4.000 rpm) για 15 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 20 mL παγωμένου διαλύματος Β. Τα αναδιαλυμένα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 1 ώρα και στη συνέχεια προστίθεται αποστειρωμένο, υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 80%, ώστε η συγκέντρωσή της στο τελικό διάλυμα να είναι 15-20%. Τα κύτταρα χωρίζονται σε σωληνάκια ώστε να περιέχουν 100-300 μL και καταψύχονται στους -80°C.

## 3.1.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων – Θερμικό σοκ

Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εισαγωγή των πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα του βακτηρίου *E.coli*.

#### Διαλύματα και υλικά:

SOB (Supreme Optimal Broth): 2% κ.ο. βακτηριακή τρυπτόνη, 0,5% κ.ο. εκχύλισμα ζύμης, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7 (διόρθωση με NaOH)

Λοιπά υλικά: τρυβλία διαμέτρου 100 mm με στέρεο θρεπτικό υλικό (LB + άγαρ),

## Πειραματική διαδικασία:

Ποσότητα 100 μL δεκτικών βακτηρίων *E.coli* που βρίσκεται σε σωληνάκι τύπου Eppendorf, ξεπαγώνει σε πάγο για 10-15 λεπτά και έπειτα προστίθεται σε αυτά το πλασμιδιακό DNA (10-100 ng) που πρόκειται να εισάγουμε. Τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για ακόμα 30 λεπτά και στην συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο όπου και υπόκεινται σε θερμικό σοκ για 90 δευτερόλεπτα στους 42°C, ενώ μεταφέρονται ακολούθως και άμεσα σε πάγο για 2 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη θρεπτικού υλικού SOB (500 μL) και τοποθέτηση των βακτηρίων σε επωαστήρα όπου και παραμένουν στους 37°C υπό ανάδευση για 1 ώρα. Τέλος, από το διάλυμα των βακτηριών εμβολιάζονται τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει αμπικιλλίνη ή καναμυκίνη (ανάλογα με την ανθεκτικότητα σε αντιβιωτικό που παρέχει το πλασμίδιο). Τα εμβολιασμένα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 16-18 ώρες ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες. Για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού (efficiency) ακολουθούμε συγκεκριμένο τρόπο προσέγγισης ως εξής:

Έστω ότι 100 μL δεκτικών κυττάρων μετασχηματίζονται με 0,01 ng πλασμιδιακού DNA, και στην αντίδραση μετασχηματισμού προστίθενται 900 μL θρεπτικού υλικού SOB για τελικό όγκο 1 mL. Η συγκέντρωση του DNA στο νέο διάλυμα θα είναι 0,01 ng/ml. Αν από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιηθούν 100 μL για να εμβολιαστεί το τρυβλίο με το αντιβιοτικό, τελικώς στο τρυβλίο θα έχουν τοποθετηθεί μετασχηματισθέντα βακτήρια με 0,001 ng DNA. Αν υποθέσουμε ότι στο τρυβλίο αναπτύσσονται 200 αποικίες βακτηρίων, η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού εκφράζεται ως εξής:  $\frac{200 \ cfu}{0,001 \ ng} = 2 \ x \ 10^5 \ cfu/ng = 2 \ x \ 10^8 \ cfu/\mu g \ DNA$ 

Ο όρος cfu (colony-forming unit) χρησιμοποιείται για να δηλώσει τον αριθμό των αποικιών που έχουν προέλθει από την ανάπτυξη ζωντανών μόνο βακτηριακών κυττάρων. Καλή αποτελεσματικότητα θεωρείται της τάξης των  $10^8$  cfu/µg DNA και τόση παρατηρείται για τους πιο κοινούς φορείς πολλαπλασιασμού και έκφρασης. Η αποτελεσματικότητα για έναν ανασυνδιασμένο πλασμιδιακό φορέα δημιουργημένο στο εργαστήριο θεωρείται καλή όταν είναι της τάξης των  $10^5$ - $10^6$  cfu/µg DNA, ενώ θεωρείται φτωχή όταν είναι της τάξης των  $10^4$  cfu/µg DNA ή μικρότερη.

# 3.1.2 Ευκαρυωτικά κύτταρα

# 3.1.2.1 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές με δυο βασικά χαρακτηριστικά: α) να είναι εύκολες στο χειρισμό και β) να μπορούν να επιμολυνθούν εύκολα και αποδοτικά. Σκοπός μας ήταν, με τη βοήθεια πλασμιδιακού DNA, να εκφράσουμε εξωγενώς πρωτεΐνες στα κύτταρα για να μελετήσουμε τις ιδιότητές τους και τη λειτουργικότητά τους.

# <u>Κύτταρα HEK293 (Human Embryonic Kidney)</u>

1. Τα κύτταρα αυτά είναι μετασχηματισμένα επιθηλιακά (ή πρώιμα νευρικά, σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες – Shaw et al. 2002) κύτταρα ανθρώπινου νεφρού. Προήλθαν από μετασχηματισμό καλλιεργειών φυσιολογικών ανθρωπίνων εμβρυϊκών κυττάρων με κομμάτια DNA του αδενοϊού 5 και εκφράζουν ενδογενώς ένα μεγάλο πλήθος υποδοχέων, όπως είναι ο α<sub>2</sub>- και β<sub>2</sub>-AR, ο M3-mAChR, ο μεταβοτροπικός υποδοχέας 4 (mGluR 4), ο D2-R, ο GABA-B R1α υποδοχέας κ.α. Το κύριο χαρακτηριστικό των HEK293 κυττάρων είναι ότι ο χειρισμός τους είναι πολύ εύκολος, τόσο στην καλλιέργεια όσο και στη διαμόλυνση και χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την έκφραση και την ανάλυση μιας πρωτεΐνης ή συνδυασμού πρωτεϊνών.

## <u>Κύτταρα COS-7 (CV-1 – simian – in Origin, carrying SV40 genetic material)</u>

Αυτή η κυτταροσειρά χρησιμοποιείται συχνά για την εξωγενή έκφραση πρωτεϊνών μετά από διαμόλυνση. Δημιουργήθηκε με την αθανατοποίηση της κυτταρικής σειράς CV-1 (που προέρχεται από νεφρικά κύτταρα του πράσινου, αφρικανικού πιθήκου *Chlororebus sp.*) με μια έκδοση του γονιδιώματος του SV40 ιού που μπορεί και παράγει το αντιγόνο T, αλλά είναι ελαττωματική στην αντιγραφή του γονιδιώματος.

# Κύτταρα Μ27 ή myc-HEK

Είναι κύτταρα HEK293 που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδιο που φέρει την cDNA αλληλουχία του μ-OR αρουραίου, επισημασμένο στο αμινοτελικό άκρο με τον επίτοπο myc (αμινοξέα EQKLISEEDL), και εκφράζουν μόνιμα τον myc-μ-OR. Η έκφραση του υποδοχέα μετά από πειράματα πρόσδεσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα υπολογίστηκε σε περίπου 500 fmol/mg πρωτεΐνης (Διπλωματική εργασία Δανάης Παπαϊωάννου).

# Κύτταρα flag-δ-OR

Είναι κύτταρα ΗΕΚ293 που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδιο pcDNA3 που φέρει την cDNA αλληλουχία του δ-OR αρουραίου, ο οποίος φέρει στο αμινοτελικό άκρο του τον αντιγονικό επίτοπο flag (αμινοξέα DYKDDDDK), και εκφράζουν μόνιμα τον flag-δ-OR. Η έκφραση του υποδοχέα μετά από πειράματα πρόσδεσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα υπολογίστηκε σε περίπου 500 fmol/mg πρωτεΐνης.

# <u>Κύτταρα ΕΕ-ΗΕΚ</u>

Είναι κύτταρα ΗΕΚ293 που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδιο pcDNA3, ο οποίος φέρει την cDNA αλληλουχία του μ-OR αρουραίου επισημασμένου με τον αντιγονικό επίτοπο EYMPME (ΕΕ) στο αμινοτελικό άκρο, και εκφράζουν μόνιμα τον ΕΕ-μ-OR. Η έκφραση του υποδοχέα μετά από πειράματα πρόσδεσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα υπολογίστηκε ότι είναι περίπου 3 pmol/mg πρωτεΐνης (Morou and Georgoussi, 2005).

# 3.1.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας και υλικά καλλιεργειών

Τα κύτταρα τοποθετούνται σε αποστειρωμένες, πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 75 cm<sup>2</sup> ή σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm, 35 mm ή 22 mm για να αναπτυχθούν, και επωάζονται σε ειδικούς επωαστικούς θαλάμους υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C και σταθερή ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα 5%. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση και την καλλιέργεια των κυττάρων, περιέχει απαραιτήτως τα εξής διαλύματα:

- ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), εμπλουτισμένο με αμινοξέα, βιταμίνες και υδατάνθρακες (F 0455, Biochrom AG).
- αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη (100 units/mL) και η στρεπτομυκίνη (100 μg/mL) (P11-010 PAA Laboratories ή A 2213, Biochrom AG).
- 3. 2 mM γλουταμίνη (M11-004, PAA Laboratories ή K 0282, Biochrom AG).
- 4. 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum ή FBS, 10106-169, Gibco-Invitrogen).
- 5. 0,375% όξινο ανθρακικό νάτριο (S11-002, PAA Laboratories ή L 1713, Biochrom AG), για τη διατήρηση του ελαφρώς αλκαλικού pH της καλλιέργειας (pH 7,2).

## 3.1.2.3 Καλλιέργεια και χειρισμός κυττάρων

Όλα τα στάδια καλλιέργειας και χειρισμού των κυττάρων γίνονται σε στείρες συνθήκες, έτσι ώστε να μην υπάρχουν εξωτερικές μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία με αποστειρωμένα υλικά (διαλύματα, πιπέττες) ενώ ο χειρισμός τους γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής τύπου laminar.

#### Διαλύματα και υλικά:

Θρεπτικό υλικό: βλ. παράγραφο 3.1.2.2

Διάλυμα θρυψίνης: 0,25% κ.ο. θρυψίνη

Διάλυμα ψύξης κυττάρων: 1 mL εμβρυϊκού ορού βοός (FBS), 10% κ.o. DMSO (dimethyl sulfoxide)

**Λοιπά υλικά**: Πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας επιφάνειας 75 cm<sup>2</sup>, τρυβλία καλλιεργειών διαμέτρου 100 mm και 35 mm, τρυβλία με 6 πηγαδάκια (6-well plates) και με 12 πηγαδάκια (12-well plates) (διάμετρος πηγαδιών 35 mm και 22 mm αντίστοιχα)

Πειραματική διαδικασία:

Η καλλιέργεια ξεκινά με την απόψυξη μιας αμπούλας με κύτταρα τα οποία διατηρούνται σε υγρό άζωτο. Η επαναφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία καλλιέργειας γίνεται άμεσα με την τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 3-5 λεπτά. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται από τις αμπούλες σε πλαστικό σωλήνα με την επιπλέον προσθήκη 9 mL θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1.000 x g (1.500 rpm, φυγόκεντρος Sigma: 3-1 ή MSE:Harrier 18/80) για 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα στο οποίο ήταν διατηρημένα τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Τα κύτταρα υπό την μορφή ιζήματος επαναδιαλύονται σε 10 mL θρεπτικό υλικό και μεταφέρονται σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας, η οποία στη συνέχεια τοποθετείται μέσα στον επωαστικό θάλαμο.

Τα κύτταρα στις συνθήκες επώασης πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να καλύπτουν την επιφάνεια της φλάσκας. Όταν η επιφάνεια της φλάσκας έχει καλυφθεί σε ποσοστό 90% και πάνω, χρειάζεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (ο αριθμός των κυττάρων σε μια τέτοια φλάσκα είναι περίπου  $3 \ge 10^6$  για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούμε). Για το λόγο αυτό, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 2 mL διαλύματος θρυψίνης για 2 λεπτά, με επώαση στους 37°C. Η θρυψίνη και η βίαιη ανακίνηση της φλάσκας οδηγούν σε αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια. Στη συνέχεια προστίθενται στα κύτταρα 8 mL από νέο θρεπτικό υλικό στους 37°C (τελικός όγκος 10 mL), τα κύτταρα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα και φυγοκεντρούνται στα 1.000 x g (1.500 rpm) για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η θρυψίνη. Στο πλαστικό σωλήνα με το ίζημα των κυττάρων προστίθεται θρεπτικό υλικό (συνήθως 3 mL) και τα κύτταρα αναδιαλύονται καλά με την πιπέττα. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε νέες φλάσκες για να συνεχιστεί η καλλιέργεια ή σε τρυβλία για την εκάστοτε πειραματική διαδικασία: για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούμε, περίπου 1/3 αναδιαλυμένων κυττάρων (δηλαδή 1 mL) τοποθετείται σε μια καινούργια φλάσκα ή τρυβλίο 100 mm, τα οποία περιέχουν 9 mL θρεπτικό υλικό. Η ίδια ποσότητα κυττάρων αραιώνεται με την προσθήκη 5 mL θρεπτικού υλικού και μπορεί να τοποθετηθεί σε 6 τρυβλία διαμέτρου 35 mm ή σε ένα 6well-plate (τελικός όγκος ανά πηγαδάκι 2 mL με επιπλέον προσθήκη 1 mL θρεπτικού υλικού) ή αραιώνεται με 12 mL και μοιράζεται σε 12 πηγαδάκια ενός 12-well-plate (τελικός όγκος ανά πηγαδάκι 1 mL). Γενικά, η αραίωση των κυττάρων είναι συνάρτηση

του κυτταρικού τύπου, της ταχύτητας ανάπτυξης και του χρόνου που επιθυμούμε να διαρκέσει η καλλιέργεια.

Για τη διατήρηση μιας τράπεζας κυττάρων είναι σκόπιμο να ψύχουμε κύτταρα εκ νέου σε αμπούλες. Τα κύτταρα που πρόκειται να ψυχθούν πρέπει να είναι υγιή και σε φάση πολλαπλασιασμού. Ακολουθώντας τα πρώτα βήματα της παραπάνω διαδικασίας, το αρχικό ίζημα των κυττάρων από μια φλάσκα που χρειάζεται ανακαλλιέργεια επαναδιαλύεται σε διάλυμα ψύξης κυττάρων (περιέχει την κρυοπροστατευτική ουσία DMSO). Το εναιώρημα τοποθετείται σε αμπούλες, οι οποίες ψύχονται βαθμιαία στους - 80°C. Τέλος, οι αμπούλες αποθηκεύονται σε δοχείο με υγρό άζωτο (-196°C, δοχείο Taylor Wharton).

#### 3.1.2.4 Παροδική διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων

Πολλές φορές για να μελετηθεί μια πρωτεΐνη χρειάζεται να εισαχθεί το γονίδιό της σε ένα ζωντανό κύτταρο και να υπερ-εκφραστεί, ώστε να μελετηθούν οι αλλαγές που επέρχονται στις βιοχημικές διαδικασίες και στην εν γένει λειτουργία του κυττάρου. Η διαμόλυνση μπορεί να είναι παροδική, οπότε η έκφραση της πρωτεΐνης διαρκεί μόλις λίγες ώρες, ή μόνιμη (επισωματική), οπότε η έκφραση της πρωτεΐνης διαρκεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

## <u>Διαλύματα και υλικά</u>:

Διάλυμα Opti-MEM (31985-070, Gibco-Invitrogen), δεν περιέχει ορό και αντιβιοτικά Θρεπτικό υλικό: βλ. παράγραφο 3.1.2.2

**Παράγοντες διαμόλυνσης**: Lipofectamine 2000 (11668-019, Invitrogen), FuGENE HD (04709705001, Roche)

**Λοιπά υλικά**: Τρυβλία καλλιεργειών διαμέτρου 100 mm, 6-well plates και 12-well plates Πειραματική διαδικασία:

Διαμόλυνση HA-RGS4 και HA-ΔNRGS4 για πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης και *in vitro* πρόσδεσης

Για να εκφραστούν σε κύτταρα η πρωτεΐνη HA-RGS4, η ελλειμματική για το αμινοτελικό της άκρο HA-ΔNRGS4, ο μη επισημασμένος μ-OR αρουραίου και να πραγματοποιηθούν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης και *in vitro* πρόσδεσης, έγιναν παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα COS-7, HEK293, myc-HEK ή flag-δ-OR με την χρήση του παράγοντα lipofectamine και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών (5 μg από κάθε πλασμίδιο, 3 μg για τον μ-OR). Οι διαμολύνσεις πραγματοποιούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm που έχουν καλυφθεί κατά 80%-90% από κύτταρα. Για τη διαμόλυνση επί παραδείγματι ενός τρυβλίου διαμέτρου 100 mm κυττάρων HEK293 με το γονίδιο για την HA-RGS4, ακολουθείται η εξής διαδικασία: 5 μg από το φορέα έκφρασης της HA-RGS4 αναμιγνύονται με 500 μL Opti-MEM (Διάλυμα A), ενώ σε άλλο διάλυμα ξεχωριστά αναμιγνύονται 20 μL Lipofectamin 2000 σε 500 μL Opti-MEM (Διάλυμα Β) (Πίνακας 2). Τα δυο διαλύματα επωάζονται ξεχωριστά για 5 λεπτά (και όχι περισσότερο από 25 λεπτά) και στη συνέγεια αναμιγνύονται με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά (τελικός όγκος Διαλύματος Α+Β, 1 mL). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για να δεσμευθεί το πλασμίδιο που φέρει το επιθυμητό γονίδιο στην λιπόφιλη lipofectamine, η οποία είναι και ο παράγοντας που θα μεταφέρει το DNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην συνέχεια απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα που βρίσκονται στο τρυβλίο (10 mL) και τα κύτταρα ξεπλένονται με 5 mL διαλύματος Opti-MEM δυο φορές. Στο τρυβλίο προστίθενται 4-5 mL διαλύματος Opti-MEM και ακολούθως το Διάλυμα A+B, έτσι ώστε στο τρυβλίο να περιέχονται 5-6 mL τελικού διαλύματος. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο καλλιέργειας για 5-7 ώρες, το διάλυμα απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με 5 mL από διάλυμα Opti-MEM δυο φορές και προστίθενται τελικά στα κύτταρα 10 mL θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων. Τα κύτταρα είναι έτοιμα προς κατεργασία και μελέτη 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

# Διαμόλυνση RGS4-GFP και HA-RGS4 για πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας

Για να εκφραστούν σε κύτταρα οι πρωτεΐνες RGS4-GFP και HA-RGS4 και να πραγματοποιηθούν πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας, έγιναν παροδικές διαμολύνσεις σε κύτταρα ΕΕ-ΗΕΚ, myc-HEK και flag-δ-OR με την χρήση του παράγοντα FuGENE και τους παραπάνω φορείς έκφρασης της RGS4, απευθείας σε κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε 12-well plates. Στα 12-well plates τοποθετούνται καλυπτρίδες σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στην παράγραφο 3.3.11, και στη συνέχεια καλλιεργούνται τα κύτταρα στα πηγαδάκια με 1 mL θρεπτικό με ορό μέχρι πληρότητας (confluency) περίπου 50-60%. Στη συνέχεια, για κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου, τοποθετούνται σε σωληνάκι Eppendorf 50 μL διαλύματος Opti-MEM και 1 μg του φορέα HA-RGS4 ή RGS4-GFP (Διάλυμα Α, Πίνακας 2). Μετά την ανάδευση του διαλύματος προστίθενται σε αυτό 4 μL FuGENE (Διάλυμα Β) για κάθε πηγαδάκι (η αναλογία FuGENE:DNA είναι η αντίστοιχη της αναλογίας 8:2 που προτείνει η εταιρεία) και το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μL από το μίγμα διαμόλυνσης σε κάθε πηγαδάκι του 12-well plate που περιέχει κύτταρα με 1 mL θρεπτικό διάλυμα με ορό. Μετά από 24 ώρες, το θρεπτικό που περιέχει και το μίγμα διαμόλυνσης αφαιρείται και προστίθεται νέο θρεπτικό με ορό (1 mL/πηγαδάκι). Μετά από άλλες 24 ώρες τα κύτταρα είναι έτοιμα για κατεργασία, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.11.

Είδος πειράματος	Μέσο	Διάλυμα Α	Διάλυμα Β	
	καλλιέργειας			
Συν- ανοσοκατακρήμνιση, <i>in</i> <i>vitro</i> pulldown πρόσδεση	Τρυβλίο διαμέτρου 100 mm	5 μg φορέα έκφρασης (3 μg για τον μ-OR) σε 500 μL Opti-MEM	20 μL Lipofectamine σε 500 μL Opti-MEM	
Μικροσκοπία	12-well plates	1 μg φορέα έκφρασης σε 50 μL Opti-MEM	Διάλυμα Α + 4 μL FuGENE	
φθορισμού και συνεστιακή	Τρυβλίο διαμέτρου 100 mm	10 μg φορέα έκφρασης σε 500 μL Opti-MEM	Διάλυμα Α + 40 μL FuGENE	
Μέτρηση συσσώρευσης cAMP	Τρυβλίο διαμέτρου 100 mm	5 μg φορέα έκφρασης σε 500 μL Opti-MEM	20 μL Lipofectamine σε 500 μL Opti-MEM	
Προσδιορισμός pERK1,2	Τρυβλίο διαμέτρου 100 mm 6-well plate	<ul> <li>5 μg φορέα έκφρασης</li> <li>σε 500 μL Opti-MEM</li> <li>2 μg φορέα έκφρασης</li> <li>σε 100 μL Opti-MEM</li> </ul>	<ul> <li>20 μL</li> <li>Lipofectamine σε</li> <li>500 μL Opti-MEM</li> <li>Διάλυμα A + 8 μL</li> <li>FuGENE</li> </ul>	

Πίνακας 2. Απεικόνιση των διαλυμάτων διαμόλυνσης και των ποσοτήτων των διαφόρων ουσιών για κάθε είδους πειράματος, όπου απαιτείται εξωγενής έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα.

Εναλλακτικά, η διαμόλυνση των κυττάρων για τα πειράματα μικροσκοπίας μπορεί να γίνει σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm και στη συνέχεια τα κύτταρα να μοιραστούν σε προετοιμασμένα 12-well plates που περιέχουν καλυπτρίδες. Για αυτήν την διαδικασία, αρχικά αναμιγνύονται σε πλαστικό σωληνάκι 10 μg HA-RGS4 ή RGS4-GFP με 500 μL Opti-MEM για κάθε τρυβλίο που πρόκειται να διαμολυνθεί (Διάλυμα Α, Πίνακας 2). Στη συνέχεια προστίθενται στο μίγμα 40 μL FuGENE (Διάλυμα Β) για κάθε τρυβλίο (αντίστοιχη αναλογία 8:2 του πρωτοκόλλου της εταιρείας) και μετά από ανάδευση το μίγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθως, 500 μL από το μίγμα διαμόλυνσης προστίθενται σε κάθε τρυβλίο που περιέχει κύτταρα με 10 mL θρεπτικό με ορό και τα κύτταρα αναπτύσσονται για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα αφαιρείται το θρεπτικό που περιέχει και το μίγμα διαμόλυνσης, τα κύτταρα σηκώνονται με νέο θρεπτικό (πίεση με την πιπέττα) και μοιράζονται σε 12-well plates (αραίωση 1:1 – 1:3, ανάλογα με την πληρότητα στο αρχικό τρυβλίο). Μετά από άλλες 24 ώρες ακολουθεί η κατεργασία των κυττάρων.

# Διαμόλυνση HA-RGS4 και HA-ΔNRGS4 για πειράματα μέτρησης συσσώρευσης ενδοκυτταρικού cAMP

Στην περίπτωση της μελέτης συσσώρευσης του cAMP στα κύτταρα, η διαμόλυνση γίνεται όπως και στην περίπτωση της διαμόλυνσης για συν-ανοσοκατακρήμνιση με την εξής διαφορά: Τα κύτταρα που διαμολύνονται είναι ΕΕ-ΗΕΚ και μετά το τέλος των 5-7 ωρών του τελευταίου σταδίου της διαμόλυνσης με Lipofectamine, το διάλυμα Opti-MEM που περιέχει και το μίγμα διαμόλυνσης αφαιρείται, τα κύτταρα ξεπλένονται προσεκτικά μια μόνο φορά με Opti-MEM και στη συνέχεια προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό με ορό. Τα κύτταρα ανασηκώνονται με την πίεση του θρεπτικού από την πιπέττα και μοιράζονται σε 12-well plates (1 τρυβλίο μοιράζεται σε 1½ 12-well plates). Την επόμενη μέρα προστίθεται η ραδιενεργή αδενίνη και μετά από άλλες 24 ώρες ακολουθεί κατεργασία των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.2.

# Διαμόλυνση HA-RGS4 και HA-ΔNRGS4 για τα πειράματα μέτρησης των φωσφορυλιωμένων ERK1,2

Στην περίπτωση των πειραμάτων προσδιορισμού των φωσφορυλιωμένων ERK1,2, η διαμόλυνση γίνεται όπως και στην περίπτωση της διαμόλυνσης για συν-
ανοσοκατακρήμνιση με την εξής διαφορά: μετά το τέλος των 5-7 ωρών του τελευταίου σταδίου της διαμόλυνσης με Lipofectamine, το διάλυμα Opti-MEM που περιέχει και το μίγμα διαμόλυνσης αφαιρείται, τα κύτταρα ξεπλένονται προσεκτικά μια μόνο φορά με Opti-MEM και στη συνέχεια προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό με ορό. Τα κύτταρα ανασηκώνονται με την πίεση του θρεπτικού από την πιπέττα και μοιράζονται σε 6-well plates (1 τρυβλίο μοιράζεται σε δυο 6-well plates).

Εναλλακτικά, η διαμόλυνση των κυττάρων για τον προσδιορισμό των φωσφορυλιωμένων ERK1,2 μπορεί να γίνει απευθείας σε 6-well plates: Κύτταρα myc-HEK ή flag-δ-OR καλλιεργούνται στα πηγαδάκια με 2 mL θρεπτικό με ορό μέχρι πληρότητας 80-90%. Στη συνέχεια, για κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου, τοποθετούνται σε σωληνάκι Eppendorf 100 μL διαλύματος Opti-MEM και 2 μg του φορέα HA-RGS4 ή HA-ΔNRGS4 (Διάλυμα Α, Πίνακας 2). Μετά την ανάδευση του διαλύματος προστίθενται σε αυτό 8 μL FuGENE (Διάλυμα Β) για κάθε πηγαδάκι (αναλογία FuGENE:DNA αντίστοιχη με 8:2 που προτείνει η εταιρεία) και το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 100 μL από το μίγμα διαμόλυνσης σε κάθε πηγαδάκι του 6-well plate που περιέχει κύτταρα με 2 mL θρεπτικό διάλυμα με ορό. Μετά από 24 ώρες, το θρεπτικό που περιέχει και το μίγμα διαμόλυνσης αφαιρείται και προστίθεται νέο θρεπτικό με ορό (2 mL/πηγαδάκι). Μετά από άλλες 24 ώρες τα κύτταρα είναι έτοιμα για κατεργασία, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.10.

# 3.2 Μοριακές μέθοδοι

# 3.2.1 Χειρισμός και κατεργασία DNA

# 3.2.1.1 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από βακτήρια

Διαλύματα και υλικά:

**LB**: βλ. παράγραφος 3.1.1.1

**Διάλυμα GET**: 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8, + 25 μg/mL

RNAase A (προστίθεται λίγο πριν το πείραμα)

Διάλυμα S2: 0,2 N NaOH, 1% κ.ο. SDS, πάντα φρέσκο

Διάλυμα S3: 3 Μ οξικό κάλιο, 11,8 % κ.ο. οξικό οξύ

Διάλυμα EB: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

Αντιβιοτικά: αμπικιλλίνη 100 mg/mL, καναμυκίνη 100 mg/mL

**Λοιπά υλικά**: γλυκερόλη 100%, ισοπροπανόλη 100%, αιθανόλη 75%, 10 mg/mL RNAase A

# <u>Πειραματική διαδικασία</u>:

Από τα τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό όπου εμβολιάστηκαν τα μετασχηματισθέντα με το επιθυμητό πλασμίδιο βακτηριακά κύτταρα (Παράγραφος 3.1.1.3), απομακρύνουμε με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας κύτταρα από μια αποικία. Στη συνέχεια η οδοντογλυφίδα τοποθετείται σε 5 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB, παρουσία αμπικιλλίνης (100 μg/mL) ή καναμυκίνης (30 μg/mL), και τα κύτταρα επωάζονται υπό ανακίνηση στους 37°C για 16-20 ώρες ώστε να πολλαπλασιαστούν. 500 μL από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου Eppendorf όπου προστίθενται 300 μL γλυκερόλη 100%. Στη συνέχεια αυτά τα κύτταρα τοποθετούνται στους -20 °C για 1 ώρα και μεταφέρονται στους -80°C ώστε να υπάρχει αποθηκευμένο απόθεμα για μελλοντική χρήση (glycerol stock). Από τα υπόλοιπα 4,5 mL μπορεί να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA.

Στην συγκεκριμένη διατριβή τα πλασμίδια απομονώθηκαν είτε με πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης είτε με την χρήση των QIAprep Spin Miniprep Kit (27104) και Plasmid Midi Kit (12143) της QIAGEN ή του PlasmidMAX DNA Isolation Kit (PMX51050) της EPICENTRE Biotechnologies, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία απομόνωσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης έχει ως εξής:

Το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων (4,5 mL) φυγοκεντρείται στα 1.300 x g (4.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf 5415C) για 5-10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα διαλύεται σε 400 μL διαλύματος GET, στο οποίο έχει προστεθεί RNAase A σε τελική συγκέντρωση 25 µg/mL. Το νέο εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάκι Eppendorf, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτό 200 μL διαλύματος S2. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά με το χέρι και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου όχι παραπάνω από 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται σε αυτό 200 μL διαλύματος S3, γίνεται ήπια ανάδευση με το χέρι και το διάλυμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000 x g (13.000 rpm) για 15-20 λεπτά, συλλογή του υπερκειμένου, που περιλαμβάνει το πλασμιδιακό DNA, και τοποθέτηση σε νέο σωληνάκι. Εν συνεχεία, προστίθεται ίσος όγκος (~800 μL) καθαρής ισοπροπανόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 14.000 x g (13.000 rpm) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το πλασμιδιακό ίζημα ξεπλένεται με 800 μL αιθανόλης 75% κ.ο. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 14.000 x g (13.000 rpm) με μέγιστο χρόνο τα 10 λεπτά και αφαίρεση της υπερκείμενης αιθανόλης. Τέλος αφήνουμε τα δείγματα στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά το πολύ, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη, αποφεύγοντας να στεγνώσει τελείως το πλασμιδιακό DNA. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος EB ή δισαπεσταγμένο H<sub>2</sub>O (30-50 μL) με ήπια αναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA. Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA προσδιορίζεται και το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

Η διαδικασία απομόνωσης με τη χρήση του QIAprep Spin Miniprep Kit και του PlasmidMAX DNA Isolation Kit βασίζεται στις ίδιες αρχές της αλκαλικής λύσης, όμως το κιτ της QIAGEN διαφέρει στα τελικά στάδια απομόνωσης του DNA, όπου το DNA δεσμεύεται και εκλούεται σε ειδική κολώνα που περιέχει διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) (βλ. οδηγίες κατασκευαστή). Σε περίπτωση που είναι απαραίτητο να απομονωθεί πλασμιδιακό DNA σε μεγαλύτερη ποσότητα, 500 mL θρεπτικού υλικού LB εμβολιάζονται με τα 4,5 mL της αρχικής καλλιέργειας παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, και τα βακτήρια καλλιεργούνται για περίπου 4 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση. Η απομόνωση πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο, με το Plasmid Midi Kit της QIAGEN χρησιμοποιώντας μεγαλύτερους όγκους διαλυμάτων και κολώνες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

## 3.2.1.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας πλασμιδιακού DNA

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (O.D.) του διαλύματος στα μήκη κύματος 260 και 280 nm. Ποσότητες 1 μL και 5 μL από το διάλυμα DNA αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 mL (αραίωση 1:1.000 και 1:200 αντίστοιχα) και μετριέται η οπτική απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο. Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm προσδιορίζει τη συγκέντρωση του DNA στο δείγμα (οπτική απορρόφηση στα 260 nm προσδιορίζει τη συγκέντρωση 50 μg/ml δίκλωνου DNA), ενώ η απορρόφηση στα 280 nm προσδιορίζει τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης που υπάρχει ως πρόσμιξη στο δείγμα. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης, πολλαπλασιάζεται η οπτική απορρόφηση με την αραίωση του δείγματος και τον όρο 50 μg/mL, ενώ για τον υπολογισμό της καθαρότητας του DNA προσδιορίζεται ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 nm και τα 280 nm (O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub>). Εάν ο λόγος αυτός υπολογιστεί μεγαλύτερος από 1,8 τότε οι προσμίξεις στο διάλυμα του πλασμιδιακού DNA σε πρωτεΐνες είναι περισσότερες από τις επιτρεπτές. Εναλλακτικά, η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA γίνεται αυτόματα από τη συσκευή ND-1000 Spectrophotometer της Nanodrop.

## 3.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Για να επαληθεύσουμε την απομόνωση του σωστού πλασμιδιακού DNA και να προσδιορίσουμε το Μοριακό Βάρος (Μ.Β.) και την καθαρότητά του, μπορούμε να ηλεκτροφορήσουμε τα DNA δείγματα μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης. Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε επίσης να ταυτοποιήσουμε και να διαχωρίσουμε τμήματα DNA που έχουν πολλαπλασιαστεί με τη μέθοδο της PCR ή που έχουν υποστεί πέψη από περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

## Διαλύματα και υλικά:

Διάλυμα TAE 50x: 2 M Tris-HCl, 0,05 M EDTA, 5,7% κ.ο. οξικό οξύ, pH 8.

**Διάλυμα χρώσης DNA 10x**: 67% κ.ο. σακχαρόζη, 0,4% κ.ο. κυανούν της βρωμοφαινόλης

Λοιπά υλικά: αγαρόζη, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

## Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά δημιουργείται το πήκτωμα αγαρόζης στο καλούπι ειδικής συσκευής από πλεξιγκλάς: σε διάλυμα ΤΑΕ 1x προστίθεται 0,8% κ.ο. αγαρόζη και το διάλυμα ζεσταίνεται για να διαλυθεί η αγαρόζη. Το διάλυμα στη συνέχεια ψύχεται μέχρι λίγο πριν την πήξη και σε αυτό προστίθεται η φθορίζουσα γρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 mg/mL) που ενσωματώνεται στο DNA μεταξύ των βάσεων. Έπειτα τοποθετείται στο καλούπι για να πήξει, μαζί με χτενάκι που θα δημιουργήσει τα πηγαδάκια εισαγωγής των δειγμάτων DNA. Στα δείγματα DNA προστίθεται διάλυμα χρώσης, το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης μέσα σε διάλυμα ΤΑΕ 1x και τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο τάσης 70-120 V για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση του DNA προς την κάθοδο λόγω του αρνητικού του φορτίου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και, λόγω της ενσωμάτωσης του EtBr στο DNA, γίνονται ορατές οι ζώνες του DNA που μπορούν να φωτογραφηθούν. Για να απομονώσουμε συγκεκριμένες ζώνες DNA από το πήκτωμα, αποκόπτουμε με κοπίδι το κομμάτι του πηκτώματος με τη ζώνη και χρησιμοποιούμε το PureLink Quick Gel Extraction Kit της Invitrogen (K2100-12), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## 3.2.1.4 Καθαρισμός DNA με μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου

Για να καθαρίσουμε τα δείγματα DNA από τα πρωτεϊνικά ένζυμα με τα οποία τα χειριζόμαστε (πολυμεράση, ένζυμα πέψης) χρησιμοποιούμε μέθοδο που διαχωρίζει την οργανική από την ανόργανη φάση με τη βοήθεια της φαινόλης ή/και του χλωροφορμίου. Το DNA περιορίζεται στην ανόργανη φάση και με ένα επιπλέον βήμα κατακρήμνισης λαμβάνεται καθαρό και απαλλαγμένο από πρωτεΐνες.

## Διαλύματα και υλικά:

Διάλυμα φαινόλης: φαινόλη εξισορροπημένη με διάλυμα 1 M Tris-HCl, pH 7

Διάλυμα φαινόλης – χλωροφορμίου – ισοαμυλικής αλκοόλης: περιέχει διάλυμα εξισορροπημένης φαινόλης, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1

Διάλυμα οξικού καλίου: 3 M CH<sub>3</sub>COOK, pH 5,2

**Λοιπά υλικά**: αιθανόλη 100%, αιθανόλη 70%, διάλυμα EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 , παράγραφος 3.2.1.1)

#### Πειραματική διαδικασία:

Μετά την αντίδραση PCR ή αντίδραση πέψης των δειγμάτων DNA, αυξάνουμε τον όγκο τους στα 400-500 μL προσθέτοντας δισαπεσταγμένο  $H_2O$ . Στη συνέχεια προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης ή διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίουισοαμυλικής αλκοόλης, αναδεύουμε καλά για 10-15 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε στα 4.000 x g (7.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf, 5415C) για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση απορροφούμε με πιπέττα την επάνω, υδατική φάση, προσέχοντας να μην απορροφήσουμε την ενδιάμεση ή κάτω φάση. Τα δείγματα τοποθετούνται σε νέα σωληνάκια Eppendorf και προστίθεται σε αυτά 1/10 του όγκου τους από διάλυμα οξικού καλίου και 2x του όγκου τους ψυχρή αιθανόλη 100%. Τα δείγματα αναδεύονται με Vortex και τοποθετούνται στους -20°C για 30 λεπτά (ή και μέχρι ολονυκτίως για καλύτερη κατακρήμνιση). Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές (13.000 rpm, 14.000 x g) για 15 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέγεια προσθέτουμε στο ίζημα του DNA ίσο όγκο ψυχρής αιθανόλης 70%, φυγοκεντρούμε σε μέγιστες στροφές για 5-10 λεπτά και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Τα δείγματα αφήνονται στον απορροφητήρα ή σε επωαστή 37°C για να αποξηρανθούν, για 10 λεπτά. Ακολουθεί αναδιάλυση του ιζήματος του DNA σε επιθυμητό όγκο διαλύματος ΕΒ. Εναλλακτικά, ο καθαρισμός του DNA από ένζυμα μπορεί να γίνει με το QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen (28704), στο οποίο γίνεται χρήση κολόνων με διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) που απορροφά και αποδεσμεύει το DNA υπό κατάλληλες συνθήκες.

# 3.2.2 Κατασκευή χιμαιρικών πεπτιδίων

# 3.2.2.1 Κατασκευή των MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών των καρβοξυτελικών άκρων των μ-OR και δ-OR (MBP-μ-CT και MBP-δ-CT)

Για να προσδιορίσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ συγκεκριμένων περιοχών των οπιοειδών υποδοχέων και άλλων πρωτεϊνών, κατασκευάσαμε πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν αυτές τις περιοχές, συντηγμένα με τον επίτοπο MBP (Maltose Binding Protein), ώστε να τα χρησιμοποιήσουμε σε *in vitro* πειράματα πρόσδεσης (pulldown). Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν καρβοξυτελικές αλληλουχίες των μ-OR και δ-OR (Πίνακας 3).

μ-CT	329 SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSTR VRQNTREHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
δ-CT	311 SSLNPVLYAFLDENFKRCFRQLCRAPCGGQEPGSLRR PRQATARERVTACTPSDGPGGGAAA 372

Πίνακας 3. Αμινοξικές αλληλουχίες των μ-CT αρουραίου και δ-CT ποντικού, που επιλέχθηκαν για να συντηχθούν με τον επίτοπο MBP και να δημιουργηθούν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες. Το μήκος της αλληλουχίας του πεπτιδίου του μ-CT είναι 70 αμινοξέα, ενώ αντίστοιχα του δ-CT είναι 62 αμινοξέα

Για τη δημιουργία αυτών των νέων χιμαιρικών πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της κατευθυνόμενης κλωνοποίησης (directional cloning). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τα εντιθέμενα τμήματα DNA (ενθέματα, inserts) και οι πλασμιδιακοί φορείς πέπτονται με δυο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού για να δημιουργηθούν μη συμπληρωματικά κολλητικά άκρα (sticky ends) σε κάθε πλευρά, για κάθε ένα από τα μόρια που υπόκεινται σε πέψη. Αυτό επιτρέπει στο ένθεμα να συνδέεται με το φορέα με συγκεκριμένο προσανατολισμό και αποτρέπει την αυτο-ανασύνδεση του φορέα.

# Πειραματική διαδικασία:

Τα MBP χιμαιρικά πεπτίδια παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ως καλούπι το cDNA των μ- και δ- υποδοχέων αρουραίου και ποντικού αντίστοιχα και ως φορέα έκφρασης το πλασμίδιο pMAL-c2E, που χρησιμοποιείται για αμινοτελική έκφραση του επιτόπου MBP σε πεπτίδια (για χάρτη pMAL-c2E βλ. Παράρτημα, Σχήμα 49). Με την μέθοδο PCR πολλαπλασιάστηκαν οι αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (Πίνακας 4).

MBP-µ-CT	Πρόσθιος εκκινητής	5'ACGC <mark>GAATTC</mark> AGCTGCCTGAATCC AGTTCTTC 3'
	Ανάστροφος εκκινητής	5'ACTT <mark>GGATCC</mark> TTAGGGCAATGGAG CAGTTTC 3'
МВР-б-СТ	Πρόσθιος εκκινητής	5'ACGC <mark>GAATTC</mark> AGCAGCCTCAACCC GGTTCTCTAC 3'
	Ανάστροφος εκκινητής	5'ACGC <mark>GGATCC</mark> TCAGGCGGCAGCGC CACCG 3'

Πίνακας 4. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών τμημάτων με τη μέθοδο της PCR αντίδρασης

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, στο 5' άκρο των πρόσθιων εκκινητών συμπεριλήφθηκε μια θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (GAATTC). Στο 5' άκρο των ανάστροφων εκκινητών συμπεριλήφθηκε η θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI (GGATCC) καθώς και τα κωδικόνια λήξης TTA και TCA (συμπληρωματικά για UAA και UGA αντίστοιχα). Δίπλα από τις περιοχές αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστέθηκαν τέσσερα νουκλεοτίδια έτσι ώστε να διευκολυνθεί η πέψη από τα παραπάνω περιοριστικά ένζυμα. Η αντίδραση PCR καθώς και οι συνθήκες περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1x (10 mM Tris-HCl,
	50 mM KCl, pH 8,3 στους 25°C)
Taq πολυμεράση	1,5 μονάδες
DNA	100 ng
Πρόσθιος εκκινητής (10	0,4 μM
pmol/μL ή 10 μM)	
Ανάστροφος εκκινητής	0,4 μM
(10 pmol/μL ή 10 μM)	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 mM
dNTPs (10 mM anó to	0,2 mM από το καθένα
καθένα)	

**Πίνακας 5.** Αντίδραση PCR για την παρασκευή των MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 94°C για 4 λεπτά για την αρχική αποδιάταξη, (94°C για 30 sec αποδιάταξη, 55°C σύνδεση εκκινητών για 15 sec, 72°C επέκταση για 15 sec) για 25 κύκλους, 72°C για 5 λεπτά για την τελική επέκταση, 4°C για λήξη της αντίδρασης.

Τα πολλαπλασιασμένα τμήματα (ενθέματα, inserts) καθώς και ο πλασμιδιακός φορέας pMAL-c2E υποβλήθηκαν σε διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI (R0101, NEB) και BamHI (R0136, NEB) (ο φορέας διαθέτει αλληλουχίες αναγνώρισης των ίδιων περιοριστικών ενζύμων) για να αποκτήσουν κολλητικά άκρα, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται στον Πίνακα 6.

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Διάλυμα EcoRI 10x	1x (100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,025% Triton X-100, pH 7,5 στους 25°C)
DNA	1 μg
Ένζυμο EcoRI	4 μονάδες
Ένζυμο BamHI	4 μονάδες

**Πίνακας 6**. Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα των ενθεμάτων του μ-CT και δ-CT, καθώς και του φορέα pMAL-c2E. Η πέψη του DNA έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες

Μετά από πέψη των προϊόντων της PCR και του πλασμιδιακού φορέα από τα προαναφερθέντα ένζυμα, ακολούθησε διαδικασία καθαρισμού του DNA από τα ένζυμα περιορισμού και τα μικρά τμήματα DNA που προέκυψαν. Στη συνέχεια έγινε αντίδραση σύνδεσης (ligation) έτσι ώστε να εισαχθούν τα πολλαπλασιασμένα τμήματα στον πλασμιδιακό φορέα pMAL-c2E (Πίνακας 7).

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα	1x (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ATP,
λιγάσης 10x	10 mM Dithiothreitol, 25 μg/mL BSA, pH 7,5 στους 25°C)
Φορέας pMAL-c2E	200 ng
Πολλαπλασιασμένα	20 ng
τμήματα (inserts)	
Τ4 Λιγάση (NEB)	400 μονάδες
ATP 10 mM	1 mM

**Πίνακας 7.** Αντίδραση λιγάσης για την εισαγωγή των ενθεμάτων των μ-CT, δ-CT στον φορέα pMAL-c2E. Η αναλογία μορίων φορέα: insert είναι 1:3,5 (μέγεθος φορέα 6,65 Kbp, μέγεθος insert ~200 bp). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 14°C για 16 ώρες.

Τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης μετασχηματίσθηκαν σε κύτταρα XL1 blue και εμβολιάστηκαν τρυβλία με άγαρ που περιέχουν 100 μg/mL αμπικιλλίνη. Από τα τρυβλία επιλέχθηκαν τυχαίες αποικίες μετά από 16 ώρες ανάπτυξης σε επωαστικό θάλαμο 37°C. Οι αποικίες αυτές τοποθετήθηκαν σε 5 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 80 μg/mL αμπικιλλίνη και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (όπως περιγράφεται στην παράγραφο επιβεβαίωση της παρουσίας του 3.2.1.1). ενώ n επιθυμητού ενθέματος πραγματοποιήθηκε 1) με πέψη των νέων πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα και προσδιορισμό του νέου MB τους, 2) με πολλαπλασιασμό με αντίδραση PCR των τμημάτων που ενθέσαμε σε κάθε φορέα (με τους εκκινητές στον Πίνακα 4) και διαχωρισμό – εντοπισμό τους σε gel αγαρόζης, 3) με αυτοματοποιημένη ανίχνευση της αλληλουγίας των νουκλεοτιδίων (dideoxynucleotide sequencing) γρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον γενικής χρήσεως M13 με αλληλουχία 5' TGTAAAACGACGGCCAGT 3', θέση αναγνώριση του οποίου υπάρχει στον φορέα.

# 3.2.2.2 Κατασκευή των GST χιμαιρικών πρωτεϊνών της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού άκρου των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων (δ-i3L, μ-CT, δ-CT)

Τα χιμαιρικά πεπτίδια των συντηγμένων πρωτεϊνών της S-μεταφοράσης της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferase, GST) που αντιστοιχούν στα καρβοξυτελικά άκρα, περιλαμβάνουν τα ίδια τμήματα των υποδοχέων, όπως και τα αντίστοιχα χιμαιρικά τμήματα με MBP. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ένα GST-χιμαιρικό πεπτίδιο για την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του δ-OR (Πίνακας 8).

δ-i3L	239 RLRSVRLLSGSKEKDRSLRRITR 261
μ-CT	329 SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSTR VRQNTREHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
δ-CT	311 SSLNPVLYAFLDENFKRCFRQLCRAPCGGQEPGSLRR PRQATARERVTACTPSDGPGGGAAA 372

**Πίνακας 8.** Αμινοξικές αλληλουχίες των τμημάτων της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς του δ-OR (δi3L) και των καρβοξυτελικών άκρων του μ-OR και δ-OR (μ-CT και δ-CT), που θα συντηχθούν με τον επίτοπο GST για να δημιουργηθούν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες

### Πειραματική διαδικασία:

Οι χιμαιρικές κατασκευές της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς του δ-OR (αμινοξέα 239-261, δ-i3L) και των καρβοξυτελικών άκρων των μ- και δ-OR (αμινοξέα 329-398, μ-CT και αμινοξέα 331-372, δ-CT αντίστοιχα), οι οποίες φέρουν την αλληλουχία GST στο αμινοτελικό τους άκρο, κατασκευάστηκαν από cDNA κλώνους του δ-OR ποντικού και του μ-OR αρουραίου. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια παρήχθησαν με τη διαδικασία κλωνοποίησης TOPO της Invitrogen. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιεί το ένζυμο τοποϊσομεράση Ι του ιού της δαμαλίτιδας. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pENTR/D-TOPO, ενώ οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των DNA αλληλουχιών με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (μέθοδος PCR) ήταν οι εξής (Πίνακας 9):

δ-i3L	Πρόσθιος εκκινητής	5' CACCCGCCTGCGCAGCGT 3'
	Ανάστροφος εκκινητής	5' CTAGCGCGTGATGCGCCGCAG 3'
μ-CT	Πρόσθιος εκκινητής	5' CACCAGCTGCCTGAATCCAGTTCTTTAC 3'
	Ανάστροφος εκκινητής	5' TTAGGGCAATGGAGCAGTTTCTGCCTC 3'
δ-CT	Πρόσθιος εκκινητής	5' CACCAGCAGCCTCAACCCGGTTCTCTA 3'
	Ανάστροφος εκκινητής	5' TCAGGCGGCAGCGCCACC 3'

Πίνακας 9. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών τμημάτων με τη μέθοδο της PCR αντίδρασης

Τα κλωνοποιημένα τμήματα μεταφέρθηκαν από τους φορείς εισόδου στους φορείς προορισμού pDest-15, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την έκφραση πρωτεϊνών συντηγμένων με τον επίτοπο GST στο αμινοτελικό τους άκρο, σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*. Η μεταφορά από τους φορείς εισόδου στους φορείς προορισμού γίνεται με τη χρήση της τεχνολογίας του GATEWAY Cloning System (Invitrogen).

# 3.2.2.3 Κατασκευή των GST-χιμαιρικών ελλειμματικών πρωτεϊνών των καρβοξυτελικών άκρων του μ- και δ-OR

Τα ελλειμματικά τμήματα των καρβοξυτελικών άκρων που επιλέχθηκαν και η αμινοξική τους ακολουθία φαίνονται στον Πίνακα 10.

$\Delta C43-\mu$ -CT	329 SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTS 355
$\Delta N27-\mu$ -CT	356 STIEQQNSTRVRQNTREHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
$\Delta C36-\delta-CT$	311 SSLNPVLYAFLDENFKRCFRQLCRAP 336
$\Delta N26-\delta-CT$	337 CGGQEPGSLRRPRQATARERVTACTPSDGPGGGAAA 372

Πίνακας 10. Αμινοξικές αλληλουχίες των τμημάτων των καρβοξυτελικών άκρων του μ-OR και δ-OR, που θα συντηχθούν με τον επίτοπο GST για να δημιουργηθούν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες

# Πειραματική διαδικασία:

Οι DNA αλληλουχίες των ελλειμματικών τμημάτων από τα καρβοξυτελικά άκρα εισήχθησαν με κατευθυνόμενη κλωνοποίηση στον φορέα pGEX 5x3, ο οποίος χρησιμοποιείται για έκφραση του επιτόπου GST στο αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων (για χάρτη pGEX 5x3 βλ. Παράρτημα, Σχήμα 50). Για τον πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν χρησιμοποιήσαμε την τεχνική PCR με καλούπι το cDNA των μ- και δ-OR αρουραίου και ποντικού αντίστοιχα, με τους εξής εκκινητές (Πίνακας 11):

ΔC43-μ-CT	Πρόσθιος εκκιν.	5' ACTG <mark>GGATCC</mark> ACAGCTGCCTGAATCCAGTTC 3'
	Ανάστρ. εκκιν.	5' ACGC <mark>GAATTCTCA</mark> CGAGGTTGGGATGCAGAACT 3'
ΔΝ27-μ-CΤ	Πρόσθιος εκκιν.	5' ACTA <mark>GGATCC</mark> CGTCCACGATCGAACAGCAA 3'
	Ανάστρ. εκκιν.	5' ACGC <mark>GAATTCTTA</mark> GGGCAATGGAGCAGTTTC 3'
ΔС36-δ-СТ	Πρόσθιος εκκιν.	5' ACTG <mark>GGATCC</mark> ACAGCAGCCTCAACCCGGTTC 3'
	Ανάστρ.εκκιν.	5' ACGC <mark>GAATTCTCA</mark> GGGCGTGCGACAGAGCTG 3'
ΔΝ26-δ-CT	Πρόσθιος εκκιν.	5' ATTG <mark>GGATCC</mark> CCTGCGGCCGCCAAGAACC 3'
	Ανάστρ. εκκιν.	5' ACGC <mark>GAATTCTCA</mark> GGCGGCAGCCCACCG 3'

Πίνακας 11. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών τμημάτων με τη μέθοδο της PCR αντίδρασης

Οι εκκινητές περιλαμβάνουν αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI (GGATCC, πρόσθιος εκκινητής) και EcoRI (GAATTC, οπίσθιος εκκινητής). Στους ανάστροφους εκκινητές προστέθηκε κωδικόνιο λήξης TTA ή TCA (συμπληρωματικά για UAA και UGA αντίστοιχα), ενώ στους πρόσθιους εκκινητές προστέθηκαν δυο νουκλεοτίδια μετά τη θέση του περιοριστικού ενζύμου για να διορθωθεί το πλαίσιο ανάγνωσης. Πριν από τις περιοχές αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστέθηκαν τέσσερα νουκλεοτίδια έτσι ώστε να διευκολυνθεί η πέψη από τα περιοριστικά ένζυμα. Η αντίδραση PCR καθώς και οι συνθήκες περιγράφονται στον Πίνακα 12.

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1x (20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1% Triton X-100, 0.1 mg/mI
	BSA, pH 8,8 στους 25°C)
Pfu πολυμεράση (Fermentas)	2 μονάδες
DNA	30 ng
Πρόσθιος εκκινητής (10 pmol/μL ή 10 μM)	0,6 μΜ
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/μL ή 10 μM)	0,6 μΜ
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	2 mM
dNTPs (10 mM από το καθένα)	0,3 mM από το καθένα

**Πίνακας 12.** Αντίδραση PCR για την παρασκευή των GST-χιμαιρικών ελλειμματικών πρωτεϊνών. Οι συνθήκες της PCR ήταν: 95°C για 5 λεπτά για την αρχική αποδιάταξη, (95°C για 30 sec αποδιάταξη, 44°C σύνδεση εκκινητών για 30 sec, 72°C επέκταση για 30 sec) για 40 κύκλους, 72°C για 7 λεπτά για την τελική επέκταση, 4°C για λήξη της αντίδρασης.

Μετά την αντίδραση PCR τα πολλαπλασιασμένα τμήματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης και το DNA απομονώνεται από το πήκτωμα. Ακολουθεί διπλή πέψη των πολλαπλασιασμένων τμημάτων DNA, αλλά και του φορέα pGEX 5x3 με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και BamHI, ώστε τα τμήματα DNA και ο πλασμιδιακός φορέας να αποκτήσουν κολλητικά άκρα, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται στον Πίνακα 13.

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Διάλυμα EcoRI 10x	1x (100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ,
	0,025% Triton X-100, pH 7,5 στους 25°C)
DNA	1 μg
Ένζυμο EcoRI	5 μονάδες
Ένζυμο BamHI	5 μονάδες

**Πίνακας 13**. Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα των DNA αλληλουχιών των ελλειμματικών πεπτιδίων του μ-CT και δ-CT, καθώς και του φορέα pGEX 5x3. Η πέψη του DNA έγινε σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}$ C για 3 ώρες

Ακολουθεί καθαρισμός του DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο από τα ένζυμα περιορισμού και αντίδραση σύνδεσης για την εισαγωγή των DNA τμημάτων στον πλασμιδιακό φορέα (Πίνακας 14).

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα	1x (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ATP, 10 mM Dithiothraital 25 µg/mL BSA pH 7.5 group 25°C)
	10 μινι Dithiothicitol, 25 μg/μL BSA, pH 7,5 0 00 ζ 25 C)
Ψορεας pGEX 5X3	150 ng
Πολλαπλασιασμένα	25 ng
τμήματα (inserts)	
Τ4 λιγάση (NEB)	400 μονάδες
ATP 10 mM	1 mM

**Πίνακας 14.** Αντίδραση λιγάσης για την εισαγωγή των αλληλουχιών των ελλειματικών μ-CT, δ-CT στον φορέα pGEX 5x3.Η αναλογία μορίων φορέα: insert είναι 1:9 ή 1:12 (μέγεθος φορέα 4,9 Kbp, μέγεθος insert 90 ή 120 bp). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 16°C για 16 ώρες.

Ο ανασυνδιασμένος φορέας μετασχηματίσθηκε σε βακτήρια DH5a, τα οποία εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με άγαρ και αμπικιλλίνη 100µg/mL, από τα οποία επιλέχθηκαν τυχαίες αποικίες. Τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν σε 5 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 100µg/mL αμπικιλλίνη και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ενώ η επιβεβαίωση της παρουσίας του επιθυμητού ενθέματος πραγματοποιήθηκε 1) με πέψη των νέων πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα και προσδιορισμό νέας ζώνης που παρατηρείται σε ηλεκτροφόρηση DNA, 2) με αυτοματοποιημένη ανίχνευση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον pGEX Fwd primer (ή 5' pGEX Sequencing Primer) με αλληλουχία 5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'.

# 3.2.2.4 Παρασκευή της ελλειμματικής στο αμινοτελικό άκρο RGS4 (ΔNRGS4) πρωτεΐνης

Για να εκφράσουμε σε κύτταρα θηλαστικών την ελλειμματική μορφή της ανθρώπινης RGS4 πρωτεΐνης από την οποία λείπουν τα 57 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού της άκρου (ΔNRGS4), εφαρμόσαμε τη μέθοδο της κατευθυνόμενης κλωνοποίησης. Η ΔNRGS4 επισημάνθηκε στο αμινοτελικό της άκρο με τον επίτοπο αιμαγλουτινίνη (HA, Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με υποδοχείς που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες

αλληλουχία αμινοξέων AYPYDVPDYAS) και η αλληλουχία των αμινοξέων της είναι η εξής (Πίνακας 15):

NH <sub>2</sub> άκρο	1 MCKGLAGLPASCLRSAKDMKHRLGFLLQKSDSCEHNSSHNKKDKV
RGS4	VICQRVSQEEVK 57
∆NRGS4	58 KWAESLENLISHECGLAAFKAFLKSEYSEENIDFWISCEEYKKIKSP SKLSPKAKKIYNEFISVQATKEVNLDSCTREETSRNMLEPTITCFDEAQ KKIFNLMEKDSYRRFLKSRFYLDLVNPSSCGAEKQKGAKSSADCASL VPQCA 205

**Πίνακας 15**: Αμινοξική αλληλουχία της ελλειμματικής ΔNRGS4 και του αμινοτελικού άκρου της RGS4. Η ΔNRGS4 δεν περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο της RGS4 και το μήκος της είναι 148 αμινοξέα. Για την πλήρη νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης RGS4 βλ. Παράρτημα, Σχήμα 53

# Πειραματική διαδικασία:

Για την παρασκευή της HA-ΔNRGS4 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κατευθυνόμενης κλωνοποίησης. Αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του cDNA της RGS4 που μας ενδιαφέρει (Πίνακας 16).

Πρόσθιος εκκινητής	5' CGGC <mark>GGATCC</mark> GAAATGGGCTGAATCACTGGAAAAC 3'	
Ανάστροφος εκκινητής	5' ATAT <mark>GCGGCCGCTTA</mark> GGCACACTGAGGGACCA 3'	

Πίνακας 16: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών τμημάτων με τη μέθοδο της PCR αντίδρασης

Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για την ενίσχυση της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει (Πίνακας 15) με τη μέθοδο της PCR. Περιλαμβάνουν αλληλουχίες για αναγνώριση από περιοριστικά ένζυμα, BamHI για τον πρόσθιο (GGATCC) και NotI για τον ανάστροφο εκκινητή (GCGGCCGC). Στον ανάστροφο εκκινητή περιλαμβάνεται και κωδικόνιο λήξης (TTA), ενώ στον πρόσθιο εκκινητή προστέθηκε ένα νουκλεοτίδιο μετά τη θέση του περιοριστικού ενζύμου για να διορθωθεί το πλαίσιο ανάγνωσης. Πριν από τις περιοχές αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστέθηκαν τέσσερα νουκλεοτίδια έτσι ώστε να διευκολυνθεί η πέψη από τα περιοριστικά ένζυμα. Η αντίδραση PCR καθώς και οι συνθήκες περιγράφονται στον Πίνακα 17.

Αντιδρώντα	Ποσότητα	
Platinum PCR mix	45 μL	
(Invitrogen)		
DNA	450 ng	
Πρόσθιος εκκινητής (10	0,6 µM	
pmol/μL ή 10 μM)		
Ανάστροφος εκκινητής	0,6 µM	
(10 pmol/μL ή 10 μM)		

**Πίνακας 17.** Αντίδραση PCR για την παρασκευή της ΔNRGS4. Οι συνθήκες της PCR ήταν: 94°C για 5 λεπτά για την αρχική αποδιάταξη, (94°C για 30 sec αποδιάταξη, 53°C σύνδεση εκκινητών για 30 sec, 72°C επέκταση για 1 λεπτό) για 30 κύκλους, 72°C για 7 λεπτά για την τελική επέκταση, 4°C για λήξη της αντίδρασης.

Το προϊόν της αντίδρασης PCR υπέστη ηλεκτροφόρηση και απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθησε διπλή πέψη της ενισχυμένης αλληλουχίας και του φορέα pcDNA3-HA (για τον χάρτη του pcDNA3-HA βλ. Παράρτημα, Σχήμα 51), ο οποίος επισημαίνει με τον επίτοπο της αιμαγλουτινίνης (HA) τις πρωτεΐνες στο αμινοτελικό άκρο, με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NotI (R0189, NEB) για να αποκτήσουν κολλητικά άκρα, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται στον Πίνακα 18.

Αντιδρώντα	Ποσότητα		
Διάλυμα BamHI 10x	1x (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1		
	mM Dithiothreitol, pH 7,9 στους 25°C)		
DNA	1 μg		
Ένζυμο BamHI	10 μονάδες		
Ένζυμο NotI	10 μονάδες		

**Πίνακας 18.** Αντίδραση πέψης των DNA αλληλουχιών της ΔNRGS4 και του φορέα pcDNA3-HA. Η πέψη του DNA έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 16 ώρες

Ακολούθησε καθαρισμός του DNA με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου, ώστε να απομακρυνθούν τα ένζυμα που παρεμβαίνουν στις επόμενες διαδικασίες χειρισμού του DNA. Στη συνέχεια γίνεται αντίδραση σύνδεσης με τη βοήθεια της λιγάσης για την εισαγωγή του DNA τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3-HA (Πίνακας 19). Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με υποδοχείς που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10x	1x(40 mM Tris-HCl,10 mM MgCl <sub>2</sub> ,5 mM ATP,10 mM Dithiothreitol, pH 7,8 στους 25°C)
Φορέας pcDNA3-HA	180 ng
Πολλαπλασιασμένο	320 ng
τμήμα	
T4 Λιγάση (Fermentas)	5 μονάδες
ATP 10 mM	1 mM

**Πίνακας 19.** Αντίδραση λιγάσης για την εισαγωγή της αλληλουχίας της ΔNRGS4 στον φορέα pcDNA3-HA.H αναλογία μορίων φορέα: insert είναι 1:20 (μέγεθος φορέα 5,8 Kbp, μέγεθος insert 450 bp). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 16°C για 16 ώρες.

Ο ανασυνδιασμένος φορέας μετασχηματίσθηκε σε βακτήρια DH5a, τα οποία εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με άγαρ παρουσία 100 μg/mL αμπικιλλίνης, από τα οποία επιλέχθηκαν τυχαίες αποικίες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.1.3. Τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν σε 5 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 100 μg/mL αμπικιλλίνης και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ενώ η επιβεβαίωση της παρουσίας του επιθυμητού ενθέματος πραγματοποιήθηκε 1) με πέψη του νέου πλασμιδίου με περιοριστικά ένζυμα και προσδιορισμό νέας ζώνης που παρατηρείται σε ηλεκτροφόρηση DNA, 2) με αυτοματοποιημένη ανίχνευση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον T7 universal primer με αλληλουχία 5' CATACGATTTAGGTGACACTATAG 3', 3) με διαμόλυνση των κυττάρων με την HA-ΔNRGS4, λύση, ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση έναντι του επιτόπου HA.

# 3.2.2.5 Παρασκευή της RGS4 πρωτεΐνης συντηγμένης με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, (RGS4-GFP)

Ολόκληρη η αλληλουχία της ανθρώπινης RGS4 πρωτεΐνης (βλ. Πίνακα 15) επιλέχθηκε για να συντηχθεί με την φθορίζουσα πρωτεΐνη green fluorescent protein (GFP). Με αυτόν τον τρόπο προέκυψε η χιμαιρική πρωτεΐνη RGS4-GFP, η οποία φέρει το πεπτίδιο GFP στο καρβοξυτελικό της άκρο. Σκοπός της παρασκευής της RGS4-GFP είναι να εκφραστεί αυτή η πρωτεΐνη σε ευκαρυωτικά κύτταρα και να παρατηρηθεί η έκφρασή της στο σύνολο του κυττάρου με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού, αλλά

και να προσδιοριστεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός της με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας.

### Πειραματική διαδικασία:

Για την παρασκευή της RGS4-GFP χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κατευθυνόμενης κλωνοποίησης. Αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του cDNA της RGS4 (Πίνακας 20).

Πρόσθιος εκκινητής	5' AGTCCCAGAGATCCCAAAGGGCTTGCAGGTC 3'
Ανάστροφος εκκινητής	5' ATGT <mark>GGATCC</mark> GGCACACTGAGGGACCAG3'

Πίνακας 20. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών τμημάτων με τη μέθοδο της PCR αντίδρασης

Οι εκκινητές του πίνακα 20 χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της αλληλουχίας της RGS4 από το πλασμίδιο της HA-RGS4 με τη μέθοδο της PCR. Περιλαμβάνουν αλληλουχίες για αναγνώριση από περιοριστικά ένζυμα, XhoI για τον πρόσθιο (CTCGAG) και BamHI για τον ανάστροφο εκκινητή (GGATCC), ενώ στον πρόσθιο εκκινητή περιλαμβάνεται και κωδικόνιο έναρξης (ATG). Πριν από τις περιοχές αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστέθηκαν τέσσερα νουκλεοτίδια ώστε να διευκολυνθεί η πέψη από τα περιοριστικά ένζυμα. Η αντίδραση PCR περιγράφεται στον Πίνακα 21.

Αντιδρώντα	Ποσότητα
Platinum PCR mix (Invitrogen)	45 μL
DNA	600 ng
Πρόσθως εκκινητής (10 pmol/μL ή 10 μM)	0,6 μΜ
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/μL ή 10 μM)	0,6 μΜ

**Πίνακας 21.** Αντίδραση PCR για την ενίσχυση της cDNA αλληλουχίας της RGS4 και την κατασκευή της RGS4-GFP συντηγμένης πρωτεΐνης. Οι συνθήκες της PCR ήταν: 94°C για 5 λεπτά για την αρχική αποδιάταξη, (94°C για 30 sec αποδιάταξη, 55°C σύνδεση εκκινητών για 30 sec, 72°C επέκταση για 1 λεπτό) για 32 κύκλους, 72°C για 7 λεπτά για την τελική επέκταση, 4°C για λήξη της αντίδρασης

Μετά την αντίδραση PCR και καθαρισμό με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου, ακολούθησε διπλή πέψη των ενισχυμένων αλληλουχιών και του φορέα pEGFP-N1 (για τον χάρτη του pEGFP-N1 βλ. Παράρτημα, Σχήμα 52), ο οποίος επισημαίνει με την πρωτεΐνη GFP τα πεπτίδια στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Clontech Laboratories, Inc.), με τα ένζυμα περιορισμού XhoI (R0146) και BamHI για να αποκτήσουν κολλητικά άκρα, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφεται στον Πίνακα 22.

Αντιδρώντα	Ποσότητα	
Διάλυμα BamHI 10x	1x (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1	
	mM Dithiothreitol, pH 7,9 στους 25°C)	
DNA	1 μg	
Ένζυμο BamHI	5 μονάδες	
Ένζυμο XhoI	5 μονάδες	

**Πίνακας 22.** Αντίδραση πέψης των DNA αλληλουχιών της RGS4 και του φορέα pEGFP-N1. Η πέψη του DNA έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2,5 ώρες

Ακολούθησε καθαρισμός του DNA από τα ένζυμα περιορισμού (μέθοδος φαινόληςχλωροφορμίου), και αντίδραση σύνδεσης για την εισαγωγή των DNA τμημάτων στον πλασμιδιακό φορέα (Πίνακας 23).

Αντιδρώντα	Ποσότητα		
Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10x	1x(40 mM Tris-HCl,10 mM MgCl <sub>2</sub> ,5 mM ATP, $10$ mM Dithiothreitol, pH 7,8 otoug 25°C)		
Φορέας pEGFP-N1	400 ng		
Πολλαπλασιασμένο τμήμα	150 ng		
T4 Λιγάση (Fermentas)	5 μονάδες		
ATP 10 mM	1 mM		

**Πίνακας 23.** Αντίδραση λιγάσης για την εισαγωγή της αλληλουχίας της RGS4 στον φορέα pEGFP-N1. Η αναλογία μορίων φορέα : insert είναι 1:5,6 (μέγεθος φορέα 4,7 Kbp, μέγεθος insert 620 bp). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους  $16^{\circ}$ C για 16 ώρες.

Ο ανασυνδυασμένος φορέας μετασχηματίσθηκε σε βακτήρια DH5a, τα οποία εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με άγαρ παρουσία καναμυκίνης (30 μg/mL), από τα οποία επιλέχθηκαν τυχαίες αποικίες. Τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν σε 5 mL υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία καναμυκίνης σε τελική συγκέντρωση 30 μg/mL και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ενώ η επιβεβαίωση της παρουσίας του επιθυμητού ενθέματος πραγματοποιήθηκε 1) με πέψη του νέου πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI και προσδιορισμό της νέας ζώνης που παρατηρείται σε ηλεκτροφόρηση DNA (περίπου 600 bp που είναι το cDNA ένθεμα της RGS4), 2) με αυτοματοποιημένη ανίχνευση της αλληλουχίας των

νουκλεοτιδίων χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον N-term-pEGFP με αλληλουχία 5' GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG 3' και τον C-term-pEGFP με αλληλουχία 5' GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGG 3', 3) με διαμόλυνση των κυττάρων με την RGS4-GFP και παρατήρηση του πράσινου χρώματος στο μικροσκόπιο φθορισμού, αλλά και με λύση των κυττάρων (για λύση βλ. παράγραφο 3.3.9) και εντοπισμό της RGS4-GFP σε ανοσοαποτύπωμα με αντίσωμα έναντι της RGS4 (Santa Cruz, N-16, 1:250).

# 3.3 Βιοχημικές μέθοδοι

# 3.3.1 Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών

Για να μελετηθούν οι οπιοειδείς υποδοχείς με φαρμακολογικές μεθόδους, είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός τους από τα κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό γίνεται απομόνωση των κυτταρικών μεμβρανών που τους περιέχουν, από τα κύτταρα που τους εκφράζουν. Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των διαφόρων προσδετών των GPCRs μπορεί να μελετηθεί σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες. Οι απομονωμένες μεμβράνες περιέχουν, επίσης, και άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη λειτουργία των υποδοχέων. Είναι σημαντικό να τηρείται αυστηρά η διαδικασία της απομόνωσης των μεμβρανών προς αποφυγή της αλλαγής της στερεοδομής των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

<u>Διαλύματα και υλικά</u>:

PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6 stoug  $25^{\circ}$ C

Διάλυμα απομόνωσης μεμβρανών: 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,5

Λοιπά υλικά: σύριγγες με βελόνες διαμέτρου 25G και 21G

# <u>Πειραματική διαδικασία:</u>

Από ζωντανά κύτταρα (σε καλλιέργεια) που έχουν υποστεί ή όχι κατεργασία (διαμόλυνση, ενεργοποίηση με αγωνιστές κ.α.), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ακολουθεί έκπλυσή τους με 5 mL ψυχρού (4°C) διαλύματος PBS 1x. Η χαμηλή θερμοκρασία (4°C) χειρισμού των κυττάρων και χρήσης των διαλυμάτων είναι

απαραίτητη για την απομόνωση λειτουργικών υποδοχέων στις μεμβράνες. Στα κύτταρα προστίθενται 5 mL διαλύματος PBS 1x, αποκολλώνται με μηγανικό τρόπο από τα τρυβλία και φυγοκεντρούνται σε σωληνάκια Eppendorf στα 750 x g (3.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf 5415C) για 5 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε ψυχρό διάλυμα απομόνωσης μεμβρανών (περίπου 1 mL ανά τρυβλίο) και γίνεται μηχανική λύση των κυττάρων, με τη βοήθεια σύριγγας που διαθέτει βελόνα διαμέτρου 25G. Το πέρασμα του διαλύματος των κυττάρων από τη σύριγγα επαναλαμβάνεται για 20-30 φορές και το παρασκεύασμα φυγοκεντρείται στα 750 x g (3.000 rpm) yia 5  $\lambda$  entá στους 4°C, ώστε να κατακρημνιστούν τα αδιάσπαστα κύτταρα, τα κυτταρικά θραύσματα και οι πυρήνες τους. Στη συνέχεια το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 200.000 x g (μέσος όρος 55.000 rpm, φυγόκεντρος Beckman L8-80M Ultra Centrifuge με κεφαλή 75Ti) για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα των απομονωμένων κυτταρικών μεμβρανών επαναδιαλύεται σε ψυχρό διάλυμα απομόνωσης μεμβρανών (περίπου 100 μL διαλύματος ανά τρυβλίο). Η επαναδιάλυση γίνεται με σύριγγα που διαθέτει βελόνα μεγαλύτερης διαμέτρου (21G) και η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης των μεμβρανικών παρασκευασμάτων προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2). Το μεμβρανικό παρασκεύασμα χωρίζεται σε κλάσματα των 100-200 μL και φυλάσσεται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

# 3.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης σε διάλυμα ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976). Είναι μια χρωματομετρική μέθοδος και βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant blue (G-250) σε πρωτεΐνες. Η ανιονική μορφή της χρωστικής προσδένεται μέσω ασθενών, μη ομοιοπολικών δεσμών σε κατάλοιπα αργινίνης και σε αρωματικά κατάλοιπα της επιφάνειας των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται αναλογικά η απορρόφησή της στα 595 nm, όπου είναι η μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση ενός άγνωστου δείγματος καθορίζεται μετά από σύγκριση με μια σειρά πρωτεϊνικών προτύπων γνωστής συγκέντρωσης που παρουσιάζουν ένα προφίλ γραμμικής απορρόφησης, το οποίο μπορεί να αποτυπωθεί με μια καμπύλη αναφοράς πρώτης τάξης. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται συνηθέστερα για την δημιουργία των πρότυπων συγκεντρώσεων είναι η αλβουμίνη ορού βοός (BSA). Η μέθοδος δεν επηρεάζεται από κατιόντα, υδατάνθρακες ή άλλους παράγοντες, όπως είναι η σουκρόζη, η ουρία, η γλυκερόλη. Παρόλα αυτά, απορρυπαντικά όπως το sodium dodecyl sulfate (SDS) και το Triton X-100 σε μεγάλες συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από 0,1%), όπως και τα ισχυρώς βασικά διαλύματα, μπορούν να αλλοιώσουν τις μετρήσεις αυτής της μεθόδου.

#### <u>Διαλύματα</u>:

- Stock διάλυμα: 350 mg χρωστικής Coomassie Blue G-250 (Sigma, B-1131) διαλύεται σε 100 mL 95% αιθανόλη και 200 mL 88% φωσφορικό οξύ. Το διάλυμα αυτό είναι ιδιαίτερα σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου, για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Διάλυμα χρήσης: 15 mL από το stock διάλυμα, 15 mL 88% φωσφορικό οξύ, 7,5 mL 95% αιθανόλη, τα οποία συμπληρώνονται με νερό μέχρι τελικού όγκου 250 mL. Ακολουθεί διήθηση του διαλύματος.

**Πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης**: Διάλυμα αλβουμίνης βοείου ορού (BSA, A6588,0100, AppliChem) σε συγκέντρωση 1 mg/mL.

## <u>Πειραματική διαδικασία</u>

Αρχικά, δημιουργούνται έξι διαδοχικές, γνωστές αραιώσεις από το πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης (1 mg/mL) σε τελικό όγκο 100 μL, που περιλαμβάνουν από 3 μg έως 15 μg αλβουμίνης. Ως «τυφλό» της αντίδρασης χρησιμοποιούμε δείγμα 100 μL που περιέχει μόνο νερό και ακολουθεί προσθήκη 1 mL από το διάλυμα χρήσης σε όλα τα πρότυπα δείγματα. Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση των δειγμάτων, παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φωτομέτρησή τους σε φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Με το «τυφλό» δείγμα ορίζεται η τιμή μηδέν της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο («μηδενισμός» του οργάνου), ενώ από τις τιμές της απορρόφησης των προτύπων και τις σχετικές τιμές γνωστής συγκέντρωσης BSA κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη απορρόφησης ως προς την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των άγνωστων δειγμάτων, γίνεται αραίωση αυτών 1:5 και 1:10 σε τελικό όγκο 100 μL (διπλά δείγματα). Εάν το διάλυμα των αγνώστων δειγμάτων περιέχει απορρυπαντικό, όπως στην περίπτωση του διαλύματος λύσεως κυττάρων (βλ. παράγραφο 3.3.9), τότε γίνεται μεγαλύτερη αραίωση (1:20) για να αποφευχθεί η λανθασμένη μέτρηση λόγω παρεμβολής του απορρυπαντικού Triton X-100 (τελική επιτρεπτή συγκέντρωση μικρότερη από 0,1%). Στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά 1 mL από το διάλυμα χρήσης και γίνεται φωτομέτρηση όπως και στην περίπτωση των προτύπων διαλυμάτων. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης και τις τιμές απορρόφησης των αγνώστων δειγμάτων, υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε μg/μL, λαμβάνοντας υπόψη και την εκάστοτε αραίωση.

# 3.3.3 Έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια

Για να μελετήσουμε τα χαρακτηριστικά και τη δομή-λειτουργία μιας πρωτεΐνης σε πρώτο στάδιο, είναι απαραίτητο να την απομονώσουμε σε καθαρή μορφή σε μεγάλες ποσότητες. Τα βακτήρια μας προσφέρουν ένα εύχρηστο κυτταρικό σύστημα στο οποίο μπορούμε να εκφράσουμε μια ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη, ενώ παρέχουν ευκολίες και για την απομόνωσή της. Η μέθοδος της έκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών από βακτήρια βασίζεται στην επισωματική έκφραση μιας πρωτεΐνης, η οποία είναι συνέχεια του μετασχηματισμού ενός πλασμιδιακού φορέα έκφρασης που περιέχει το cDNA της πρωτεΐνης (βλ. Παράγραφο 3.1.1.3). Ο πλασμιδιακός φορέας περιλαμβάνει επίσης συγκεκριμένους γενετικούς τόπους ώστε να είναι λειτουργικός μέσα σε βακτηριακά κύτταρα.

## 3.3.3.1 Έκφραση GST- και MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών

<u>Διαλύματα και υλικά</u>:

**PBS 1x**: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6 στους 25°C

Column buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 , 200 mM NaCl, 1 mM EDTA

Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων: Διάλυμα PBS που περιέχει 1% Triton X-100 (T6878, Sigma), 0,2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 20 µg/mL

λευπεπτίνης (leupeptin, 1017101, Roche), 20 μg/mL αντιπαΐνης (antipain, A6191, Sigma-Aldrich), 1 ταμπλέτα (ανά 10 mL διαλύματος λύσης) από το μίγμα αναστολέων πρωτεασών Complete Mini, EDTA-free (11836170001, Roche Diagnostics). Στην περίπτωση των MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών, αντί για PBS χρησιμοποιείται column buffer

- **Αναγωγικό διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων (2x SDS Sample buffer ή 2x Laemmli buffer**): 100 mM Tris-HCl, pH 6,8 , 4% κ.ο. SDS, 20% κ.ο. γλυκερόλη, 0,2% κ.ο. κυανό της βρωμοφαινόλης, 200 mM βμερκαπτοαιθανόλη
- Διάλυμα έκπλυσης: PBS 1x, 1% Igepal (Sigma, I-3021). Στην περίπτωση των MBPχιμαιρικών πρωτεϊνών, αντί για PBS χρησιμοποιείται column buffer
- **Λοιπά υλικά**: θρεπτικό υλικό βακτηρίων LB, αντιβιοτικά αμπικιλλίνη και καναμυκίνη 100 mg/mL, διάλυμα αραβινόζης 20%, διάλυμα γλυκόζης 0,2 g/mL, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 0,5 M, διάλυμα 50% σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης (17-0756-01 ή 27-4574-01, Amersham Pharmacia) σε PBS 1x, διάλυμα 50% σφαιριδίων αμυλόζης-αγαρόζης (E8021, NEB) σε column buffer, μηχάνημα υπερήχων UP200S Ultrasonic processor (Hielscher GmbH)

#### Πειραματική διαδικασία:

Από τους θετικούς και επιβεβαιωμένους κλώνους των συντηγμένων, χιμαιρικών πρωτεϊνών που θέλουμε να εκφράσουμε σε βακτήρια (παράγραφος 3.2.2), απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (Παράγραφος 3.2.1.1), με το οποίο έγινε μετασχηματισμός της βακτηριακής σειράς BL21 (DE3) του *E. coli* για να ακολουθήσει έκφραση. Τα BL21 (DE3) είναι κύτταρα που επιτρέπουν πρωτεϊνική έκφραση μεγάλης αποδοτικότητας σε οποιοδήποτε επισωματικό γονίδιο που είναι υπό τον έλεγχο ενός T7 υποκινητή και διαθέτει περιοχή πρόσδεσης ριβοσώματος. Μετά το μετασχηματισμό, επιλέχθηκαν αποικίες BL21 κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό, και τα κύτταρα αυτών των αποικιών αναπτύχθηκαν σε 5 mL θρεπτικό υλικό LB με αντιβιοτικό (βλ. παράγραφο 3.1.1.1) υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Αφού αποθηκεύθηκε glycerol stock από τις νέες καλλιέργειες (500 μL διαλύματος βακτηρίων με 300 μL γλυκερόλης), συνεχίστηκε η επώαση των υπόλοιπων ανεπτυγμένων βακτηρίων (4,5 mL) υπό τις ίδιες συνθήκες σε υγρές καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου θρεπτικού υλικού LB (500 mL) με το αντίστοιχο αντιβιοτικό. Όταν η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (Optical Density, O.D.) των καλλιεργειών στα 600 nm φτάσει την τιμή 0,5-0,6 (επώαση για 3-4 ώρες), τότε γίνεται επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων που βρίσκονται στους μετασχηματισμένους φορείς με τη χρήση του κατάλληλου παράγοντα επαγωγής.

Στην περίπτωση των GST-συντηγμένων πεπτιδίων της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοζυτελικού άκρου των οπιοειδών υποδοχέων, η επαγωγή γίνεται με προσθήκη διαλύματος αραβινόζης σε τελική συγκέντρωση 0,2% και συνέχιση της επώασης στους 37°C για 3-4 ώρες. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της επαγωγής της έκφρασης των επισημασμένων με MBP χιμαιρικών πρωτεϊνών καθώς και των GST ελλειμματικών τμημάτων των καρβοζυτελικών άκρων, η επαγωγή γίνεται με την προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,5 mM και συνέχιση της επώασης στις ίδιες συνθήκες για επιπλέον 3-4 ώρες. Ειδικότερα για την περίπτωση των MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών, προστίθεται επίσης διάλυμα γλυκόζης σε τελική συγκέντρωση 0,2 mg/mL, ώστε να ανασταλεί η παραγωγή ενζύμων έναντι της μαλτόζης από τα βακτήρια. Μετά το πέρας της επαγωγής, το υλικό της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στα 2.600 x g (4.000 rpm, φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή GSA) και το ίζημα των κυττάρων συλλέγεται. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε 20 mL από διάλυμα λύσης βακτηρίων και υπόκειται σε υπερήχους (0,5 Amplitude, κύκλοι υπερήχων των 30 δευτερολέπτων με παύση 30 δευτερολέπτων, ρύθμιση 0,5 sec), ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, το διάλυμα επωάζεται στους 4°C για 1 ώρα έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηρίων, και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 160.000 x g (μέσος όρος 50.000 rpm, σε φυγόκεντρο Beckman L8-80M Ultra Centrifuge με κεφαλή 75Ti) για 1 ώρα στους  $4^{\circ}$ C ώστε να κατακρημνιστούν τα θραύσματα των κυττάρων και άλλα ογκώδη σωματίδια. Το υπερκείμενο, το οποίο περιλαμβάνει το σύνολο των κυτταροπλασματικών βακτηριακών πρωτεϊνών καθώς και την επαγόμενη πρωτεΐνη σε μεγάλο ποσοστό, συλλέγεται και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 50% κ.ο.

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς επαγωγής και της καθαρότητας των GST χιμαιρικών πρωτεϊνών, 1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος επωάζεται με 50 μL διαλύματος 50% σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης σε PBS υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ακινητοποιηθεί στα σφαιρίδια η υπό μελέτη GST-χιμαιρική πρωτεΐνη. Μετά από επαναλαμβανόμενα πλυσίματα (3 φορές) με 500 μL διαλύματος έκπλυσης (για έκπλυση των υπόλοιπων πρωτεϊνών) η GST-χιμαιρική πρωτεΐνη εκλούεται με 30 μL 2x Laemmli buffer. Ακολουθεί περαιτέρω ανάλυση με ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) σε πήκτωμα 12% και ανοσοεντόπιση του GST επιτόπου κατά Western ή/και χρώση με coomassie. Παράλληλα, στην ηλεκτροφόρηση αναλύονται και ακατέργαστα δείγματα βακτηρίων από το στάδιο πριν και μετά την επαγωγή, που προκύπτουν μετά από απευθείας λύση 5 και 10 μL διαλύματος βακτηρίων με αντίστοιχη ποσότητα 2x Laemmli buffer. Αυτό γίνεται για την παρακολούθηση της πορείας επαγωγής των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται και για την επιβεβαίωση της έκφρασης των MBP-χιμαιρικών πρωτεϊνών, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται διάλυμα 50% σφαιριδίων αμυλόζης-αγαρόζης η οποία εξισορροπείται σε column buffer ώστε να ακινητοποιηθεί και απομονωθεί η εκάστοτε MBP-συντηγμένη πρωτεΐνη.

# 3.3.3.2 Έκφραση His-RGS4 και His-4Box

Το cDNA της RGS4 πρωτεΐνης αρουραίου βρίσκεται σε έναν τροποποιημένο πλασμιδιακό φορέα pQE60, ο οποίος τοποθετεί έναν επίτοπο 6xHis στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (MGHHHHHHG-). Η απομόνωση της His-RGS4 έγινε με μικρή τροποποίηση του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Popov et al., 1997.

<u>Διαλύματα και υλικά:</u>

**LB**: 170 mM NaCl (1% κ.ο.), 0,5% κ.ο. εκχύλισμα ζύμης, 1% κ.ο. βακτηριακή τρυπτόνη

- **PBS 1x**: βλ. παράγραφος 3.3.1
- **TBP 5x**: 250 mM Tris, pH 8, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 500 μM PMSF (το PMSF προστίθεται φρέσκο λίγο πριν το πείραμα)
- Διάλυμα λύσης για διαλυτές πρωτεΐνες: TBP 1x, 10 mM ιμιδαζόλιο, 2 ταμπλέτες Complete Mini, EDTA-free, 0,2 mg/mL λυσοζύμη, 10 mg/mL leupeptin και antipain
- Διάλυμα λύσης για αδιάλυτες πρωτέινες: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 8 M ουρία, 100 mM NaCl

- **Διάλυμα ανταλλαγής**: 50 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2ethanesulfonic acid), 5 mM EDTA, 1mM DTT (Dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη), pH 8
- **Λοιπά υλικά**: αντιβιοτικό αμπικιλλίνη 100 mg/mL, IPTG 100 mM, 50% διάλυμα σφαιριδίων Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid), κολώνες συμπύκνωσης (Amicon Ultra-4, UFC8 005 08, Millipore), γλυκερόλη 100%

#### Πειραματική διαδικασία:

Η επαγωγή της πρωτεΐνης ξεκινά από glycerol stock βακτηρίων JM109 που φέρουν το πλασμίδιο της His-RGS4 πρωτεΐνης. Ξύσμα από το glycerol stock τοποθετείται σε 5 mL διαλύματος LB με αντιβιοτικό αμπικιλλίνη τελικής συγκέντρωσης 100 μg/mL και γίνεται επώαση στους 37°C για 16 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια η καλλιέργεια τοποθετείται σε 500 mL θρεπτικού LB με αμπικιλλίνη 100 μg/mL και όταν η O.D.<sub>600</sub>= 0,5 προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,5 mM για να ξεκινήσει η επαγωγή της His-RGS4 πρωτεΐνης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 3,5 ώρες και συλλογή του ιζήματος των βακτηρίων με φυγοκέντρηση, αναδιάλυση σε PBS 1x και νέα συλλογή του ιζήματος σε δυο σωληνάκια των 50 mL μετά από φυγοκέντρηση (συνθήκες φυγοκέντρησης ίδιες με 3.3.3.1). Αφού υπολογίζουμε με ζύγιση το βάρος του ιζήματος στα σωληνάκια, προσθέτουμε 5 mL διαλύματος λύσης ανά γραμμάριο ιζήματος βακτηρίων και αναδιαλύουμε το ίζημα με vortex. Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος στους 4°C, σε περιστρεφόμενο τροχό για 1 ώρα και θραύση των βακτηριακών κυττάρων με υπερήγους (sonication) για 3 λεπτά συνολικά (κύκλοι 30 δευτερόλεπτα υπέρηγοι – 30 δευτερόλεπτα παύση, amplitude 70%, ρύθμιση χρόνου 0,7 sec) σε πάγο. Στη συνέχεια γίνεται νέα ανάδευση σε περιστρεφόμενο τροχό για 30 λεπτά στους 4°C και φυγοκέντρηση του λύματος στα 29.000 x g (μέσος όρος 21.000 rpm, φυγόκεντρος Beckman L8-80M Ultra Centrifuge, κεφαλή 75Ti) για 30 λεπτά στους 4°C.

Παράλληλα με αυτήν την διαδικασία προετοιμάζουμε και τα σφαιρίδια Ni-NTA που θα προσδέσουν την πρωτεΐνη μέσω του 6xHis επιτόπου. Για το λόγο αυτό, 2 mL από 50% διαλύματος σφαιριδίων φυγοκεντρούνται στα 2.150 x g (3.000 rpm, φυγόκεντρος MSE Harrier 18/80) στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 10 mL H<sub>2</sub>O. Γίνεται ανάδευση και νέα φυγοκέντρηση-αφαίρεση υπερκειμένου στις ίδιες συνθήκες και προστίθενται 2 mL διαλύματος TBP 1x με 50 mM NaCl. Ακολουθούν δυο επιπλέον πλύσεις (φυγοκέντρηση-αφαίρεση υπερκειμένου) με το ίδιο διάλυμα (TBP 1x, 50 mM NaCl) και στο τέλος προστίθεται 1 mL διαλύματος TBP 1x με 50 mM NaCl, έτσι ώστε να έχουμε ένα 50% διάλυμα σφαιριδίων.

Μετά τη φυγοκέντρηση του λύματος των βακτηρίων, το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες τοποθετείται σε ένα σωληνάκι 50 mL μαζί με τα 2 mL από το εξισορροπημένο 50% διάλυμα σφαιριδίων. Ακολουθεί ανάδευση σε περιστρεφόμενο τροχό για 1 ώρα στους 4°C και τοποθέτηση του διαλύματος σε πλαστική κολώνα απομόνωσης σε περιβάλλον 4°C (cold room). Αναμένουμε 20 λεπτά για να καθιζήσουν τα σφαιρίδια στο κάτω μέρος της κολώνας και στη συνέχεια ανοίγουμε το καπάκι και το πώμα της κολώνας για να αρχίσει η έκλουση. Το πρώτο έκλουμα καλείται 1<sup>st</sup> flow και ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (Πίνακας 24) των οποίων τα εκλούματα συλλέγουμε ξεχωριστά. Δείγματα από τα στάδια της επαγωγής της έκφρασης και της έκλουσης της His-RGS4 ηλεκτροφορούνται και ακολουθεί βαφή με coomassie ή ανοσοεντόπιση με αντίσωμα αντι-His, για να βεβαιωθούμε για τη σωστή πορεία της διαδικασίας.

	Ποσότητα διαλύματος	Διάλυμα TBP 1x που περιέχει:	
Διαδικασία		Ποσότητα NaCl	Ποσότητα ιμιδαζολίου
1 <sup>η</sup> πλύση	10 mL	200 mM	_
2 <sup>η</sup> πλύση	10 mL	50 mM	20 mM
3 <sup>η</sup> πλύση	10 mL	50 mM	40 mM
4 <sup>η</sup> πλύση	10 mL	50 mM	40 mM
Έκλουση	2,5 mL	50 mM	200 mM
Τελική πλύση	2 mL	50 mM	400 mM

Πίνακας 24. Διαλύματα των πλύσεων και της έκλουσης για την απομόνωση της χιμαιρικής, ανασυνδιασμένης His-RGS4 πρωτεΐνης. Όσο αυξάνεται η ποσότητα του ιμιδαζολίου στο διάλυμα, τόσο αυξάνεται και η εκλουόμενη ποσότητα της πρωτεΐνης, καθώς το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την πρόσδεση των ιστιδινών στα ιόντα Ni<sup>+2</sup>

Για να χρησιμοποιήσουμε στα πειράματά μας την απομονωμένη RGS4 ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη θα πρέπει να αλλάξουμε το διάλυμα στο οποίο αυτή βρίσκεται, ώστε να απαλλαγούμε από τη β-μερκαπτοαιθανόλη, και στη συνέχεια να ακολουθήσει συμπύκνωση της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, το διάλυμα που παίρνουμε από την έκλουση τοποθετείται σε ειδική κολώνα συμπύκνωσης με όριο αποκλεισμού τα 5 KDa, και το αραιώνουμε με 1 mL διαλύματος ανταλλαγής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της κολώνας με το διάλυμα στα 4.000 x g (5.200 rpm, φυγόκεντρος MSE Harrier 18/80) για 20 λεπτά στους 4°C, ώστε να απομακρυνθεί μέρος του νέου διαλύματος ενώ η πρωτεΐνη κατακρατείται στην κολώνα. Στη συνέχεια, προστίθενται εκ νέου στο διάλυμα της πρωτεΐνης 2 mL διαλύματος ανταλλαγής. Η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται και προστίθενται διαδοχικά ακόμα 1 mL + 1 mL διαλύματος ανταλλαγής. Η κολώνα φυγοκεντρείται και, όταν ο όγκος του δείγματος με την πρωτεΐνη μειωθεί περίπου στο 1 mL, το υλικό αρχικά αναδεύεται ισχυρά με την πιπέττα, και στη συνέχεια αφαιρείται και τοποθετείται σε σωληνάκι Eppendorf. Τέλος, προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 40-50% (πριν την τοποθέτηση της γλυκερόλης κρατάμε 50 μL από το διάλυμα πρωτεΐνης ώστε να προσδιορισθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford).

To cDNA thς RGS περιοχής thς RGS4 πρωτεΐνης αρουραίου (4Box) βρίσκεται, επίσης, στον τροποποιημένο πλασμιδιακό φορέα pQE60, ο οποίος τοποθετεί έναν επίτοπο 6xHis στο αμινοτελικό άκρο thς πρωτεΐνης (MGHHHHHHG-). Η απομόνωση του πεπτιδίου His-4Box έγινε όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο των Popov et al., 1997 και ξεκινά από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων JM109 που περιέχουν το πλασμίδιο του His-4Box. Η επαγωγή thς έκφρασης του πεπτιδίου στα βακτήρια γίνεται όπως και στην περίπτωση the His-RGS4. Για the λύση των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα λύσης για αδιάλυτες πρωτεΐνες και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε υπερήχους, στις ίδιες συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του λύματος στα 21.000 x g (μέσος όρος 18.000 rpm, φυγόκεντρος Beckman L8-80M Ultra Centrifuge, κεφαλή 75Ti) για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε ένα σωληνάκι 50 mL μαζί με τα 2 mL από το 50% διάλυμα σφαιριδίων. Ακολουθεί ανάδευση σε περιστρεφόμενο τροχό για 1 ώρα στους 4°C και τοποθέτηση του διαλύματος σε πλαστική κολώνα απομόνωσης σε περιβάλλον 4°C (cold room). Στη συνέχεια ακολουθείται διαδικασία έκλουσης με ταυτόχρονη επαναδιάταξη του πεπτιδίου στην κολώνα χρησιμοποιώντας 100 mL ενός κλιμακούμενης συγκέντρωσης διαλύματος ουρίας με εύρος συγκεντρώσεων 8 M έως 1 M ουρία. Στο τέλος γίνεται τελική πλύση με 10 mL διαλύματος TBP 1x για να απομακρυνθεί η ποσότητα της ουρίας που παραμένει. Η πρωτεΐνη εκλούεται από την κολώνα με 9 mL διαλύματος έκλουσης (TBP 1x, 50 mM NaCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, βλ. Πίνακα 24) και συμπυκνώνεται με ίδιου τύπου κολώνα συμπύκνωσης (όριο αποκλεισμού τα 5 KDa) και επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις, όπως αναφέρεται και για την His-RGS4 παραπάνω.

# 3.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της *in vitro* πρόσδεσης των GST και MBP χιμαιρικών πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες (pull down assays)

Η μέθοδος εφαρμόζεται για να μελετήσουμε *in vitro* την άμεση αλληλεπίδραση μιας πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου με μια άλλη πρωτεΐνη. Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται χιμαιρικές πρωτεΐνες που φέρουν στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο του μορίου τους έναν επίτοπο όπως GST, MBP. Οι προς μελέτη χιμαιρικές πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν μέσω του επιτόπου που διαθέτουν με ένα συμπληρωματικό μόριο (π.χ. γλουταθειόνη, αμυλόζη), που βρίσκεται προσκολλημένο σε σφαιρίδια σταθερού και αδιάλυτου υλικού (π.χ. σφαιρίδια σεφαρόζης ή αγαρόζης). Αποτελεί ουσιαστικά μια παραλλαγή της μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας.

<u>Διαλύματα και υλικά:</u>

Column buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 , 200 mM NaCl, 1 mM EDTA

- Διάλυμα επώασης: PBS 1x (ή column buffer για τα MBP-χιμαιρικά πεπτίδια, βλ. 3.3.3.1), 0,2 mM PMSF, 20 μg/mL λευπεπτίνης, 20 μg/mL αντιπαΐνης, 1 χάπι ανά 10 mL διαλύματος επώασης από μίγμα αναστολέων πρωτεασών Complete Mini, EDTA-free
- Διάλυμα έκπλυσης: PBS 1x (ή column buffer για τα MBP-χιμαιρικά πεπτίδια), 1% Igepal (Sigma, I-3021)

**Παράγοντας AMF**: 100 mM NaF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM AlF<sub>3</sub>, 1 mM GDP σε διάλυμα επώασης

- Αναγωγικό διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων (2x SDS Sample buffer ή 2x Laemmli buffer): 100 mM Tris-HCl, pH 6,8 , 4% κ.ο. SDS, 20% κ.ο. γλυκερόλη, 0,2% κ.ο. κυανό της βρωμοφαινόλης, 200 mM βμερκαπτοαιθανόλη
- **Λοιπά υλικά**: διάλυμα 50% σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης σε PBS 1x, διάλυμα 50% σφαιριδίων αμυλόζης-αγαρόζης σε column buffer

#### Πειραματική διαδικασία:

500 μL διαλύματος επώασης αναμιγνύονται με 200-800 μL από την GST-χιμαιρική πρωτεΐνη μαζί με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (50 μL διαλύματος 50% σε PBS 1x). Μετά από επώαση υπό ανάδευση για 30-45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, γίνεται έκπλυση τρεις φορές με διάλυμα επώασης και τέλος τα σφαιρίδια με την ακινητοποιημένη GST-γιμαιρική πρωτεΐνη επαναδυαλύονται σε 180-190 μL διαλύματος επώασης (τελικός όγκος δείγματος 200 μL, τελική συγκέντρωση χιμαιρικής πρωτεΐνης 0,5-1 μΜ). Ακολουθεί δεύτερη επώαση υπό ανάδευση με 0,5-1 μΜ από την καθαρή, ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη, για την οποία μας ενδιαφέρει να προσδιορίσουμε τυχόν αλληλεπίδραση με το προς μελέτη χιμαιρικό πεπτίδιο (30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για τις Ga υπομονάδες και την His-RGS4, 15-20 λεπτά στους 4°C για τις Gβγ υπομονάδες) και τα σύμπλοκα εκπλένονται 4-5 φορές με 500 μL διαλύματος έκπλυσης. Οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούονται τέλος παρουσία 20 μL διαλύματος 2x Laemmli buffer και αποδιατάσσονται στους 95°C για 5 λεπτά. Τέλος τα δείγματα αναλύονται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών των δημιουργηθέντων συμπλόκων και να ακολουθήσει ο προσδιορισμός των προσδεδεμένων στα χιμαιρικά πεπτίδια πρωτεϊνών με ανοσοεντόπιση. Για να γίνει η καθίζηση των σφαιριδίων κατά τις πλύσεις, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 750 x g (3.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf 5415C).

Στην περίπτωση πειραμάτων όπου θέλουμε να προσδιορίσουμε την πρόσδεση μιας πρωτεΐνης που περιέχεται σε ένα κυτταρικό λύμα (π.χ. HA-RGS4, HA-ΔNRGS4) με ένα χιμαιρικό πεπτίδιο, λύμα από κύτταρα (0,5-1 mg ολικής πρωτεΐνης) επωάζεται με το ακινητοποιημένο χιμαιρικό πεπτίδιο (δεύτερη επώαση) για 1 ώρα στους 4°C υπό ανάδευση. Τα ακινητοποιημένα σύμπλοκα στα σφαιρίδια εκπλένονται τέσσερις φορές με 500 μL διαλύματος έκπλυσης.

Στην περίπτωση πειραμάτων για προσδιορισμό της δημιουργίας ετεροτριμερών συμπλόκων πέραν των δυο πρωτεϊνών με τη συμμετοχή της RGS4, των Ga υπομονάδων και των GST-χιμαιρικών πεπτιδίων, χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας AMF για να ενισχύσει την πρόσδεση της RGS4 στη Ga υπομονάδα (βλ. Εισαγωγή, Σχήμα 9 και Αποτελέσματα, Παράγραφος 4.3.3). Για να παρασκευάσουμε το διάλυμα του παράγοντα ΑΜΕ, υπολογίζουμε αρχικά ποσότητες για ένα συνολικό διάλυμα που θα χρειαστούμε για τα δείγματα. Στη συνέγεια προσθέτουμε σε διάλυμα επώασης τα άλατα σε τελικές συγκεντρώσεις 100 mM NaF, 2 mM MgCl<sub>2</sub> και 100  $\mu$ M AlF<sub>3</sub>, τα οποία τα διαθέτουμε σε πυκνά διαλύματα (0,5 M NaF, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM AlF<sub>3</sub>, αρχικές ενδεικτικές συγκεντρώσεις). Για την έναρξη του πειράματος, η Gta-GDP (0,5  $\mu$ M) και η His-RGS4 (0,5 μΜ) προ-επωάζονται αρχικά σε 190 μL διάλυμα επώασης παρουσία ή απουσία του παράγοντα AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 20 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα αυτό προστίθεται στη συνέχεια σε σφαιρίδια γλουταθειόνηςσεφαρόζης που περιέχουν την ακινητοποιημένη GST-χιμαιρική πρωτεΐνη και ακολουθεί επώαση για 25 λεπτά στους 4°C. Στην συνέχεια γίνονται πλύσεις και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται, όπως αναφέρεται παρακάτω.

Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθείται για τις MBP-χιμαιρικές πρωτεΐνες με τις εξής διαφορές: ως διάλυμα επώασης και έκπλυσης χρησιμοποιείται το column buffer μαζί με τους αναστολείς, αντί για PBS, ενώ ως μέσο ακινητοποίησης των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιείται διάλυμα 50% σφαιριδίων αμυλόζης-αγαρόζης σε column buffer.

# **3.3.5** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (<u>PolyA</u>crylamide <u>G</u>el <u>E</u>lectrophoresis – PAGE)

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ένα πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους, και αυτό επιτυγχάνεται με την διέλευση των πρωτεϊνών μέσα από πόρους συγκεκριμένου μεγέθους σε ένα πήκτωμα, μετά από την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου. Το πήκτωμα

δημιουργείται με τον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλεν-δις-ακρυλαμιδίου (bis-acrylamide), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος, του οποίου το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δυο παραπάνω ουσιών. Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση αποκλειστικά το μέγεθός τους, χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), οπότε η συγκεκριμένη μέθοδος καλείται SDS-PAGE. Το SDS προσδένεται στην πεπτιδική αλυσίδα των πρωτεϊνών και την αποδιατάσσει προσδίδοντάς τους ευθύγραμμο σχήμα, ενώ τους προσδίδει παράλληλα αρνητικό φορτίο, ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης (περίπου 1,4 g SDS ανά 1 g πρωτεΐνης). Οι πρωτεΐνες αποκτούν το ίδιο σχήμα και την ίδια αναλογία αρνητικό φορτίο-μάζα και επομένως η μετακίνησή τους στο ηλεκτρικό πεδίο είναι αποτέλεσμα του μεγέθους και κατ'επέκταση και του μοριακού τους βάρους.

#### Διαλύματα και υλικά:

- **Διάλυμα ακρυλαμιδίου**: 30% μείγματος ακρυλαμιδίου : bis-ακρυλαμιδίου (29% κ.o. : 1% κ.o. αντίστοιχα)
- Διάλυμα πηκτώματος επιστοίβαξης: 5,5% κ.ο. μείγμα ακρυλαμιδίου διςακρυλαμιδίου, 0,12 M Tris-HCl, pH 6,8 , 0,1% κ.ο. SDS, 0,05% κ.ο. γλυκερόλη, 0,06% κ.ο. υπερθειικό αμμώνιο-APS (ammonium persulfate,  $(NH_4)_2S_2O_8$ ), 0,067% κ.ο. TEMED (N,N,N',N'tetramethylethylenediamine)
- Διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού: 10% ή 12% κ.ο. μείγμα ακρυλαμιδίου διςακρυλαμιδίου, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 , 0,1% κ.ο. SDS, 0,1% κ.ο. γλυκερόλη, 0,074% κ.ο. υπερθειικό αμμώνιο-APS, 0,025% κ.ο. TEMED
- Αναγωγικό διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων (2x SDS Sample buffer ή 2x Laemmli buffer): 100 mM Tris-HCl, pH 6,8 , 4% κ.ο. SDS, 20% κ.ο. γλυκερόλη, 0,2% κ.ο. κυανό της βρωμοφαινόλης, 200 mM βμερκαπτοαιθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25 mM Tris-HCl pH 8,3 , 0,1% κ.o. SDS, 0,2 Μ γλυκίνη
- **Λοιπά υλικά**: συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean II Electrophoresis Cell και Mini-Protean Tetra Cell της Bio-Rad

## Πειραματική διαδικασία:

Για την ηλεκτροφόρηση, το διάλυμα ακρυλαμιδίου – δις-ακρυλαμιδίου και το ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού αναμιγνύονται για να παρασκευαστεί το πήκτωμα διαγωρισμού, η τελική συγκέντρωση του οποίου είναι 10% ή 12% κ.ο. σε ακρυλαμίδιο. Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 45-60 λεπτά ώστε να πολυμεριστεί ομοιόμορφα και στη συνέχεια συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ακολουθεί η ανάμιξη των διαλυμάτων ακρυλαμίδιο – δις-ακρυλαμίδιο και ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβαξης για τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοίβαξης (τελική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 5,5%) με την παράλληλη τοποθέτηση ειδικού «χτενιού» για τη δημιουργία πηγαδιών όπου θα τοποθετηθούν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Ο πολυμερισμός διαρκεί 20-30 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά δείγματα τοποθετούνται στα πηγάδια του πηκτώματος επιστοίβαξης με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton και στη συσκευή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η τάση που εφαρμόζεται στις πρωτεΐνες για την επιστοίβαξη είναι 100 Volts (20-30 λεπτά), ενώ όταν οι πρωτεΐνες εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 120-170 Volts. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής των δειγμάτων φτάσει στο τέλος του πηκτώματος ή μόλις εξέλθει από αυτό (περίπου 1 ώρα). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί χρώση του πηκτώματος διαχωρισμού με χρωστική coomassie ή ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση.

# 3.3.6 Χρώση πηκτώματος με χρωστική coomassie

Μια πρώτη εικόνα του διαχωρισμού των πρωτεϊνών μετά από την ηλεκτροφόρηση λαμβάνεται με την απευθείας χρώση των πρωτεϊνών μέσα στο πήκτωμα διαχωρισμού.

#### Διαλύματα:

**Διάλυμα χρώσης πηκτώματος**: 0,1% κ.ο. Coomassie Brilliant blue G-250 (Sigma, B-1131), 25% κ.ο. ισοπροπανόλη, 10% κ.ο. οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος: 40% κ.ο. μεθανόλη, 10% κ.ο. οξικό οξύ

#### Πειραματική διαδικασία:

Για την χρώση των πρωτεϊνών, το πολυμερισμένο πήκτωμα ακρυλαμίδης τοποθετείται στο διάλυμα χρώσης coomassie σε θερμοκρασία δωματίου για 10-20 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα χρώσης αφαιρείται και το πήκτωμα αποχρωματίζεται με διαδοχικές εκπλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος, με το οποίο αποχρωματίζεται το υπόβαθρο και είναι δυνατή η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Ο αποχρωματισμός μπορεί να γίνει και ολονυκτίως για να μειωθεί το μπλε υπόβαθρο και να φανούν καλύτερα οι πρωτεϊνικές ζώνες.

# 3.3.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Η μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη είναι μια διαδικασία που σκοπό έχει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, που έχουν διαχωριστεί μετά από ηλεκτροφόρηση, σε ένα μεμβρανικό υπόστρωμα που επιτρέπει την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών με μεθόδους μεγάλης ευαισθησίας (ανοσοαποτύπωση). Η μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα διαχωρισμού γίνεται σε μεμβράνες που αποτελούνται από νιτροκυτταρίνη ή polyvinylidene difluoride (PVDF). Βασική προϋπόθεση της μεταφοράς είναι να γίνεται πλήρως και με τρόπο που να μην καταστρέφει το πρότυπο διαχωρισμού που έχει προκύψει από την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυ-ακρυλαμιδίου στη μεμβράνη εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση, έτσι ώστε να μετακινηθούν προς τη μεμβράνη οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες, των οποίων το φορτίο καθορίζεται από την ηλεκτροφόρηση και το αλκαλικό pH του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς.

Η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει την ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη με τη χρήση αντισωμάτων. Η ανοσοαποτύπωση είναι ακριβής μέθοδος διότι βασίζεται στην ιδιότητα των αντισωμάτων να δεσμεύουν τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν και είναι επίσης μια μέθοδος που επιτρέπει τη μόνιμη αποτύπωση πρωτεϊνών στο κατάλληλο μέσο (μεμβράνη, φωτογραφικό χαρτί, ηλεκτρονικό μέσο). Κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης η μεμβράνη επωάζεται με αντισώματα προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία ή μη μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για την αποφυγή της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη (εφόσον τα αντισώματα είναι επίσης πρωτεΐνες που μπορεί να δεσμευθούν στη μεμβράνη), γίνεται εκ των προτέρων δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης με τη χρήση γνωστών πρωτεΐνών, όπως είναι για παράδειγμα το άπαχο γάλα (περιέχει καζεΐνη), η ζελατίνη ή η αλβουμίνη. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος γίνεται έμμεσα με την αρχική δέσμευση του πρώτου αντισώματος που αναγνωρίζει έναν αντιγονικό επίτοπο της υπό έλεγχο πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, αφού γίνει έκπλυση της μεμβράνης, επωάζεται η τελευταία με ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή του πρώτου και είναι συζευγμένο με κάποιο μόριο-ιχνηθέτη. Το μόριο-ιχνηθέτης είναι σε θέση να δώσει σήμα που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί από απλά μέσα (συνήθως οπτικό σήμα). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Η HRP οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και ακολούθως οζειδώνει την χημική ένωση λουμινόλη. Το αποτέλεσμα είναι η εκπομπή ορατού φωτός που μπορεί να ανιχνευθεί και να αποτυπωθεί σε φωτοευαίσθητο φιλμ.

<u>Διαλύματα και υλικά</u>:

**Διάλυμα μεταφοράς σε μεμβράνη**: 25 mM Tris-HCl, 0,2 M γλυκίνη, 20% κ.ο. μεθανόλη

Διάλυμα έκπλυσης μεμβράνης: PBS 1x, 0,1% κ.o. Tween-20

Blocking buffer: PBS 1x, 5% κ.ο. άπαχο γάλα, 0,1% κ.ο. Tween-20

- Διάλυμα αραίωσης αντισώματος: PBS 1x, 3% κ.ο. άπαχο γάλα, 0,1% κ.ο. Tween-20. Στην περίπτωση του αντι-ΗΑ αντισώματος το διάλυμα περιλαμβάνει PBS 1x, 0,05% κ.o. Tween-20 (χωρίς γάλα).
- Σύστημα ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια για ανοσοαποτύπωση (enhanced chemiluminescence, ECL): ECL Western Blotting Substrate, 32209, Pierce και ECL Western Blotting Detection Reagents, RPN2209, Amersham Biosciences. Περιέχουν διάλυμα φωταύγειας-ενισχυτή και διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- **Λοιπά υλικά**: Μεμβράνη μεταφοράς (PVDF Transfer Membrane, 88520, Pierce Thermo Scientific και Hybond-P PVDF Membrane, RPN303F, Amersham Biosciences), συσκευή μεταφοράς (Mini Trans-Blot Electrophoretic
Transfer Cell, 170-3930, BioRad), μεθανόλη, φύλλα Whatmann 0,5 mm, φωτοευαίσθητο φιλμ (Super RX Medical X-ray film, 100 NIF, 18x24, Fujifilm), υγρό εμφάνισης φιλμ (G150 Developer, AGFA), υγρό σταθεροποίησης (G354 Manual Fixing Bath, AGFA), κασετίνα εμφάνισης

#### <u>Πειραματική διαδικασία</u>

Αρχικά, η μεμβράνη PVDF στην οποία πρόκειται να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες, επωάζεται σε μεθανόλη για 10 δευτερόλεπτα για να ενεργοποιηθεί, ξεπλένεται με νερό για 5 λεπτά υπό ανάδευση και τοποθετείται για όσα λεπτά χρειάζονται επίσης υπό ανάδευση στο διάλυμα μεταφοράς για εξισορρόπηση. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα διαχωρισμού πολυ-ακρυλαμιδίου τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη PVDF με τρόπο ώστε να μην παρεμβάλλεται αέρας, και εγκλείεται μεταξύ δυο φύλλων Whatmann ίδιας επιφάνειας και δυο σφουγγαριών εμβαπτισμένων σε διάλυμα μεταφοράς. Όλα αυτά συμπιέζονται μέσα σε ειδικές θήκες που τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς με τέτοιο προσανατολισμό ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες να μεταφερθούν από το πήκτωμα στη μεμβράνη με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται με εφαρμογή πεδίου σταθερής έντασης 390 mA, για 1,5 ώρες, στους 4°C (για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών).

Η PVDF μεμβράνη που φέρει τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες επωάζεται στη συνέχεια για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση σε Blocking buffer για να δεσμευθούν οι ελεύθερες θέσεις της μεμβράνης και να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων σε αυτήν. Ακολουθεί γρήγορη έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα έκπλυσης για 1-2 φορές και επώαση σε διάλυμα που περιέχει το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση για 16 ώρες, στους 4°C υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα έκπλυσης, 4 φορές από 10-15 λεπτά και επωάζεται με δεύτερο αντίσωμα αντι-mouse (074-1806), αντι-rabbit (074-1506) ή αντι-goat (14-13-06) (Kirkegaard and Perry Laboratories – KPL) σε αραίωση 1:10.000 στο διάλυμα αραίωσης αντισώματος. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης, 4-5 φορές για 10-15 λεπτά κάθε φορά, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί ειδικά. Η μεμβράνη μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο και η επιφάνειά της καλύπτεται από το μίγμα των διαλυμάτων του συστήματος ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (ECL, σε αναλογία 1:1) για 1 λεπτό. Η μεμβράνη, τέλος, καλύπτεται με διαυγές και αδιάβροχο ελαστικό μέσο, στερεώνεται μέσα σε κασετίνα εμφάνισης και επάνω της τοποθετείται το φωτοευαίσθητο φιλμ. Το φιλμ εκτίθεται στη χημειοφωταύγεια που εκπέμπει η μεμβράνη για διάφορα χρονικά διαστήματα, ανάλογα με την ένταση του εκπεμπόμενου σήματος. Ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με το υγρό εμφάνισης και στερέωσή του με το υγρό σταθεροποίησης.

# 3.3.8 Απομάκρυνση αντισωμάτων από την PVDF μεμβράνη (απογύμνωση μεμβράνης ή stripping)

Οι μεμβράνες PVDF που έχουν υποστεί ανοσοαποτύπωση είναι δυνατόν να ξαναχρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση άλλων πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, αφού προηγηθεί απομάκρυνση των αντισωμάτων της πρώτης ανοσοαποτύπωσης.

#### <u>Διαλύματα</u>:

Διάλυμα απομάκρυνσης αντισωμάτων (διάλυμα απογύμνωσης ή stripping buffer): 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 2% κ.ο. SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7 Διάλυμα έκπλυσης μεμβράνης: PBS 1x, 0,1% κ.ο. Tween-20 Blocking buffer: PBS 1x, 5% κ.ο. άπαχο γάλα, 0,1% κ.ο. Tween-20

#### Πειραματική διαδικασία:

Η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα έκπλυσης, 2 φορές για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν οι παράγοντες ανίχνευσης χημειοφωταύγειας και στη συνέχεια, επωάζονται σε stripping buffer για 30 λεπτά, στους 50°C, υπό συνεχή ανακίνηση. Η μεμβράνη εκπλένεται εκ νέου με διάλυμα έκπλυσης, 3 φορές γρήγορα και ακολουθεί η δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (blocking) και η ανοσοεντόπιση με το κατάλληλο αντίσωμα, όπως περιγράφεται παραπάνω.

## 3.3.9 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων από ζωντανά κύτταρα

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιεί την ικανότητα ενός αντισώματος (συνήθως μονοκλωνικού) να δεσμεύει εξειδικευμένα και με υψηλή

συγγένεια ένα μοναδικό αντιγόνο, και έχει σκοπό την απομόνωση μιας πρωτεΐνης από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Το αντίσωμα δεσμεύει το αντιγόνο-πρωτεΐνη σε διάλυμα, και το σύμπλοκο πρωτεΐνη-αντίσωμα προσδένεται μέσω του αντισώματος σε μήτρα σφαιριδίων (σφαιρίδια αγαρόζης). Η πρόσδεση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισώματος στα σφαιρίδια γίνεται είτε άμεσα είτε έμμεσα, με τη διαμεσολάβηση μιας πρωτεΐνης που δεσμεύει τη συντηρημένη περιοχή των αντισωμάτων, όπως η πρωτεΐνη Α ή/και η πρωτεΐνη G. Τα υπόλοιπα μόρια του πρωτεϊνικού μίγματος που δεν έχουν δεσμευθεί από το αντίσωμα, απομακρύνονται με επαναλαμβανόμενες πλύσεις. Είναι αρκετά ευαίσθητη τεχνική διότι επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις σε ένα διάλυμα, καθώς απομονώνει την ανοσοεντοπισμένη πρωτεΐνη από ένα διάλυμα χιλιάδων διαφορετικών πρωτεϊνών και την συμπυκνώνει (αυξάνει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης μέχρι και 10.000 φορές).

Η μέθοδος της συν-ανοσοκατακρήμνισης βασίζεται στην ανοσοκατακρήμνιση, με τη διαφορά ότι ο σκοπός της δεν είναι να απομονώσει μια μοναδική πρωτεΐνη από ένα μίγμα, αλλά είναι σχεδιασμένη να απομονώσει μια γνωστή πρωτεΐνη μαζί με οποιαδήποτε άλλη άγνωστη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με το αντιγόνο αυτό. Σε αυτήν την περίπτωση, η γνωστή πρωτεΐνη καλείται πρωτεΐνη-«δόλωμα» (bait) και η άγνωστη πρωτεΐνη καλείται πρωτεΐνη-«δόλωμα» (bait) και η άγνωστη πρωτεΐνη μαζί με αιλληλεπιδρά με το αντιγόνο αυτό. Σε αυτήν την περίπτωση, η γνωστή πρωτεΐνη καλείται πρωτεΐνη-«δόλωμα» (bait) και η άγνωστη πρωτεΐνη καλείται πρωτεΐνη-«δόλωμα» (bait) και η άγνωστη πρωτεΐνη/ες που αλληλεπιδρούν με αυτό καλούνται πρωτεΐνες-«λεία» (prey). Οι αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες μπορεί να είναι μέλη ενός πρωτεΐνικού συμπλόκου, σηματοδοτικά μόρια ενός μονοπατιού σηματοδότησης, δομικές πρωτεΐνες κ.α. Με την μέθοδο της συν-ανοσοκατακρήμνισης απομονώνονται συγκεκριμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία στη συνέχεια με τις μεθόδους της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και ανοσοεντόπισης μπορούν να ανιχνευθούν σε μεμβράνη PVDF και να αποτυπωθούν σε φωτοευαίσθητο φιλμ.

#### Διαλύματα και υλικά:

#### Διάλυμα έκπλυσης: PBS 1x, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> και 1 mM PMSF

**Διάλυμα λύσης**:10 mM Tris, pH 7,6, 1% Triton X-100, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA.H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 50 mM NaF, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 2 μg/ml λευπεπτίνη, 2 μg/ml αντιπαΐνη, 2 μg/ml βενζαμιδίνη (benzamidine, Sigma-Aldrich), 1 ταμπλέτα (ανά 10 mL διαλύματος λύσης) από το μίγμα αναστολέων πρωτεασών Complete Mini, EDTA-free

(εναλλακτικά βάζουμε διάλυμα 25x, που προέρχεται από τη διάλυση μιας ταμπλέτας Complete, EDTA-free, 11873580001 Roche Diagnostics, σε 2 mL ddH<sub>2</sub>O)

- Αντισώματα: Monoclonal αντι-myc (9B11, 2276, Cell Signaling Technology Inc.), monoclonal αντι-flag (F1804, Sigma), polyclonal αντι-HA (H6908, Sigma), αντι-RGS4 (N-16, sc-6204, Santa Cruz Biotechnology), αντι-Goa (OC1), αντι-Gia<sub>2</sub> (SG3), αντι-Gai-<sub>3</sub> (C-10, sc-262, Santa Cruz Biotechnology), αντι-Gβ (T-20, sc-378, Santa Cruz Biotechnology)
- **Οροί μη ανοσοποιημένων οργανισμών**: Φυσιολογικός ορός κουνελιού (normal rabbit serum, NRS, sc-2027, Santa Cruz), Φυσιολογικός ορός ποντικού (normal mouse serum, NMS, sc-2025, Santa Cruz)
- Σφαιρίδια κατακρήμνισης ανοσοσυμπλόκων: Protein A-Agarose Immunoprecipitation Reagent (sc-2001, Santa Cruz), Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent (sc-2003, Santa Cruz)
- Αναγωγικό διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων (2x SDS Sample buffer ή 2x Laemmli buffer): βλ. παράγραφο 3.3.5

<u>Πειραματική διαδικασία:</u>

Κύτταρα HEK293 σταθερά επιμολυσμένα με τον myc-σημασμένο μ-OR (M27) ή τον flag-σημασμένο δ-OR (flag-δ-OR) αναπτύσσονται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm και διαμολύνονται παροδικά με το πλασμίδιο που περιλαμβάνει το cDNA που κωδικοποιεί την HA-RGS4 (5 μg) ή άλλο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2.4. 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα επωάζονται απουσία (κύτταρα μάρτυρες) ή παρουσία 1 μΜ οπιοειδούς αγωνιστή DAMGO (E7384, Sigma) ή DSLET (1170, Tocris Bioscience) για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα ξεπλένονται με ψυχρό διάλυμα έκπλυσης, λύονται με ψυχρό (4°C) διάλυμα λύσης και φυλάσσονται στον πάγο για 30 λεπτά, ώστε να παρεμποδιστεί η δράση των πρωτεασών που αποικοδομούν τις πρωτεΐνες. Ακολουθεί συλλογή των κυτταρικών λυμάτων και φυγοκέντρηση τους στα 750 x g (3.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf 5415C) για 10 λεπτά στους 4°C, ώστε να διαχωριστούν οι διαλυτές πρωτεΐνες από τα αδιάλυτα συστατικά των κυττάρων. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα δείγματα με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 3.3.2). 500-1.000 μg κυτταρικών λυμάτων επωάζονται με 4 μg κατάλληλου αντισώματος ή την αντίστοιχη ποσότητα από φυσιολογικό ορρό ποντικού ή κουνελιού, και τα δείγματα επωάζονται υπό ανάδευση στους 4°C για 15-18 ώρες, ώστε να σχηματιστούν τα ανοσοσύμπλοκα. Στη συνέχεια, στα δείγματα προστίθενται 30-40 μL από σφαιρίδια κατακρήμνισης ανοσοσυμπλόκων. Τα ανοσοσύμπλοκα επωάζονται τρεις επιπλέον ώρες υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο τροχό στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 750 x g (3.000 rpm) για 5 λεπτά στους 4°C. Τέλος, τα κατακρημνίσματα ξεπλένονται 3 φορές με παγωμένο διάλυμα λύσης, οι κατακρημνισμένες πρωτεΐνες επαναδιαλύονται σε 30 μL 2x Laemmli buffer και το δείγμα βράζεται στους 100°C, για 5 λεπτά. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (12%) παρουσία SDS και ακολουθεί

Στην περίπτωση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης για τον προσδιορισμό πιθανών συμπλόκων μεταξύ RGS4 και Gβγ, κύτταρα COS-7 διαμολύνονται με την HA-RGS4 (5 μg) και τον μ-OR (3 μg) σε τρυβλία 100 mm, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2.4. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα αποκολλούνται από τα τρυβλία με τη βοήθεια θρυψίνης, συλλέγονται με φυγοκέντρηση και τοποθετούνται σε 6-well-plates. 24 ώρες μετά ακολουθεί ενεργοποίηση με αγωνιστή DAMGO και ανοσοκατακρήμνιση, όπως περιγράφεται παραπάνω.

#### 3.3.10 Προσδιορισμός της φωσφορυλιωμένης ERK κινάσης

Για να προσδιορίσουμε την ενεργοποίηση των ERK κινασών μετά από την ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων με αγωνιστές, ανιχνεύουμε τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1,2 κινασών σε κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον myc-μ-OR ή τον flag-δ-OR υποδοχέα.

#### Διαλύματα και υλικά:

Διάλυμα λύσης: όπως το διάλυμα λύσης στην ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (παράγραφος 3.3.9) με την προσθήκη μίγματος αναστολέων φωσφατασών (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, P5726, Sigma-Aldrich, 5 μL από το κοκτέιλ σε 1 mL διαλύματος λύσης [αραίωση 1:200]) **Θρεπτικό υλικό απουσία ορού**: ρυθμιστικό διάλυμα DMEM, πενικιλίνη 100 units/mL, στρεπτομυκίνη 100 μg/mL, 2 mM γλουταμίνη, 5% όξινο ανθρακικό νάτριο, pH 7,2.

Λοιπά υλικά: PBS 1x, DAMGO, DSLET, αντισώματα έναντι ERK1,2 και pERK1,2 πρωτεϊνών

#### Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα M27 ή flag-δ-OR που εκφράζουν σταθερά τους μ- ή δ-OR αντίστοιχα, διαμολύνονται, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2.4. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα 6-well plates 5-16 ώρες πριν την προσθήκη των οπιοειδών αγωνιστών και αντικαθίσταται με φρέσκο θρεπτικό υλικό απουσία ορού, για να αποφευχθεί η δράση των αυξητικών παραγόντων που επηρεάζουν άμεσα τη φωσφορυλίωση των MAPKs. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με τους αγωνιστές DAMGO, DSLET (1 μM) ή EGF για συγκεκριμένες χρονικές περιόδους (2-30 λεπτά) στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης το θρεπτικό υλικό με τον αγωνιστή απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με 1 mL/πηγαδάκι από ψυχρό διάλυμα PBS 1x (4°C). Τα κύτταρα λύονται με ψυχρό διάλυμα λύσης (80-120 μL/πηγαδάκι) και φυλάσσονται στον πάγο για 30 λεπτά, ώστε να λυθούν πλήρως και να παρεμποδιστεί η δράση των πρωτεασών και κυρίως των φωσφατασών, οι οποίες μειώνουν τα επίπεδα φωσφορυλιωμένων ERK που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Ακολουθεί συλλογή των κυτταρικών λυμάτων σε σωληνάκια τύπου Eppendorf και φυγοκέντρηση τους στα 750 x g (3.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf 5415C) για 10 λεπτά στους 4°C, ώστε να διαχωριστούν οι διαλυτές πρωτεΐνες από τα αδιάλυτα συστατικά των κυττάρων. Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης (υπερκείμενο) υπολογίζεται στα δείγματα με τη μέθοδο Bradford και 50 μg πρωτεΐνης από τα δείγματα αναμιγνύονται με 2x Laemmli buffer και βράζονται στους 100°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (12%) παρουσία SDS, μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση όπως έχει ήδη αναλυθεί παραπάνω (παράγραφοι 3.3.5 και 3.3.7). Η ανίχνευση των φωσφορυλιωμένων ERK1,2 γίνεται με τη χρήση ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει και τις δυο μορφές (αντι-pERK, E-4, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), σε αραίωση 1:1.000. Για την ποσοτικοποίηση των ERK πρωτεϊνών, η ίδια μεμβράνη PVDF υπόκειται σε διαδικασία αφαίρεσης των αρχικών αντισωμάτων (stripping) και στη συνέχεια επωάζεται με πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις ERK1,2 πρωτεΐνες (αντι-ERK1, C-16, sc-93, Santa Cruz Biotechnology, αραίωση 1:1.000), για να ακολουθήσει η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης.

#### 3.3.11 Συνεστιακή μικροσκοπία

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών ή άλλων μακρομορίων που εκφράζονται στα κύτταρα, εφαρμόζεται η μέθοδος της συνεστιακής μικροσκοπίας. Είναι μια μέθοδος μικροσκοπίας που βασίζεται στην παρατήρηση ιχνηθετημένων μορίων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στο απλό μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιείται μονοχρωματική ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας, που διεγείρει μόρια με ιδιαίτερη δομή, δεσμευμένα ή συντηγμένα με τις προς μελέτη πρωτεΐνες σε ένα κυτταρικό παρασκεύασμα. Η διέγερση των ιχνηθετημένων μορίων έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός σε μεγαλύτερο μήκος κύματος που ανιχνεύεται με τη βοήθεια ειδικών φίλτρων του μικροσκοπίου. Η διέγερση αυτή εφαρμόζεται σε ολόκληρο το υπό μελέτη δείγμα και συνεπώς ο προκαλούμενος φθορισμός ανιγνεύεται συνολικά από το οπτικό πεδίο. Αντίθετα, το συνεστιακό μικροσκόπιο εστιάζει την ακτινοβολία σε ένα επίπεδο εστίασης και χρησιμοποιεί ένα χωρικό φίλτρο έμπροσθεν του ανιχνευτή ώστε να εξαλείψει την πληροφορία που είναι εκτός εστίασης. Καθώς ανιχνεύεται μόνο ο φθορισμός που παράγεται πολύ κοντά στο εστιακό επίπεδο, η ανάλυση της εικόνας, ιδιαίτερα στο σημείο του βάθους που έχει επιλεγεί, είναι πολύ καλύτερη από αυτή του κλασικού μικροσκοπίου φθορισμού. Με την τεχνική αυτή μπορούμε να δημιουργήσουμε και τρισδιάστατες εικόνες από τη διαδοχική παράθεση εικόνων από διαφορετικά εστιακά επίπεδα, δημιουργώντας έτσι μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη τρισδιάστατη διάταξη των υπό μελέτη πρωτεϊνών μέσα σε ένα κύτταρο.

Στην παρούσα μελέτη οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος δεν είναι συντηγμένες με μόρια που φθορίζουν. Αντίθετα, η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων: χρησιμοποιείται ένα πρώτο αντίσωμα για την αναγνώριση του επιτόπου με τον οποίο είναι συντηγμένη κάθε πρωτεΐνη (HA, myc, flag) και εν συνεχεία χρησιμοποιούνται αντι-mouse ή αντι-rabbit αντισώματα που είναι συζευγμένα, όχι με HRP, αλλά με χρωμοφόρες ομάδες, όπως η Alexa Fluor 568 και η FITC (fluorescein isothiocyanate), οι οποίες ενεργοποιούνται και φθορίζουν σε διαφορετικά μήκη κύματος.

#### <u>Διαλύματα και υλικά</u>

PBS 1x, αποστειρωμένο: βλ. παράγραφο 3.3.1, χρησιμοποιείται για όλα τα διαλύματα

Διάλυμα poly-D-Lysine: 0,01% κ.o. poly-D-lysine hydrobromide (P6407, Sigma) σε PBS

Αγωνιστές: DAMGO (E7384, Sigma), DSLET (1170, Tocris Bioscience) σε θρεπτικό υλικό κυττάρων

**Διάλυμα μονιμοποίησης**: 3,7% κ.ο. φορμαλδεΰδη ή 4% κ.ο. παραφορμαλδεϋδη σε PBS **Διάλυμα διάτρησης μεμβρανών**: 0,1% κ.ο. Triton X-100 σε PBS

**Blocking buffer**: 3% BSA σε PBS

- 1<sup>α</sup> Αντισώματα: αντι-HA (H6908, Sigma), anti-myc (9B11, Cell Signaling), monoclonal αντι-flag M2 (F1804, Sigma)
- 2<sup>α</sup> Αντισώματα: Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11004, Molecular Probes-Invitrogen), FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (111-095-003, Jackson Immunoresearch Laboratories)
- Διάλυμα αραίωσης αντισωμάτων: 1% BSA σε PBS. Όλα τα αντισώματα διαλύονται σε αυτό το διάλυμα πριν τη χρήση τους
- Μίγμα προσκόλλησης: Vectashield Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories Inc.)
- **Λοιπά υλικά**: 12-well plates, πλαστικές καλυπτρίδες κυκλικές (διάμετρος 18 mm), γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες, διάλυμα βερνικιού

#### Πειραματική διαδικασία:

**Προετοιμασία καλυπτρίδων**: Η παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού γίνεται με τη δημιουργία μονιμοποιημένων δειγμάτων σε αντικειμενοφόρες πλάκες που καλύπτονται από καλυπτρίδες. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιλαμβάνει την καλλιέργεια των κυττάρων πάνω στις καλυπτρίδες, και για αυτό προαπαιτείται επικάλυψη των καλυπτρίδων με poly-D-Lysine. Έτσι, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε πλαστικό δοχείο με διάλυμα 1 M HCl για 30 λεπτά και έπειτα ξεπλένονται 3 φορές με δισαπεσταγμένο (ddH<sub>2</sub>O) για 5 λεπτά υπό ανάδευση. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετούνται όρθιες μέσα στα πηγαδάκια ενός τρυβλίου με 12 θέσεις (12-well plate, διάμετρος πηγαδιού 22 mm) και στεγνώνονται σε κλίβανο 37°C (τουλάχιστον 30 λεπτά). Ακολουθεί τοποθέτηση των καλυπτρίδων στον πυθμένα των πηγαδιών, επώασή τους μέσα στα πηγαδάκια με διάλυμα poly-D-Lysine για 1 ώρα υπό ανάδευση στους 37°C (1 mL διαλύματος ανά πηγαδάκι) και πλύση με αποστειρωμένο ddH2O (1mL ανά πηγαδάκι), 3 φορές για 5 λεπτά υπό ανακίνηση. Τέλος, οι καλυπτρίδες στεγνώνονται στον κλίβανο των κυττάρων στους 37°C (τουλάχιστον 30 λεπτά) και υποβάλλονται μαζί με τα τρυβλία σε ακτινοβολία UV για 16 ώρες ώστε να αποστειρωθούν (τουλάχιστον 4 ώρες).

Ενεργοποίηση με αγωνιστές, μονιμοποίηση κυττάρων και διάτρηση μεμβρανών: Κύτταρα M27 ή flag-δ-OR που εκφράζουν σταθερά τον myc-μ-OR ή τον flag-δ-OR αντίστοιχα διαμολύνονται με την HA-RGS4 και καλλιεργούνται σε 12-well plates με καλυπτρίδες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2.4. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι τελικής πληρότητας (confluency) που να μην ξεπερνάει το 60-70% (την ημέρα του πειράματος). Στη συνέγεια τα κύτταρα επωάζονται παρουσία ή απουσία 5 μM DAMGO ή 10 μM DSLET για 15 λεπτά ή 1 ώρα στους 37°C (1 mL διαλύματος αγωνιστή ανά πηγαδάκι). Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα ξεπλένονται γρήγορα δυο φορές με 1 mL PBS ανά πηγαδάκι, και επωάζονται για επιπλέον 10 λεπτά σε προθερμασμένο (37°C) διάλυμα μονιμοποίησης (1 mL ανά πηγαδάκι), υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια γίνεται 2-3 φορές πλύση με PBS για 5 λεπτά (1 mL ανά πηγαδάκι) και επώαση των κυττάρων με διάλυμα διάτρησης μεμβρανών για 5 λεπτά υπό ήπια ανάδευση (1 mL ανά πηγαδάκι), ώστε οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές. Ακολουθεί πλύση των κυττάρων για άλλες 2-3 φορές με PBS για 5 λεπτά και επώαση μιας ώρας υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με blocking buffer (1 mL ανά πηγαδάκι), ώστε να δεσμευθούν οι ελεύθερες θέσεις με την πρωτεΐνη αλβουμίνη.

**Ανοσοεντοπισμός**: Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 2 φορές για 5 λεπτά και στη συνέχεια επωάζονται για 16 ώρες στους 4°C με το αντι-ΗΑ (αραίωση 1:400-1:500, για την ανίχνευση της ΗΑ-επισημασμένης RGS4) και το αντιmyc (αραίωση 1:1250, για την ανίχνευση του myc-επισημασμένου μ-OR) αντίσωμα (ή με το αντι-flag αντίσωμα, αραίωση 1:120-1:170, στην περίπτωση των flag-δ-OR κυττάρων) σε διάλυμα αραίωσης αντισώματος (0,8-1 mL ανά πηγαδάκι). Η επώαση με το αντι-ΗΑ και τα αντι-myc/αντι-flag γίνεται ταυτόχρονα ή όχι ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος για κάθε δείγμα. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με διάλυμα PBS για 10 λεπτά υπό ήπια ανάδευση (1 mL ανά πηγαδάκι) και επωάζονται με τα δεύτερα αντισώματα αντι-mouse Alexa Fluor 568 (αραίωση 1:1000, κόκκινο χρώμα για τους υποδοχείς μ-OR ή δ-OR) και αντι-rabbit FITC (αραίωση 1:250, πράσινο χρώμα για την RGS4) για μια ώρα σε διάλυμα αραίωσης αντισώματος (1 mL ανά πηγαδάκι, ήπια ανάδευση). Η επώαση με το αντι-mouse και το αντι-rabbit γίνεται ταυτόχρονα ή όχι ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος για κάθε δείγμα. Τα τρυβλία κατά τη διάρκεια της επώασης είναι καλυμμένα με αλουμινόχαρτο για να μην αποτρέπεται η είσοδος του φωτός που καταστρέφει τα φθορίζοντα μόρια των δεύτερων αντισωμάτων.

Προετοιμασία δειγμάτων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο: Τέλος. πραγματοποιούνται 2-3 πλύσεις με διάλυμα PBS για 10 λεπτά και οι καλυπτρίδες με τα προσκολλημένα και κατεργασμένα σε αυτές κύτταρα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες με τη διαμεσολάβηση 15-20 μL μίγματος προσκόλλησης και στεγανοποιούνται πλήρως με τη βοήθεια διαλύματος βερνικιού. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού και τα δείγματα παραμένουν καλυμμένα με αλουμινόγαρτο για όσο το δυνατόν περισσότερο γρονικό διάστημα. Αφού τα δείγματα στεγνώσουν και στεγανοποιηθούν καλά, ακολουθεί η παρατήρηση των κυττάρων αρχικά σε μικροσκόπιο φθορισμού για να εκτιμηθεί η σωστή χρώση των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα παρατηρούνται με τη χρήση ενός μικροσκοπίου Nikon Eclipse E600, που είναι συνδεδεμένο με ένα συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης MRC-1024 της Bio-Rad με λυχνία laser κρυπτού/αργού (γραμμές διέγερσης 488 nm, 568 nm και 647 nm). Τα φίλτρα εκπομπής που χρησιμοποιούνται είναι το 522/35 για την ανίχνευση του FITC χρωμοφόρου (διέγερση στα 488 nm) και το 605/32 για την ανίχνευση του χρωμοφόρου Alexa Fluor 568 (διέγερση στα 568 nm). Οι φωτογραφίες των δειγμάτων αποκτήθηκαν με τη χρήση 40x και 60x αντικειμενικών φακών με τη βοήθεια του λογισμικού Bio-Rad LaserSharp v2000. Τα οριζόμενα χαρακτηριστικά του λογισμικού που χρησιμοποιήθηκαν για την απόκτηση των φωτογραφιών είναι: ένταση laser (power) 3-30%, διάμετρος ίριδας (iris) 3-4 mm, ενίσχυση (gain) 900-1200.

# 3.3.12 Ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων RGS4 – i4 πεπτιδίου με ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native gel electrophoresis)

Η ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων με ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες είναι μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών ελλείψη μετουσιωτικών συνθηκών όπως είναι τα απορρυπαντικά, η ουρία κ.α. Κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες οι πρωτεΐνες διατηρούν τις ανώτερες δομές τους (δευτεροταγής, τριτοταγής δομή) και η κινητικότητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης εξαρτάται αποκλειστικά από τις φυσικές τους ιδιότητες όπως το σχήμα, το μέγεθος και το φυσικό φορτίο. Συνεπώς, μπορούν να προσδιοριστούν διάφορα φυσικά χαρακτηριστικά των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών όπως είναι το φυσικό σχήμα-μέγεθος, το φορτίο τους, αλλά επίσης και οι αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχουν με άλλες πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, παραμένουν συνδεδεμένα χωρίς αλλαγή της δομής τους, όπως στην περίπτωση συμπλόκων μέσα σε ένα κύτταρο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το φορτίο των πρωτεϊνών οφείλεται στο άθροισμα των φορτίων των αμινοξέων τους. Για το λόγο αυτό, στην ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες εφαρμόζεται βασικό pH για τις όξινες πρωτεΐνες, ώστε αυτές να φορτίζονται αρνητικά και να μετακινούνται προς τον θετικό πόλο. Αντίθετα, στην περίπτωση των βασικών πρωτεϊνών εφαρμόζεται όξινο pH, ώστε να φορτίζονται θετικά και να μετακινούνται προς τον αρνητικό πόλο (αντιστροφή πόλων) (Wittig and Schägger, 2005).

#### <u>Διαλύματα:</u>

Διάλυμα ακρυλαμιδίου: 30% μείγματος ακρυλαμιδίου : bis-ακρυλαμιδίου (29% κ.ο. : 1% κ.ο. αντίστοιχα)

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 40 mM οξικό οξύ, 80 mM β-αλανίνη, pH 4,4
Διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού: 10% κ.ο. μίγματος ακρυλαμιδίου – διςακρυλαμιδίου, ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, 0,1% κ.ο. γλυκερόλη, 0,074% κ.ο. υπερθειικό αμμώνιο-APS, 0,025% κ.ο. TEMED **Διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων (2x sample buffer)**: 40 mM οξικό οξύ, 80 mM βαλανίνη, pH 4,4, 30% κ.ο. γλυκερόλη, 0,1% κ.ο. κυανό της βρωμοφαινόλης

**Διάλυμα μεταφοράς σε μεμβράνη**: 25 mM Tris-HCl, 0,2 M γλυκίνη, 20% κ.ο. μεθανόλη, 1% SDS

#### Πειραματική διαδικασία:

Επώαση RGS4 με το πεπτίδιο i4: Για να μελετηθεί η ενδεχόμενη αλληλεπίδραση της RSG4 με την πεπτιδική αλληλουχία των οπιοειδών υποδοχέων που αντιστοιχεί στο i4 πεπτίδιο, επωάζονται αρχικά η His-RGS4 και το i4 πεπτίδιο με την αναγωγική ουσία DTT σε ξεχωριστές αντιδράσεις. Το DTT προκαλεί λύση των δεσμών S-S σε κάθε πρωτεΐνη, και με αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται ο ενδεχόμενος αυθόρμητος σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ του i4 πεπτιδίου και της RGS4 μέσω δεσμών S-S μεταξύ των κυστεϊνών που διαθέτουν και τα δυο πεπτίδια, όταν ακολουθήσει αντίδραση συνεπώασης μεταξύ τους. Με αυτήν την διαδικασία δεν οδηγούμαστε σε λάθος συμπεράσματα για το σγηματισμό συμπλόκων μεταξύ RGS4 και i4 πεπτιδίου. Έτσι, επωάζονται 16 μg (0.62 nmol) της RGS4 με 1 mM τελική συγκέντρωση DTT σε δισαπεσταγμένο νερό, για κάθε δείγμα αντίδρασης αλληλεπίδρασης που έχουμε σχεδιάσει (Πίνακας 25). Παράλληλα, επωάζονται 840 μM του i4 πεπτιδίου με 4 mM DTT καθώς και 1 mM του NH<sub>2</sub> πεπτιδίου με 4 mM DTT σε δισαπεσταγμένο νερό (όλες είναι τελικές συγκεντρώσεις και υπολογίζουμε ένα γενικό μίγμα για όλες τις αντιδράσεις αλληλεπίδρασης). Η επώαση κάθε πεπτιδίου με το DTT διαρκεί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η RGS4 συνεπωάζεται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του i4 πεπτιδίου (τελικές συγκεντρώσεις 10-500 μΜ) σε διάλυμα δισαπεσταγμένου Η2Ο τελικού όγκου 10 μL (τελική συγκέντρωση RGS4, 62 μM). Η επώαση γίνεται σε πάγο (4°C) για 2 ώρες. Ακολουθεί προσθήκη στα δείγματα από 10 μL 2x sample buffer (όχι βράσιμο) και ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα.

Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες: Πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι η μη αποδιαταγμένη His-RGS4 διαφεύγει από το πήκτωμα του ακρυλαμιδίου και κατευθύνεται προς την άνοδο, όταν χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης. Αυτό συμβαίνει διότι η His-RGS4 είναι βασική πρωτεΐνη (pI

8,69) και αποκτά θετικό φορτίο σε pH 8,3 , όπως είναι το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης στην SDS-PAGE. Για το λόγο αυτό, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και το διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μέθοδο έχουν όξινο pH (pH 4,4) για να προσδίδουν στην RGS4 ισχυρό θετικό φορτίο, ενώ παράλληλα αντιστράφηκαν οι πόλοι της ηλεκτροφόρησης. Με αυτόν τον τρόπο η θετικά φορτισμένη His-RGS4 εισέρχεται και μετακινείται μέσα στο πήκτωμα. Στις ίδιες συνθήκες το i4 πεπτίδιο (DENFKRCFRQLC) αποκτά επίσης θετικό φορτίο (έχει pI 8,06) και μετακινείται και αυτό μέσα στο πήκτωμα.

Αντιδράσεις	Τελικές ποσότητες ή συγκεντρώσεις αντιδρώντων		
επώασης/συνεπώασης	RGS4	ί4 πεπτίδιο	DTT
RGS4 + DTT	16 μg (0,62 nmol) ανά	-	1 mM
	αντίδραση		
i4 πεπτίδιο + DTT	-	840 µM	4 mM
NH2 πεπτίδιο + DTT	-	1 mM	4 mM
	16 μg (62 μM)	10 µM	
RGS4 + i4 πεπτίδιο σε DTT	16 μg (62 μM)	100 µM	
(τελικός όγκος 10 μL)	16 μg (62 μM)	300 µM	x
	16 μg (62 μM)	500 µM	
RGS4 + NH2 πεπτίδιο σε DTT	16 μg (62 μM)	100 µM	
	16 μg (62 μM)	500 μM	-

Πίνακας 25. Αντιδράσεις επώασης πεπτιδίων για την ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων RGS4 πρωτεΐνης - i4 πεπτιδίου. Στο πάνω μέρος του πίνακα περιγράφονται οι αρχικές αντιδράσεις επώασης της RGS4 και του i4 πεπτιδίου με το DTT. Στο κάτω μέρος του πίνακα περιγράφονται οι αντιδράσεις συνεπώασης της RGS4 με το i4 πεπτίδιο και με το NH<sub>2</sub> πεπτίδιο, που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση των συμπλόκων RGS4 πρωτεΐνης - i4 πεπτιδίου στο πείραμα. Η συγκέντρωση του DTT σε αυτές τις συνεπωάσεις απεικονίζεται με X γιατί δεν έχει σημασία σε αυτό το στάδιο του πειράματος

Η παρασκευή του μη αποδιατακτικού πηκτώματος βασίζεται εν γένει στην ήδη αναφερόμενη διαδικασία (παράγραφος 3.3.5) με τις εξής διαφορές: δεν χρησιμοποιείται

το απορρυπαντικό SDS και στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται διάλυμα διαλυτοποίησης πρωτεϊνών που δεν περιέχει SDS, ενώ δεν ακολουθεί βρασμός. Το πήκτωμα διαχωρισμού που χρησιμοποιείται είναι 10% κ.ο. σε ακρυλαμίδιο – διςακρυλαμίδιο, ενώ δεν δημιουργείται διάλυμα επιστοίβαξης. Μετά τον πολυμερισμό του μη αποδιατακτικού πηκτώματος διαχωρισμού (30-45 λεπτά) και τη δημιουργία στο ίδιο μέσο των φρεατίων για τα δείγματα, τοποθετούνται με πολύ προσοχή τα δείγματα στο πήκτωμα με τη χρήση σύριγγας Hamilton. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 90 Volt για 50 λεπτά (οι πόλοι είναι ανεστραμμένοι και το μέτωπο δεν πρέπει να εξέλθει από το πήκτωμα). Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί χρώση με τη μέθοδο coomassie (βλ. παράγραφος 3.3.6) ή μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση: Για την ανοσοαποτύπωση, το μη αποδιατακτικό πήκτωμα επωάζεται για 45 λεπτά υπό ανάδευση σε διάλυμα μεταφοράς σε μεμβράνη, το οποίο περιλαμβάνει 1% SDS. Σε αυτή τη φάση δεν είναι απαραίτητη η έλλειψη αποδιατακτικών συνθηκών, καθώς τα πιθανά σύμπλοκα έχουν ήδη σχηματιστεί και διαχωριστεί και είναι έτοιμα να μεταφερθούν σε μεμβράνες PVDF. Το SDS φορτίζει αρνητικά τα πεπτίδια και η μεταφορά στην PVDF μεμβράνη γίνεται ευκολότερα, ενώ το πρότυπο διαχωρισμού των πιθανών συμπλόκων δεν μεταβάλλεται. Η μεταφορά των πρωτεϊνών και η ανοσοαποτύπωση γίνεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.7, η δε αναγνώριση της πρωτεΐνης RGS4 γίνεται με τη χρήση του αντι-His αντισώματος (μονοκλονικό, 631212, Clontech, αραίωση 1:3.000).

#### 3.4 Φαρμακολογικές Μέθοδοι

#### 3.4.1 Μελέτες εκτόπισης (displacement ή ψυχρός κορεσμός)

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να χαρακτηρίσουν φαρμακολογικά έναν υποδοχέα στηρίζονται στην αρχή ότι, όταν ένα δείγμα υποδοχέα επωάζεται με έναν προσδέτη του για αρκετό χρονικό διάστημα, τότε θα επέλθει κατάσταση ισορροπίας κατά την οποία δημιουργείται μια ποσότητα συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη. Αυτή η αρχή μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση (1):

#### $R + L \implies RL(1)$

Στην εξίσωση (1) με R συμβολίζεται ο υποδοχέας και με L ο προσδέτης, ενώ με RL το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη.

Ο προσδιορισμός της πρόσδεσης ενός μορίου σε έναν υποδοχέα σε κατάσταση ισορροπίας γίνεται με δυο τρόπους: τη μελέτη κορεσμού (saturation) ενός υποδοχέα σε έναν ιχνηθετημένο προσδέτη (θερμός κορεσμός) και τη μελέτη συναγωνιστικής εκτόπισης (displacement) (Kenakin, 2006). Η μελέτη θερμού κορεσμού παρακολουθεί άμεσα την πρόσδεση ενός μορίου ανίχνευσης (ραδιοσημασμένο, φθορίζον) στον υποδοχέα και προσδιορίζει το μέγιστο αριθμό θέσεων πρόσδεσης (αριθμός υποδοχέων) και την συγγένεια πρόσδεσης του προσδέτη, έχει όμως το μειονέκτημα ότι είναι απαραίτητο το μόριο να είναι ανιχνεύσιμο. Τα πειράματα συναγωνιστικής εκτόπισης αποσκοπούν στη μελέτη της ικανότητας μη ιχνηθετημένων προσδετών (ψυχροί προσδέτες) να συναγωνίζονται τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης στους υποδοχείς με έναν γνωστό και ιχνηθετημένο προσδέτη, και έτσι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγγένειας του ψυχρού προσδέτη για τον υποδοχέα. Εν ολίγοις, οι προς μελέτη ψυχροί προσδέτες χρησιμοποιούνται για να εκτοπίσουν τα προσδεδεμένα στους υποδοχείς μόρια ανίχνευσης και η μείωση στο σήμα χρησιμοποιείται για να ποσοτικοποιηθεί η συγγένεια των μελετούμενων μορίων.

Στα πειράματα συναγωνιστικής εκτόπισης, η συγκέντρωση του υποδοχέα, η συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου προσδέτη και ο χρόνος είναι σταθερά, ενώ η συγκέντρωση του ψυχρού προσδέτη είναι μεταβλητή. Όταν η συγκέντρωση του ψυχρού προσδέτη είναι μεταβλητή. Όταν η συγκέντρωση του ψυχρού προσδέτη είναι μεταβλητή. Όταν η συγκέντρωση του ψυχρού προσδέτη, όπως περιγράφεται από την εξίσωση (1). Με την αύξηση της συγκέντρωσης του ψυχρού προσδέτη, ο ψυχρός προσδέτης θα ανταγωνίζεται με τον ραδιοσημασμένο προσδέτη για τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα και επομένως και η συγκέντρωση του συμπλόκου υποδοχέας-ραδιοσημασμένος προσδέτης. Η εξίσωση που συνδέει τη συγκέντρωση του προσδεδεμένου ραδιοσημασμένο προσδέτη (Ι) είναι η (2):

$$\mathbf{B} = \frac{B_{\max} \cdot F}{F + K_D (1 + I / K_i)} \ (2)$$

 $B_{\text{max}}$ : ο μέγιστος αριθμός των θέσεων πρόσδεσης του υποδοχέα στο δείγμα

F: η συγκέντρωση του ελεύθερου ραδιοσημασμένου προσδέτη

K<sub>D</sub>: η σταθερά διάστασης που εκφράζει τη συγγένεια του ραδιοσημασμένου προσδέτη για τον υποδοχέα και είναι ουσιαστικά η συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου προσδέτη που έχει ως αποτέλεσμα 50% ειδική πρόσδεση στον υποδοχέα

K<sub>i</sub>: καλείται σταθερά εκτόπισης και εκφράζει τη συγγένεια του ψυχρού προσδέτη για τον υποδοχέα

Μια άλλη παράμετρος που προκύπτει από την εξίσωση (2) είναι η συγκέντρωση αναστολής 50% ή IC<sub>50</sub>, η οποία είναι η συγκέντρωση του ψυχρού προσδέτη που αναστέλει (εκτοπίζει) το 50% της ειδικής πρόσδεσης του ραδιοσημασμένου προσδέτη.

Στην παρούσα μελέτη τα πειράματα εκτόπισης πραγματοποιήθηκαν σε μεμβράνες από κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά το μ-OR, επισημασμένο με τον επίτοπο Glu-Glu (EE). Στόχος των πειραμάτων αυτών είναι η μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης RGS4 στην συγγένεια πρόσδεσης του υποδοχέα για τους αγωνιστές του.

#### <u>Διαλύματα και υλικά:</u>

**Ραδιοσημασμένη διπρενορφίνη**: [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνη, ειδική ενεργότητα (specific activity) 53 Ci/mmol (NET-1121, PerkinElmer)

Μη ραδιοσημασμένοι προσδέτες: ανταγωνιστής: ναλοξόνη, αγωνιστής: DAMGO

Puθμιστικό διάλυμα επώασης ανταγωνιστών: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 , 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: 50 mM Tris-HCl pH 7,5

**Υγρός σπινθηριστής**: 3% PPO (2,5-Diphenyloxazole), 0,3% POPOP (2,2'-(1,4-phenylene)bis[5-phenyl-oxazol]) σε τολουόλιο

Διάλυμα απομόνωσης μεμβρανών: βλ. παράγραφος 3.3.1

**Λοιπά υλικά**: φίλτρα ινών υάλου grade GF/B, κυκλικά (24 mm, 1821024 ή 25 mm, 1821025, Whatman) ή μεγάλα φύλλα για συσκευή Brandel (FP-100, Grade GF/B Fired, size 2 ¼" 12 ¼", Brandel Inc.)

#### Πειραματική διαδικασία:

Στα πειράματα συναγωνιστικής εκτόπισης οπιοειδών χρησιμοποιούνται μεμβρανικά παρασκευάσματα από κύτταρα ΕΕ-ΗΕΚ που έχουν παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.1. Πειράματα ειδικής πρόσδεσης του τριτιωμένου οπιοειδή ανταγωνιστή διπρενορφίνη ([<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνη) έδειξαν ότι οι μεμβράνες των ΕΕ-ΗΕΚ περιλαμβάνουν κατά μέσο όρο 3 pmol υποδοχέα ανά mgr πρωτεΐνης.

Το μεμβρανικό παρασκεύασμα των ΕΕ-ΗΕΚ κυττάρων κλασματώνεται σε πλαστικά σωληνάκια (20 μg πρωτεΐνης/σωληνάκι). Τα δείγματα αυτά επωάζονται με σταθερή συγκέντρωση 2,5 nM του ραδιοσημασμένου προσδέτη [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνη (πλησίον της σταθεράς συγγένειας K<sub>D</sub> της διπρενορφίνης για τον υποδοχέα), ο οποίος είναι διαλυμένος σε ρυθμιστικό διάλυμα επώασης ανταγωνιστών, και με αυξανόμενες συγκεντρώσεις «ψυχρού» μη ραδιοσημασμένου αγωνιστή DAMGO, σε ένα εύρος τιμών 10 nM-100 μM (τελικός όγκος 200 μL). Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 45 λεπτά και με αυτόν τον τρόπο, η ειδική πρόσδεση της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης που μετριέται σε κάθε δείγμα μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αγωνιστή DAMGO, ο οποίος εκτοπίζει την διπρενορφίνη από τις θέσεις πρόσδεσής της στους υποδοχείς (συναγωνιστική εκτόπιση). Η μη ειδική πρόσδεση της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης προσδιορίζεται παρουσία περίσσειας του μη ραδιοσημασμένου ανωνιστή ναλοξόνη (10 μM).

Μετά την επώαση τα δείγματα τοποθετούνται πάλι σε πάγο (για να σταματήσει η αντίδραση) και διηθούνται σε φίλτρα ινών ύαλου GF/B στην αυτοματοποιημένη συσκευή διήθησης M-24 της BRANDEL ή σε συσκευή διήθησης 1225 Sampling Manifold της Millipore (XX2702550). Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση με ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και τα φίλτρα τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 ή 10 mL υγρού σπινθηριστή. Τα φιαλίδια αναδεύονται ισχυρά και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Έπειτα, η ραδιενέργεια στα φιαλίδια προσδιορίζεται με μέτρηση της β-ακτινοβολίας σε έναν αναλυτή Tri-Carb 2100TR Liquid scintillation analyzer (PACKARD).

Στην περίπτωση των πειραμάτων συναγωνιστικής εκτόπισης όπου θέλουμε να προσδιορίσουμε την επίδραση της RGS4 πρωτεΐνης στην δυνατότητα πρόσδεσης του μ-OR για τον αγωνιστή DAMGO, οι μεμβράνες των ΕΕ-ΗΕΚ κυττάρων υπόκεινται αρχικά σε μια κατεργασία. Έτσι, οι μεμβράνες επωάζονται σε σωληνάκι Eppendorf με την ανασυνδιασμένη His-RGS4 τελικής συγκέντρωσης 0,5-1 μM, για 30 λεπτά υπό ανάδευση στους 4°C. Το διάλυμα των μεμβρανών παραμένει σε πάγο για ακόμα 1 ώρα χωρίς ανάδευση και ακολούθως κλασματώνεται σε πλαστικά σωληνάκια (20 μg πρωτεΐνης/σωληνάκι) για να ακολουθήσει η διαδικασία της συναγωνιστικής εκτόπισης, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Για να προσδιοριστεί η ειδική πρόσδεση για κάθε συγκέντρωση DAMGO, υπολογίζεται ο μέσος όρος της ολικής πρόσδεσης του ραδιενεργού για κάθε συγκέντρωση αγωνιστή (τριπλά δείγματα) και αφαιρείται από αυτόν ο μέσος όρος της μη ειδικής πρόσδεσης (δείγματα με ανταγωνιστή ναλοξόνη). Ως 100% ειδική πρόσδεση ορίζεται η πρόσδεσης στα δείγμα απουσία του ψυχρού αγωνιστή DAMGO. Το % ποσοστό ειδικής πρόσδεσης στα υπόλοιπα δείγματα που επωάστηκαν με αυξανόμενη συγκέντρωση DAMGO, υπολογίζεται με τη μέθοδο των τριών. Τα ζεύγη τιμών % ποσοστό ειδικής πρόσδεσης προς της συγκέντρωση του DAMGO για κάθε δείγμα απουτηώνονται σε σύστημα αξόνων, όπου ο άξονας χ απεικονίζει τα % ποσοστά ειδικής πρόσδεσης και ο άξονας ψ τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του DAMGO σε λογαριθμική κλίμακα. Με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος (OriginPro 7.5 της OriginLab) χαράσσεται η φθίνουσα σιγμοειδείς καμπύλη και υπολογίζεται η IC<sub>50</sub> για τις περιπτώσεις παρουσία ή απουσία RGS4.

#### 3.4.2 Μελέτη της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού cAMP

Οι οπιοειδείς υποδοχείς, ενεργοποιούμενοι από αγωνιστές, μεταβιβάζουν το ερέθισμα στις συζευγμένες Gi/o πρωτεΐνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της αδενυλικής κυκλάσης και την επακόλουθη μείωση του ενδοκυτταρικού cAMP.

Για τη μελέτη της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική προ-σήμανσης των κυτταρικών αποθεμάτων των νουκλεοτιδίων αδενίνης με χρήση πρόδρομων ραδιοσημασμένων μορίων αδενίνης (Strada et al., 1990, Wong, 1994). Συγκεκριμένα, στο θρεπτικό υλικό κυττάρων σε καλλιέργεια προστίθεται τριτιωμένη αδενίνη ([<sup>3</sup>H]-αδενίνη), η οποία ενσωματώνεται στα κύτταρα. Τα κύτταρα στη συνέχεια παράγουν ραδιοσημασμένα παράγωγα της αδενίνης (ATP, ADP, AMP, cAMP) και ακολούθως μελετώνται οι αλλαγές στη συσσώρευση του cAMP μετά από ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων με αγωνιστή, παρουσία ή απουσία της πρωτεΐνης RGS4 που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Για τον προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού cAMP αξιοποιείται τεχνική διαχωρισμού με διπλή κολώνα, που συνδυάζει κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία με Dowex και απορρόφηση σε οξείδιο αλουμίνας (alumina oxide), για να γίνει η απομόνωση του cAMP (Wong, 1994). Συγκεκριμένα, τα κυτταρικά λύματα περνούν από κολώνα Dowex και με αυτόν τον τρόπο επιτυγγάνεται η απομάκρυνση των αρνητικά φορτισμένων ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων αδενίνης με κλιμακούμενη σειρά, ανάλογα με το μέγεθος του αρνητικού τους φορτίου. Τα ραδιοσημασμένα AMP και cAMP ([<sup>3</sup>H]-AMP και [<sup>3</sup>H]-cAMP) έχουν το μικρότερο αρνητικό φορτίο (δυο και ένα αντίστοιχα) και αναγκάζονται να κινούνται με τον αργότερο ρυθμό, ενώ τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια αδενίνης εκλούονται από την κολώνα. Τα [<sup>3</sup>H]-AMP και [<sup>3</sup>H]-cAMP παράγωγα εκλούονται εν τέλει από την κολώνα Dowex με περίσσεια νερού και μεταφέρονται σε εν σειρά κολώνα οξειδίου της αλουμίνας, όπου προσδένεται το [3H]-cAMP. Ακολουθεί αποδέσμευση του [<sup>3</sup>H]-cAMP από την κολώνα αλουμίνας με προσθήκη ιμιδαζολίου και η συλλογή του [<sup>3</sup>H]-cAMP για τη μέτρηση της ραδιενέργειας του τριτίου σε αναλυτή υγρού σπινθηριστή. Κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων με αγωνιστή χρησιμοποιείται IBMX (3 Isobutyl-1-Methylxanthine) που είναι αναστολέας των φωσφοδιεστερασών (αποικοδομούν το cAMP), και φορσκολίνη που ενεργοποιεί απευθείας την παραγωγή υψηλών ποσοστών cAMP από την αδενυλική κυκλάση, για να μπορεί να είναι μετρήσιμη η μείωση των επιπέδων του cAMP που προκαλεί η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων από αγωνιστές.

#### <u>Διαλύματα και υλικά</u>:

Θρεπτικό υλικό κυττάρων: βλ. παράγραφο 3.1.2.2

**Ραδιενεργός αδενίνη**: [<sup>3</sup>H]-αδενίνη, ειδική ενεργότητα 23Ci/mmole (Amersham Pharmacia)

Αγωνιστές: Οπιοειδείς αγωνιστές (DSLET για τον δ-OR και DAMGO για τον μ-OR)

- **Διάλυμα IBMX**: 100 mM IBMX (3 Isobutyl-1-Methylxanthine) (Sigma, I7018) διαλυμένο σε DMSO
- Διάλυμα επώασης: 20 mM Hepes, pH 7,4 , 2 mM γλουταμίνη, 1x DMEM, ρύθμιση pH με KOH (δεν πρέπει να υπάρχουν ιόντα Na<sup>+</sup> στο διάλυμα). Πριν τη χρήση του διαλύματος προστίθεται IBMX τελικής συγκέντρωσης 1 mM
- Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης: 5% TCA (Trichloroacetic acid), 1 mM ATP, 1 mM cAMP (Παρασκευάζεται φρέσκο πριν από κάθε πείραμα)
- Στήλες χρωματογραφίας: κολώνες Dowex (AG 50W-X8 100-200 mesh hydrogen, 731-6214, BioRad), αλουμίνα (Aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) activity grade I, type WN3 neutral, A9003, Sigma-Aldrich)
- **Λοιπά υλικά**: 12-well plates, φορσκολίνη (Sigma, , F-6886), 0,1 Μ ιμιδαζόλιο, 1 Μ HCl, φιαλίδια υγρού σπινθηριστή

Υγρός σπινθηριστής: βλ. παράγραφος 3.4.1

#### Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα ΕΕ-ΗΕΚ293 που εκφράζουν σταθερά τον μ-OR, διαμολύνονται παροδικά με την HA-RGS4 ή HA-ΔNRGS4 ή κενό φορέα pcDNA3, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2.4. Μετά το πέρας της διαμόλυνσης (5-7 ώρες) τα κύτταρα τοποθετούνται την ίδια μέρα σε 12-well plates (επιφάνεια πηγαδιού 22 mm) και καλλιεργούνται στον κλίβανο επώασης. 16-18 ώρες μετά την διαμόλυνση (επόμενη μέρα) αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται νέο που περιέχει [<sup>3</sup>H]-αδενίνη (1,5 μCi/πηγαδάκι) για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται με 1 mL διαλύματος επώασης και προστίθεται στα πηγαδάκια νέο διάλυμα επώασης 1 mL το οποίο περιέχει 50 μM φορσκολίνη, παρουσία ή απουσία (κύτταρα μάρτυρες) του μ-οπιοειδούς αγωνιστή DAMGO (10 nM - 10 μM) για 45 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως το διάλυμα αφαιρείται σε κάθε δείγμα κυττάρων προστίθεται 1 mL από ψυχρό διάλυμα τερματισμού (4°C) και τα δείγματα παραμένουν σε αυτό για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια το διάλυμα κάθε δείγματος συλλέγεται σε σωληνάκια Eppendorf, αναδεύεται και φυγοκεντρείται στα 750 x g (3.000 rpm, φυγόκεντρος Eppendorf 5415C) για 10 λεπτά στους 4°C, ώστε να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά θραύσματα. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C για να συνεχιστεί το 2° μέρος άλλη μέρα ή μπορεί να ακολουθήσει άμεσα ο διαδοχικός διαχωρισμός του παραγόμενου cAMP από κολώνες.

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία, γίνεται εξισορρόπηση των κολώνων Dowex και αλουμίνας. Οι κολώνες Dowex εξισορροπούνται με 4 mL 1 M HCl και στη συνέχεια ξεπλένονται με 15 mL H<sub>2</sub>O. Οι κολώνες της αλουμίνας εξισορροπούνται με 2 mL 0,1 Μ ιμιδαζόλιο (4 φορές, σύνολο 8 mL). Το συλλεχθέν υπερκείμενο των δειγμάτων από το  $1^{\circ}$  μέρος τοποθετείται στις κολώνες Dowex μαζί με επιπλέον 3 ml H<sub>2</sub>O. Το υγρό που εξέρχεται από τις κολώνες σε αυτή τη διαδικασία συλλέγεται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 mL υγρού σπινθηριστή και μετριέται σε αναλυτή β-ακτινοβολίας Tri-Carb 2100TR Liquid scintillation analyzer (PACKARD). Οι μετρήσεις που λαμβάνονται αντιστοιχούν στη ραδιενέργεια που οφείλεται στην παρουσία των [<sup>3</sup>H]-ATP και [<sup>3</sup>H]-ADP. Στη συνέχεια οι κολώνες Dowex ξεπλένονται με περίσσεια  $H_2O$  (10 mL) πάνω από τις κολώνες της αλουμίνας που βρίσκονται τοποθετημένες εν σειρά, έτσι ώστε το ραδιενεργό cAMP να εισέλθει αμέσως από τις κολώνες Dowex στις κολώνες αλουμίνας. Το [<sup>3</sup>H]-cAMP προσδένεται στο οξείδιο της αλουμίνας, και με την προσθήκη 6 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 0,1 Μ στην κολώνα αλουμίνας, εκλούεται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 mL υγρού σπινθηριστή. Τα φιαλίδια αναδεύονται και τοποθετούνται στον αναλυτή για τη μέτρηση της ραδιενέργειας. Τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα υπολογίζονται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

Συσσώρευση cAMP = 
$$\frac{[^{3}H] - cAMP}{[^{3}H] - cAMP + [^{3}H] - AXP}$$

όπου [<sup>3</sup>H]-cAMP η μέτρηση του αναλυτή για τα επίπεδα του ραδιοσημασμένου cAMP και [<sup>3</sup>H]-AXP η μέτρηση για τα επίπεδα των [<sup>3</sup>H]-ATP και [<sup>3</sup>H]-ADP του ίδιου δείγματος (οπότε το άθροισμα [<sup>3</sup>H]-cAMP + [<sup>3</sup>H]-AXP αντιστοιχεί στα συνολικά ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια αδενίνης).

Οι τιμές του cAMP που παίρνουμε για κάθε δείγμα είναι απόλυτες τιμές και χρειάζεται να μετατραπούν σε επί τοις εκατό ποσοστά. 100% συσσώρευση cAMP αντιστοιχεί στην απόλυτη τιμή του δείγματος από κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί μόνο με φορσκολίνη (δείγμα αναφοράς). Με βάση αυτό το δεδομένο υπολογίζονται τα επί τοις εκατό ποσοστά συσσώρευσης cAMP των υπολοίπων δειγμάτων (μέθοδος των τριών). Τα ζεύγη τιμών «επί τοις εκατό ποσοστό cAMP» προς τη «συγκέντρωση του DAMGO» κάθε δείγματος αποτυπώνονται σε σύστημα αξόνων, όπου ο άξονας ψ περιλαμβάνει τα επί τοις εκατό ποσοστά και ο άξονας χ την αντίστοιχη συγκέντρωση του DAMGO σε λογαριθμική κλίμακα. Με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος (OriginPro 7.5 της OriginLab) αποτυπώνονται οι σιγμοειδείς καμπύλες και υπολογίζονται οι IC<sub>50</sub> για τις τρεις περιπτώσεις παρουσία HA-RGS4, HA-ΔNRGS4 ή κενού φορέα pcDNA3.

4. Αποτελέσματα

# 4.1 Κατασκευή και έκφραση χιμαιρικών πεπτιδίων της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και των καρβοξυτελικών άκρων των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων

Τα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ-OR (μ-CT, δ-CT) αποτελούνται από 63 και 55 αμινοξέα αντίστοιχα και αντιπροσωπεύουν τις μεγαλύτερες ενδοκυτταρικές περιοχές αυτών των υποδοχέων. Η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά των οπιοειδών υποδοχέων (i3L) αποτελείται από 23 αμινοξέα (Σχήμα 11Α και Β) και φέρει δομικά μοτίβα υπεύθυνα α) για τη σύζευξη των υποδοχέων με τις G πρωτεΐνες, β) για την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και γ) για την εξειδίκευση της σηματοδότησης. Τόσο η τρίτη θηλιά όσο και τα καρβοξυτελικά άκρα των υποδοχέων αυτών είναι σημεία αλληλεπίδρασης με πολλές διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και ευθύνονται επίσης για την απευαισθητοποίηση των υποδοχέων αυτών (Cen et al., 2001β).

Σε μια προσπάθεια να προσδιορίσουμε κατά πόσο οι ενδοκυτταρικές περιοχές των οπιοειδών υποδοχέων λειτουργούν σαν σημεία άμεσης επαφής με τις G πρωτεΐνες, αλλά και με νέες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιήσαμε έναν αριθμό GST-χιμαιρικών πεπτιδίων που περιλαμβάνουν τα καρβοξυτελικά τμήματα των μ- και δ-OR (αμινοξέα S329 – P398 και S311 – A372 αντίστοιχα) καθώς και την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του δ-OR (αμινοξέα R239 – R261), τα οποία και ονομάσαμε μ-CT, δ-CT και δ-i3L αντίστοιχα. Τα χιμαιρικά αυτά πεπτίδια τα εκφράσαμε και τα απομονώσαμε από βακτηριακά κύτταρα, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (παράγραφος 3.3.3). Για να πιστοποιήσουμε την έκφραση τους, τα GST-χιμαιρικά πεπτίδια ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης και έγινε έκλουση με 1 mM γλουταθειόνης. Στο Σχήμα 11Γ, φαίνονται τα πεπτίδια μετά από SDS-PAGE και χρώση με Coomassie, όπου εμφανίζονται οι πρωτεΐνες σε συγκεκριμένα μοριακά βάρη: GST πρωτεΐνη: 26 KDa, GST- $\delta$ -i3L: 31 KDa, GST- $\delta$ -CT: 33 KDa, GST- $\mu$ -CT: 35 KDa.  $\Sigma \tau o \Sigma \chi \eta \mu \alpha$  11 $\Delta$ φαίνονται τα ίδια πεπτίδια μετά από μεταφορά σε μεμβράνη και ανοσοεντόπιση έναντι του GST επιτόπου. Η καθαρότητα των απομονωμένων χιμαιρικών πεπτιδίων είναι αρκετά υψηλή και η συγκέντρωση αυτών κυμαίνεται μεταξύ 0,2-0,4 mg/mL.



#### B

#### Καρβοζυτελικά άκρα

#### μ-CT αρουραίου: 329 SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSTRVRQNTR EHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398

### **δ-CT ποντικού:** 311 **SSLNPVLYAFLDENFKRCFRQL**CRTPCGRQEPGSLRRPRQAT TRERVTACTPSDGPGGGAAA 372

#### Τρίτες ενδοκυτταρικές θηλιές





#### Σχήμα 11. GST-χιμαιρικά πεπτίδια. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση των ενδοκυτταρικών περιοχών των οπιοειδών υποδοχέων. Απεικονίζεται η αμινοξική αλληλουχία της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού άκρου του μ-OR μέχρι την κυστεΐνη που παλμιτυλιώνεται. Με κόκκινο αποτυπώνονται οι αμινοξικές διαφορές που παρατηρούνται στην αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των μ- και δ-OR. (Β) Απεικονίζονται οι αμινοξικές αλληλουχίες των μ-OR και δ-OR που χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθούν τα GST-χιμαιρικά πεπτίδια. Με έντονα γράμματα σημειώνονται τα ομόλογα, συντηρημένα αμινοξέα των καρβοξυτελικών άκρων, μέχρι την κυστεΐνη που παλμιτυλιώνεται (μπλε γράμματα), ενώ με κόκκινα γράμματα σημειώνονται τα διαφορετικά αμινοξέα στο ίδιο τμήμα του δ-CT. Στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά, με κόκκινα

γράμματα σημειώνονται οι διαφορές στα αμινοξέα του δ-OR έναντι του μ-OR. (Γ, Δ) Ηλεκτροφόρηση των απομονωμένων GST-χιμαιρικών πεπτιδίων και χρώση με coomassie ή ανοσοαποτύπωση αντίστοιχα. Με GST συμβολίζονται οι διαδρομές που περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη GST χωρίς ένθεμα, ενώ στις διαδρομές που συμβολίζονται με δ-i3L, δ-CT και μ-CT έχουν διαχωριστεί τα GST-πεπτίδια που παρασκευάστηκαν από την τρίτη θηλιά του δ-OR, από το καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR και από το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, αντίστοιχα. (Γ) Χρώση των πεπτιδίων με coomassie. (Δ) Περίπου 5 nmoles από κάθε χιμαιρική πρωτεΐνη φορτώθηκαν στις αντίστοιχες διαδρομές. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με αντίσωμα έναντι του GST επιτόπου (αντι-GST, B-14, sc-138, Santa Cruz, αραίωση 1:5.000).

Για μια πιο ενδελεχή in vitro μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυτελικών άκρων των μ- και δ-OR με άλλες πρωτεΐνες, κατασκευάστηκαν επίσης δυο MBP-χιμαιρικές πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύουν επίσης τα καρβοξυτελικά άκρα του μ-OR (MBP-μ-CT) και δ-OR (MBP-δ-CT). Η παραγωγή και πιστοποίηση της έκφρασης των MBP-μ-CT και MBP-δ-CT χιμαιρικών πεπτιδίων έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.3. Στο Σχήμα 12, φαίνονται οι ζώνες που αντιπροσωπεύουν τα νεοσυντιθέμενα MBP-χιμαιρικά πεπτίδια μετά από διαχωρισμό σε πήκτωμα ακρυλαμυδίου και ανοσοεντόπιση έναντι του επιτόπου MBP. Τα μοριακά βάρη των χιμαιρικών πεπτιδίων υπολογίστηκαν ως εξής: MBP-μ-CT: 53 KDa, MBP-δ-CT: 51 KDa, MBP-lacZa: 52 KDa (προέρχεται από την έκφραση της πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον φορέα pMAL απουσία ενθέματος). Η καθαρότητα των απομονωμένων χιμαιρικών πεπτιδίων είναι αρκετά υψηλή και η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 0,3-0,4 mg/mL.



**MBP** χιμαιρικά τμήματα

Σχήμα 12. MBP-χιμαιρικά πεπτίδια των καρβοξυτελικών άκρων του μ-OR και δ-OR. Με μ-CT και δ-CT συμβολίζονται οι διαδρομές που αντιστοιχούν στα χιμαιρικά πεπτίδια MBP-μ-CT και MBPδ-CT, αντίστοιχα, ενώ με MBP-lacZa συμβολίζεται μια MBP χιμαιρική πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας στα πειράματα πρόσδεσης. Ποσότητα 3-4 μg των MBPχιμαιρικών πρωτεϊνών από βακτηριακά λύματα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου πυκνότητας 12%. Ακολούθησε μεταφορά σε PVDF μεμβράνη και ανοσοεντόπιση με αντίσωμα έναντι του MBP επιτόπου (αντι-MBP, E8030, New England Biolabs, αραίωση 1:10.000). Τα μοριακά βάρη των συντηγμένων πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με βάση μαρτύρων γνωστών μοριακών βαρών και σε σύγκριση με την πρωτεΐνη MBP-lacZa.

### 4.2 Προσδιορισμός της *in vitro* αλληλεπίδρασης των οπιοειδών υποδοχέων με πρωτεΐνες του κύκλου ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών

# 4.2.1 Η RGS4 προσδένεται στις ενδοκυτταρικές περιοχές των οπιοειδών υποδοχέων

Πρόσφατες παρατηρήσεις, όπως προαναφέρθηκε, δηλώνουν ότι οι RGS πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης των GPCR υποδοχέων. Αρχικές μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι η RGS4 αλληλεπιδρά απευθείας με το καρβοζυτελικό άκρο του μ-OR. Για να διαπιστώσουμε αν και ο δ-OR αλληλεπιδρά με την RGS4 στο καρβοζυτελικό άκρο αλλά και στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά, έγιναν *in vitro* πειράματα πρόσδεσης με τη χρήση των GST-χιμαιρικών πεπτιδίων των ενδοκυτταρικών τμημάτων του υποδοχέα, παρουσία της ανασυνδιασμένης RGS4 πρωτεΐνης, η οποία φέρει τον αντιγονικό επίτοπο 6xHis (His-RGS4). Επώαση των GSTχιμαιρικών πεπτιδίων δ-CT και δ-i3L με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1-1,5 μM της His-RGS4 (Σχήμα 13, διαδρομές 2-5) έδειξε την παρουσία μιας ζώνης 26 KDa που αντιστοιχεί στην RGS4 πρωτεΐνη. Αντίθετα, η απουσία παρόμοιας ζώνης στις διαδρομές 6 και 7, όπου η RGS4 έχει επωαστεί με την πρωτεΐνη GST, δηλώνει ότι η RGS4 προσδένεται ειδικά στα χιμαιρικά πεπτίδια και όχι στην πρωτεΐνη GST (αρνητικός μάρτυρας).



Σχήμα 13. Αλληλεπίδραση της RGS4 με τα GST-χιμαιρικά πεπτίδια δ-CT και δ-i3L. 0,5 μΜ των GST-χιμαιρικών πεπτιδίων του δ-CT και της δ-i3L επωάζονται με 1 και 1,5 μΜ της απομονωμένης His-RGS4 (διαδρομές 2-5). Επίσης, 0,5 μΜ της καθαρής GST πρωτεΐνης επωάζονται με τις ίδιες ποσότητες της His-RGS4 (διαδρομές 6, 7). Ακολουθούν πλύσεις και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12%. Μετά από μεταφορά σε PVDF μεμβράνη, η His-RGS4 στα δείγματα ανοσοεντοπίζεται με ένα αντίσωμα έναντι του επιτόπου 6xHis (αντι-His, 631212, Clontech, αραίωση 1:3.000). Στην διαδρομή 1 αντιπροσωπεύεται η απομονωμένη και καθαρή His-RGS4 (1,1 μg).

Για να επαληθεύσουμε την πρόσδεση της πρωτεΐνης RGS4 στα καρβοξυτελικά τμήματα των μ- και δ-ORs, πραγματοποιήσαμε επιπλέον *in vitro* πειράματα πρόσδεσης με τη χρήση των MBP-χιμαιρικών πεπτιδίων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 14, επώαση των MBP-χιμαιρικών μ-CT και δ-CT με την RGS4 πρωτεΐνη και συνεπακόλουθη ανοσοεντόπιση με το αντι-His αντίσωμα, έδειξε την παρουσία ενός πολυπεπτιδίου 26 KDa που αντιστοιχεί στην RGS4. Αντίθετα, παρόμοια πειράματα με τη χρήση μιας MBP-χιμαιρική πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (MBP-lacZa) δεν έδειξαν την παρουσία αντίστοιχης ζώνης για την RGS4. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι τα MBP χιμαιρικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων, προσδένουν την RGS4 και δηλώνουν ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με τις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ-ORs.



Σχήμα 14. Άμεση αλληλεπίδραση της RGS4 με τα MBP-χιμαιρικά πεπτίδια μ-CT, δ-CT και δi3L. Τα MBP-δ-CT και MBP-μ-CT (0,5 μM) επωάστηκαν με αυξανόμενες ποσότητες His-RGS4 (0,1 μM, 0,3 μM, 0,5 μM). Διαδρομή 1, καθαρή His-RGS4. Διαδρομές 2-4, επώαση MBP-δ-CT με His-RGS4 0,1, 0,3 και 0,5 μM αντίστοιχα. Διαδρομές 5-7, επώαση MBP-μ-CT με His-RGS4 0,1, 0,3 και 0,5 μM αντίστοιχα. Διαδρομές 8-10, επώαση 0,5 μM MBP-lacZa (αρνητικός μάρτυρας) με τις ίδιες ποσότητες της His-RGS4. Οι ποσότητες των MBP-πρωτεϊνών επαληθεύτηκαν μετά από απομάκρυνση του αντι-His αντισώματος και ανοσοεντόπιση με το αντι-MBP αντίσωμα (αραίωση 1:1.000).

# 4.2.2 Οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ-OR

Οι Gβγ υπομονάδες των G πρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος των GPCRs μέσω πολλών διαφορετικών τελεστών, όπως είναι τα κανάλια ιόντων K<sup>+</sup> και Ca<sup>+2</sup>, οι MAPKs, η αδενυλική κυκλάση και η PLCβ (Clapham and Neer, 1997, Smrcka, 2008). Λίγα, όμως, είναι γνωστά για το ρόλο των Gβγ υπομονάδων στη μετάδοση του σήματος των οπιοειδών υποδοχέων και εάν οι υπομονάδες αυτές αλληλεπιδρούν απευθείας με τους οπιοειδείς υποδοχείς. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε κατά πόσο οι Gβγ υπομονάδες ενδεχομένως προσδένονται στους μ- και δ- οπιοειδείς υποδοχείς, μέσω των ενδοκυτταρικών περιοχών τους. Αρχικά πειράματα πρόσδεσης του εργαστηρίου μας χρησιμοποιώντας την GST-χιμαιρική πρωτεΐνη του μ-CT έδειξαν ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται απευθείας σε αυτό το τμήμα του μ-OR (Georgoussi et al., 2006). Για να διαπιστωθεί κατά πόσο η πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο μ-CT επηρεάζεται από την παρουσία των Ga υπομονάδων, έγιναν αντίστοιχα πειράματα με το ίδιο GST-χιμαιρικό (μ-CT) και την ανενεργή και ετεροτριμερή Gt (Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>) πρωτεΐνη, τα οποία έδειξαν ότι η επώαση της Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> με το μ-CT οδηγεί επίσης σε πρόσδεση του συμπλόκου Gβγ σε αυτό το τμήμα του υποδοχέα.

Για να προσδιοριστεί εάν και ο δ-OR αλληλεπιδρά απευθείας με τις Gβγ υπομονάδες ή εάν υπάρχει διαφορετικό προφίλ πρόσδεσης των Gβy υπομονάδων σε αυτόν τον υποδοχέα, πραγματοποιήσαμε αντίστοιχα πειράματα in vitro πρόσδεσης χρησιμοποιώντας την ακινητοποιημένη GST-χιμαιρική πρωτεΐνη του δ-CT και αυξανόμενες συγκεντρώσεις της Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> ή της ετεροτριμερούς Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, που προέρχονται από αμφιβληστροειδή βοός. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 15, μετά από διαδικασία SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και ανοσοεντόπιση με αντίσωμα έναντι της Gβ υπομονάδας, ανιχνεύθηκε μια ζώνη που αντιπροσωπεύει ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 36 KDa που αντιστοιχεί στην Gβ υπομονάδα. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι το δ-CT αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα GBy είτε αυτά προέρχονται από την ετεροτριμερή Gt πρωτεΐνη είτε από τα Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> διμερή σύμπλοκα. Η πρόσδεση γίνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και διαφαίνεται ότι η συγγένεια πρόσδεσης των Gβy υπομονάδων για το δ-CT είναι μεγάλη, καθώς μικρές συγκεντρώσεις της Gβγ (0,1-0,5 μM) είναι αρκετές για να παρατηρηθεί η πρόσδεση. Αντίθετα, στην περίπτωση επώασης με την GST πρωτεΐνη, δεν παρατηρείται καμία πρόσδεση.



Σχήμα 15. Οι Gβγ υπομονάδες από το σύμπλοκο Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> ή από την ετεροτριμερή Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> πρωτεΐνη αλληλεπιδρούν με το δ-CT. Σταθερή ποσότητα (0,5 μM) της GST-δ-CT επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,1,0,2 και 0,5 μM) της Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> ή της ετεροτριμερούς Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, οι οποίες απομονώθηκαν από τον αμφιβληστροειδή βοός όπως αναφέρεται στους Mazzoni et al., 1991. Διαδρομές 2-4, επώαση της GST-δ-CT με 0,1,0,2 και 0,5 μM Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, αντίστοιχα. Διαδρομές 5-7, επώαση 0,5 μM GST πρωτεΐνης με 0,1,0,2 και 0,5 μM Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αντίστοιχα. Διαδρομές 8-10, επώαση GST-δ-CT με 0,1,0,2 και 0,5 μM Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αντίστοιχα. Διαδρομές 11 και 12, επώαση 0,5 μM GST πρωτεΐνης με 0,1 και 0,2 μM Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, αντίστοιχα. Διαδρομή 1, απομονωμένο και καθαρό διμερές Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> (1,8 μg). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα 12% και η Gβ υπομονάδα ανιχνεύτηκε με ένα αντι-Gβ αντίσωμα (T20, sc-378, Santa Cruz, αραίωση 1:5.000). Η ποσότητα των GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε μετά την απομάκρυνση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη και νέα ανοσοαποτύπωση με το αντι-GST αντίσωμα (1:5.000).

Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε όταν προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε εάν και άλλα ενδοκυτταρικά τμήματα εκτός των καρβοξυτελικών άκρων των οπιοειδών υποδοχέων, όπως η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά, προσδένουν τις Gβγ υπομονάδες. Γνωρίζοντας ότι οι μ- και δ-OR έχουν μεγάλο βαθμό ομολογίας στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά (Σχήμα 11B), χρησιμοποιήσαμε την GST-χιμαιρική πρωτεΐνη που αντιπροσωπεύει την δ-i3L. Η δ-i3L επωάσθηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> ή της ετεροτριμερούς Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 16, σε συγκεντρώσεις της Gβγ 0,1-0,5 μΜ (διαδρομές 2-4) ή της Gtaβγ 0,1-0,2 μΜ (διαδρομές 7 και 9) εμφανίζεται μια ζώνη 36 KDa που αντιπροσωπεύει την Gβ υπομονάδα, μετά από ανοσοεντόπιση με το αντι-Gβ αντίσωμα, αποτέλεσμα το οποίο δηλώνει την αλληλεπίδραση της δ-i3L με το σύμπλοκο Gβγ. Αντίθετα, όταν ανάλογο πείραμα γίνεται παρουσία μόνο της GST πρωτεΐνης (διαδρομές 5, 6 και 8), δεν εμφανίζεται καμιά ζώνη. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν απευθείας με τα ενδοκυτταρικά τμήματα των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων όπως είναι τα μ-CT, δ-CT και δ-i3L, η δε προέλευση των G πρωτεϊνών (εάν είναι απομονωμένα σύμπλοκα ή μέρος της ετεροτριμερούς G πρωτεΐνης) δεν επηρεάζει την πρόσδεσή τους.



Σχήμα 16. Οι Gβγ υπομονάδες από τις απομονωμένες Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> ή την ετεροτριμερή Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αλληλεπιδρούν με την δ-i3L. Διαδρομές 2-4, επώαση της GST-δ-i3L (0,5 μM) με 0,1, 0,2 και 0,5 μM Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αντίστοιχα. Διαδρομές 5 και 6, επώαση της GST πρωτεΐνης με 0,1 και 0,2 μM Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αντίστοιχα. Διαδρομές 7 και 9, επώαση GST-δ-i3L με 0,1 και 0,2 μM Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αντίστοιχα. Διαδρομή 8, επώαση της GST πρωτεΐνης με 0,1 μM Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>. Στη διαδρομή 1 όλων των πειραμάτων αντίπροσωπεύονται οι καθαρές Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> υπομονάδες. Η Gβ υπομονάδα ανιχνεύτηκε με ένα αντι-Gβ αντίσωμα (T20, sc-378, Santa Cruz, αραίωση 1:5.000). Η ποσότητα των GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε μετά από απομάκρυνση του αντι-Gβ αντισώματος και ανοσοαποτύπωση με το αντι-GST αντίσωμα (1:5.000).

Γνωρίζοντας ότι οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ-OR, επαληθεύσαμε τα αποτελέσματά μας χρησιμοποιώντας για μια ακόμη φορά το *in vitro* σύστημα πρόσδεσης με τις MBP-χιμαιρικές πρωτεΐνες, ώστε να εξακριβωθεί η συγγένεια δέσμευσης των Gβγ υπομονάδων στα μ- και δ-CT. Τα MBP-χιμαιρικά πεπτίδια των μ-CT και δ-CT ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αμυλόζης-αγαρόζης και επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>. Ακολούθησε ανοσοεντόπιση με το αντίσωμα έναντι της Gβ, η οποία έδειξε την παρουσία ενός πολυπεπτιδίου 36 KDa που αντιστοιχεί στην Gβ υπομονάδα (Σχήμα 17). Η πρόσδεση των Gβ υπομονάδων στα καρβοξυτελικά άκρα είναι εμφανής στη συγκέντρωση 0,3 μΜ των Gβγ υπομονάδων (διαδρομές 4 και 7). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι οι Gβγ υπομονάδες των G πρωτεϊνών προσδένονται με μεγάλη συγγένεια στα μ- και δ-CT και ότι η πρόσδεση αυτή παρατηρείται ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις του συμπλόκου των Gβγ.



Σχήμα 17. Οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τις MBP-χιμαιρικές πρωτεΐνες των μ- και δ-CT. Περίπου 1 μΜ των συντηγμένων MBP-δ-CT και MBP-μ-CT, καθώς και της πρωτεΐνης-μάρτυρα MBP-lacZa, επωάστηκαν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> υπομονάδων (0,1 μΜ, 0,2 μΜ, 0,3 μΜ). Μετά από πλύσεις, οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν και ακολούθησε ανοσοεντόπιση με το αντι-Gβ αντίσωμα (αραίωση 1:5.000). Διαδρομή 1, καθαρή Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>. Διαδρομές 2-4, επώαση MBP-δ-CT με Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> 0,1, 0,2 και 0,3 μΜ αντίστοιχα. Διαδρομές 5-7, επώαση MBP-μ-CT με Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> 0,1, 0,2 και 0,3 μΜ αντίστοιχα. Διαδρομές 8-10, επώαση MBP-lacZa (αρνητικός μάρτυρας) με τις ίδιες ποσότητες της Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αντίστοιχα. Οι ποσότητες των συντηγμένων πρωτεϊνών και του μάρτυρα MBP lacZa πιστοποιήθηκαν μετά από απομάκρυνση του αντισώματος και ανοσοεντόπιση της ίδιας μεμβράνης με το αντι-MBP αντίσωμα (αραίωση 1:10.000).

#### 4.2.3 Διαφορική πρόσδεση των Ga πρωτεϊνών στις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ-OR

Γνωρίζοντας ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στα μ- και δ-CT καθώς και στην δ-i3L, και μάλιστα προερχόμενες από την ετεροτριμερή διαμόρφωση της G πρωτεΐνης (Gαβγ), προσδιορίσαμε κατά πόσο οι περιοχές αυτές των οπιοειδών υποδοχέων ευθύνονται για την άμεση αλληλεπίδραση και των Ga υπομονάδων. Για τον σκοπό αυτό έγιναν παρόμοια πειράματα πρόσδεσης pull down με τη χρήση των GST-χιμαιρικών πεπτιδίων (μ-CT, δ-CT, δ-i3L) και της ετεροτριμερούς Gt (Gtaβγ) ή των απομονωμένων Gta υπομονάδων στην ενεργή ή ανενεργή διαμόρφωση.

Προκαταρκτικά πειράματα του εργαστηρίου έδειξαν ότι επώαση του ακινητοποιημένου GST-χιμαιρικού μ-CT πεπτιδίου με την Gta δεν οδηγεί σε αλληλεπίδραση της Gta με το μ-CT, σε οποιαδήποτε διαμόρφωση κι αν βρίσκεται η πρωτεΐνη αυτή, δηλαδή στην ετεροτριμερή Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, ανενεργή GtaGDP ή ενεργή GtaGTPγS διαμόρφωσή της. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν επίσης όταν το μCT επωάστηκε και με τις Gai και Gao υπομονάδες, που είναι οι G πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι οπιοειδείς υποδοχείς.



**Σχήμα 18. Πρόσδεση της Ga υπομονάδας στο δ-CT.** (A) H Ga υπομονάδα από την ετεροτριμερή Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> αλληλεπιδρά με το δ-CT με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Σταθερή ποσότητα του GST-χιμαιρικού δ-CT επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ετεροτριμερούς Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> 0,25, 0,5 και 1 μM (διαδρομές 2-4 αντίστοιχα). Διαδρομές 5-7, GST πρωτεΐνη επωάστηκε με τις ίδιες ποσότητες Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>. Η διαδρομή 1 αντιπροσωπεύει απομονωμένη ετεροτριμερή Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> (2,5 μg). (B) H Ga υπομονάδα στην ανενεργή διαμόρφωση προσδένεται στο δ-CT. Σταθερή ποσότητα του GST-δ-CT επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GtaGDP 0,5 και 1 μM (διαδρομές 2 και 4). Διαδρομές 3 και 5, GST πρωτεΐνη επωάστηκε με τις ίδιες ποσότητες GtaGDP. Διαδρομή 1, καθαρή GtaGTP (1,6 μg). (Γ) Η ενεργή Ga προσδένεται ασθενώς στο δ-CT. Σταθερή ποσότητα GST-δ-CT επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της GtaGTPγS (0,1, 0,2 και 0,5 μM, διαδρομές 2-4 αντίστοιχα). Διαδρομή 5, GST πρωτεΐνη επωάστηκε με 0,5 μM GtaGTPγS. Η διαδρομή 1 αντιπροσωπεύει την καθαρή GtaGTPγS (0,2 μg). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε 12% πήκτωμα, ενώ σε όλα τα ανοσοαποτυπώματα η Gα ανιχνεύθηκε με τη χρήση ενός αντισώματος έναντι της Ga (OC1, αραίωση 1:1.000). Οι ποσότητες των GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκαν μετά από νέα ανοσοαποτύπωση στην ίδια μεμβράνη με το αντι-GST αντίσωμα (αραίωση 1:5.000).

Με γνώμονα αυτά τα αποτελέσματα ελέγξαμε εάν οι Ga υπομονάδες προσδένονται στις ενδοκυτταρικές περιοχές του δ-OR, όπως είναι το δ-CT και η δ-i3L. Περίπου 1 μΜ

από το ακινητοποιημένο δ-CT επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ετεροτριμερούς Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> ή της ανενεργής GtaGDP και ακολούθησε ανοσοεντόπιση με αντίσωμα έναντι της Ga υπομονάδας (Σχήμα 18Α και Β). Στο ανοσοαποτύπωμα παρατηρήσαμε ένα πολυπεπτίδιο περίπου 40 KDa που αντιστοιχεί στην Gta υπομονάδα, κάτι που υποδεικνύει ότι η Ga υπομονάδα, τόσο στην ετεροτριμερή όσο και στην ανενεργή, μονομερή διαμόρφωση, προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR. Για να προσδιορίσουμε κατά πόσο η ενεργή διαμόρφωση (GaGTPγS) της Ga υπομονάδας προσδένεται στο δ-CT, ακινητοποιήσαμε το GST-γιμαιρικό δ-CT σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και ακολούθησε επώαση με την απομονωμένη GtaGTPyS και ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της Ga. Το GTPγS είναι ένα μη υδρολυόμενο παράγωγο του GTP και έτσι η GtaGTPγS παραμένει στην ενεργή κατάσταση, καθώς δεν είναι δυνατόν να υδρολύσει το GTP μέσω της δράσης GTPάσης που διαθέτει. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 18Γ, σε συγκέντρωση 0,5 μΜ της GtaGTPγS, παρατηρείται μια ασθενής ζώνη που αντιπροσωπεύει την Ga στο ανοσοαποτύπωμα (διαδρομή 4). Καμία ζώνη δεν παρατηρείται, όπως αναμένεται, στον αρνητικό μάρτυρα (Σχήμα 18Γ, διαδρομή 5). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργή διαμόρφωση της Ga υπομονάδας προσδένεται επίσης στο δ-CT, ενδεχομένως όμως με μικρότερη συγγένεια από την ανενεργή διαμόρφωση (συγκρίνατε σχήματα 18Α και 18Γ, διαδρομές 2 και 4 αντίστοιχα). Τα παραπάνω αποτελέσματα δεικνύουν ότι η Ga υπομονάδα αλληλεπιδρά με το δ-CT σε οποιαδήποτε διαμόρφωση.

Για να μελετήσουμε εκτενέστερα κατά πόσο υπάρχουν και άλλες θέσεις αλληλεπίδρασης στους μ- και δ-ORs για τις Ga υπομονάδες, ελέγξαμε την ικανότητα της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς να αλληλεπιδρά με τις Ga υπομονάδες. Για το λόγο αυτό, επωάσαμε την ακινητοποιημένη GST-χιμαιρική δ-i3L με την ετεροτριμερή Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, την ανενεργή GtaGDP ή την ενεργή GtaGTPγS. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 19, η δ-i3L προσδένει την Ga υπομονάδα, με οποιαδήποτε από τις τρεις διαμορφώσεις της Gta πρωτεΐνης και αν συνεπωαστεί. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις της Ga υπομονάδας δεικνύουν μεγαλύτερη πρόσδεση στην δ-i3L. Ειδικότερα στην περίπτωση της GtaGTPγS, φαίνεται ότι η ενεργή Gta προσδένεται σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις και αυτό αποδεικνύει ότι οι ενεργοποιημένες Ga πρωτεΐνες εμφανίζουν μεγαλύτερη


συγγένεια πρόσδεσης για την δ-i3L (Σχήμα 19Γ), από ότι οι ανενεργές Ga ή το ετεροτριμερές.

Σχήμα 19. Η Ga υπομονάδα προσδένεται στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά. (A) Η ετεροτριμερής Gta υπομονάδα αλληλεπιδρά με την δ-i3L. Η GST-χιμαιρική δ-i3L (1 μM) επωάστηκε με 0,25, 0,5 και 1 μM GtaGDP (διαδρομές 2-4), ενώ οι ίδιες συγκεντρώσεις της GtaGDP επωάστηκαν και με την GST πρωτεΐνη (διαδρομές 5-7). Η διαδρομή 1 αντιπροσωπεύει την ετεροτριμερή, απομονωμένη Gtaβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>. (B) Η Ga υπομονάδα στην ανενεργή διαμόρφωση προσδένεται στην δ-i3L. Η ακινητοποιημένη δ-i3L (1 μM) επωάστηκε με τις ίδιες συγκεντρώσεις GtaGDP (διαδρομές 2-4). (Γ) Η GtaGTPγS επωάστηκε με τη δ-i3L σε χαμηλές συγκεντρώσεις 60, 120 και 250 nM (διαδρομές 2-4 αντίστοιχα). Σε όλα τα ανοσοαποτυπώματα η Gta ανιχνεύθηκε με τη χρήση ενός αντισώματος έναντι της Ga (OC1, αραίωση 1:1.000). Οι ποσότητες των GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκαν μετά από νέα ανοσοαποτύπωση της μεμβράνης με το αντι-GST αντίσωμα (αραίωση 1:5.000).

### 4.2.4 Εξειδίκευση πρόσδεσης των Ga υπομονάδων στα καρβοξυτελικά άκρα των υποδοχέων

Οι υπομονάδες Gqa, G<sub>11</sub>a, G<sub>14</sub>a και Gsa πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη σηματοδότηση διαφορετικών GPCRs και δεν συζεύγνυνται με τους οπιοειδείς υποδοχείς (Offermanns and Simon, 1995). Για να προσδιορίσουμε κατά πόσο υπάρχει εξειδίκευση στην αλληλεπίδραση των διαφόρων Ga υπομονάδων στα μ- και δ-CT, μελετήσαμε την ικανότητα διαφόρων Ga υπομονάδων όπως η Gqa και Gsa να προσδένονται στις ενδοκυτταρικές περιοχές των οπιοειδών υποδοχέων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 20, επώαση μεμβρανών εγκεφάλου ποντικού, οι οποίες περιέχουν ενδογενώς τις Gsa και Gqa, με τα ακινητοποιημένα μ-, δ-CT και ακόλουθη ανοσοεντόπιση με τα κατάλληλα αντισώματα δεν έδειξε την παρουσία κάποιας ζώνης που να αντιπροσωπεύει αυτές τις πρωτεΐνες. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι Gqa και Gsa δεν προσδένονται στα μ-, δ-CT.



Σχήμα 20. Οι Gsa και Gqa δεν προσδένονται στα μ-, δ-CT. Ορισμένη ποσότητα των GSTχιμαιρικών δ-CT και μ-CT (0,5 μM) επωάστηκε με 100 μg ολικής πρωτεΐνης από μεμβράνες εγκεφάλου ποντικού στους 4°C για 30 λεπτά (διαδρομές 2 και 3). Η ανίχνευση των Ga υπομονάδων έγινε με αντισώματα που αναγνωρίζουν της Gsa υπομονάδα (K-20, sc-823, Santa Cruz, αραίωση 1:500) ή την Gqa υπομονάδα (E-17, sc-393, Santa Cruz, αραίωση 1:500). Διαδρομή 1, απομονωμένες μεμβράνες εγκεφάλου ποντικού. Διαδρομή 4, επώαση της GST πρωτεΐνης με 100 μg πρωτεΐνης από μεμβράνες εγκεφάλου ποντικού. Η ανίχνευση των GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών έγινε με το αντι-GST αντίσωμα (1:5.000).

### 4.3 Τα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων (μ-CT, δ-CT) ως πλατφόρμες για το σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων: Ο ρόλος της RGS4 πρωτεΐνης

Τα εξωτερικά ερεθίσματα μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων που χρησιμοποιούν ως σημείο πρόσδεσης (πλατφόρμα) τα ενδοκυτταρικά τμήματα των GPCRs και περιλαμβάνουν εκτός από τις G πρωτεΐνες και άλλες διαλυτές ή μη πρωτεΐνες (Rebois and Hebert, 2003). Οι RGS πρωτεΐνες διαθέτουν, όπως προαναφέρθηκε, πολλαπλά μοτίβα αλληλεπίδρασης και είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν εκτός από τις Gα υπομονάδες και με άλλες πρωτεΐνες (τελεστές, βοηθητικές πρωτεΐνες). Με βάση αυτά τα δεδομένα και γνωρίζοντας ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με τα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων, ελέγξαμε κατά πόσο η RGS4 μπορεί να αποτελεί κομβικό μόριο για το σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων με τις G πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας τα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων ως σημεία αγκυροβόλησης.

## 4.3.1 Οι Gβγ υπομονάδες ανταγωνίζονται με την RGS4 για την πρόσδεση στο μ-CT και δ-CT

Γνωρίζοντας ότι οι Gβy υπομονάδες και η RGS4 προσδένονται στις ίδιες περιογές των οπιοειδών υποδοχέων, ελέγξαμε κατά πόσο αυτές μπορούν να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα στο μ-CT, γεγονός που θα πιστοποιούσε ανταγωνισμό μεταξύ τους στην πρόσδεση της ίδιας περιοχής του υποδοχέα ή δημιουργία πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων. Για το λόγο αυτό, το GST-χιμαιρικό μ-CT πεπτίδιο ακινητοποιήθηκε σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και ακολούθησε επώαση με σταθερή συγκέντρωση της RGS4. Στη συνέχεια, έγινε επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των Gβγ υπομονάδων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 21 (πρώτο ανοσοαποτύπωμα), η ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στην RGS4 μειώνεται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των Gβγ υπομονάδων, σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα όπου διαφαίνεται η πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT (Σχήμα 21, πρώτο ανοσοαποτύπωμα, συγκρίνατε διαδρομή 2 με 3-5). Αυτό το αποτέλεσμα δεικνύει ότι οι Gβy υπομονάδες ανταγωνίζονται την πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT και την εκτοπίζουν εν μέρει από το σύμπλοκο που σχηματίζει με αυτό το τμήμα του μ-OR. Νέα ανοσοεντόπιση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι της Gβ υπομονάδας έδειξε ότι η πρόσδεση της Gβ υπομονάδας αυξάνεται, αυξανομένης της συγκέντρωσης των Gβy υπομονάδων (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομές 3-5). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στο μ-CT, με τρόπο που είναι ανάλογος της συγκέντρωσης των υπομονάδων, ακόμα και παρουσία της RGS4.

Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση όπου στην περίπτωση της συνεπώασης των Gβγ υπομονάδων και της RGS4 με το μ-CT, σε συγκέντρωση 0,5 μM για κάθε μια από τις Gβγ και RGS4, η ένταση της ζώνης της Gβ είναι σημαντικά εντονότερη σε σύγκριση με την ένταση της ζώνης που παρατηρείται απουσία της RGS4 (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα, συγκρίνατε διαδρομές 5 και 6 αντίστοιχα). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι η παρουσία της RGS4 οδηγεί σε αύξηση της πρόσδεσης των Gβγ υπομονάδων στο μ-CT.





Γνωρίζοντας ότι η πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο μ-CT ανταγωνίζεται την πρόσδεση της RGS4 και ενισχύεται επίσης από την παρουσία της δεύτερης, θελήσαμε να πιστοποιήσουμε εάν αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση του δ-CT. Για το λόγο αυτό, το ακινητοποιημένο δ-CT προ-επωάστηκε ή όχι με σταθερή συγκέντρωση RGS4 και ακολούθησε νέα επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των Gβγ υπομονάδων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 22, η πρόσδεση της RGS4 στο δ-CT ελαττώνεται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των Gβγ υπομονάδων, σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα όπου διαφαίνεται απλή πρόσδεση της RGS4 στο δ-CT (πρώτο ανοσοαποτύπωμα, συγκρίνατε διαδρομή 2 με 3-5). Παρόλα αυτά, η ελάττωση αυτή στην πρόσδεση της RGS4 είναι μικρότερη, σε σχέση με την αντίστοιχη ελάττωση στην πρόσδεση της RGS4 που παρατηρείται για το μ-CT (συγκρίνατε Σχήμα 21 και 22, διάγραμμα πρόσδεσης της RGS4). Αυτό το αποτέλεσμα δεικνύει ότι οι Gβγ υπομονάδες ανταγωνίζονται την πρόσδεση της RGS4 και στο δ-CT, όχι όμως τόσο αποτελεσματικά όσο στο μ-CT.

Νέα ανοσοεντόπιση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι της Gβ υπομονάδας έδειξε ότι η παρουσία της RGS4 έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρότερη πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο δ-CT, όπως και στην περίπτωση του μ-OR (Σχήμα 22, δεύτερο ανοσοαποτύπωμα, συγκρίνατε διαδρομές 3-5 και 6-8 αντίστοιχα). Παρόλα αυτά, η ενίσχυση που προκαλεί η RGS4 στην πρόσδεση των Gβγ διμερών στο δ-CT είναι μικρότερη από αυτήν που παρατηρείται στην περίπτωση του μ-CT (συγκρίνατε Σχήμα 21 και 22, διάγραμμα πρόσδεσης των Gβγ υπομονάδων).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεικνύουν ότι οι Gβγ υπομονάδες ανταγωνίζονται την πρόσδεση της RGS4 και την εκτοπίζουν εν μέρει από το καρβοξυτελικό άκρο του δοπιοειδούς υποδοχέα. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία της RGS4 ενισχύει την πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο δ-CT και ενδεχομένως ευνοεί τη δημιουργία ενός *in vitro* συμπλόκου μεταξύ του δ-CT, της πρωτεΐνης RGS4 και των Gβγ υπομονάδων. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι το δ-CT χρησιμοποιείται, όπως και το μ-CT, ως πλατφόρμα για το σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου COOH άκρο – RGS4 – Gβγ σε αυτό, ενώ η RGS4 αποτελεί κομβικό μόριο διότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αυτού του συμπλόκου, καθώς ενισχύει την πρόσδεση του Gβγ διμερούς στα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων.



Σχήμα 22. Η RGS4 ενισχύει την πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο δ-CT. Ορισμένη ποσότητα του GST-χιμαιρικού δ-CT (0,5 μM) προ-επωάστηκε αρχικά με 0,3 μM His-RGS4 (διαδρομές 2-5). Ακολούθησε επώαση με τρεις συγκεντρώσεις Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> 0,1 , 0,2 και 0,3 μM, διαδρομές 3-5. Διαδρομή 2, πρόσδεση της RGS4 στο δ-CT απουσία Gβγ υπομονάδων. Διαδρομές 6-8, επώαση τωνς Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> με το δ-CT απουσία RGS4. Διαδρομές 1 και 9, καθαρή His-RGS4 και απομονωμένα διμερή Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>, αντίστοιχα. Διαδρομή 10, επώαση της GST πρωτεΐνης με 0,3 μM Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub>. Πρώτο ανοσοαποτύπωμα, η RGS4 ανοσοεντοπίστηκε με το αντι-His αντίσωμα (1:2.500). Δεύτερο ανοσοαποτύπωμα, η ανίχνευση της Gβ έγινε με το αντι-Gβ αντίσωμα (1:5.000). Τρίτο ανοσοαποτύπωμα, ανοσοεντόπιση του GST-χιμαιρικού δ-CT πεπτιδίου και της GST πρωτεΐνης με το αντι-GST αντίσωμα (1:5.000). Στα διαγράμματα απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση της πρόσδεσης της RGS4 και του Gβγ συμπλόκου στο μ-CT, όπως υπολογίστηκε από πυκνομέτρηση των ζωνών τριών πειραμάτων (\*p<0,05).

Για να διερευνήσουμε εάν τα *in vitro* πειράματα επαληθεύονται σε ζωντανά κύτταρα, κύτταρα COS-7 διαμολύνθηκαν με τον μη επισημασμένο μ-OR και την HA-RGS4 πρωτεΐνη, ενεργοποιήθηκαν ή όχι με αγωνιστή και τα λύματα των κυττάρων ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντισώματα έναντι του επιτόπου HA ή της Gβ υπομονάδας. Οι ανοσοκατακρημνισμένες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδης και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα που αναγνωρίζει τη Gβ υπομονάδα ή τον επίτοπο HA. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 23A, στις διαδρομές 3 και 4 δεν παρατηρείται ζώνη που να αντιστοιχεί στην HA-RGS4, παρόλο που έχει γίνει ανοσοκατακρήμνιση με αντισώματα έναντι της Gβ. Αντίστοιχα, στις διαδρομές 2 και 3 του Σχήματος 23B, δεν ανιχνεύεται η Gβ υπομονάδα όταν έχει γίνει ανοσοκατακρήμνιση της HA-RGS4, ακόμα και στην περίπτωση ενεργοποίησης των κυττάρων με 1 μΜ DAMGO για 15 λεπτά. Τα πειράματα αυτά δείχνουν ότι, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση της Gβγ υπομονάδας με την RGS4, παρουσία του μ-OR υποδοχέα.

A

B



Σχήμα 23. Η RGS4 δεν αλληλεπιδρά με τις Gβγ υπομονάδες σε κύτταρα COS-7. (A) Ανίχνευση της HA-RGS4 ύστερα από ανοσο-συγκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (H6908, Sigma) ή της Gβ υπομονάδας (διαδρομές 2 και 3, 4 αντίστοιχα) και ανοσοεντόπιση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (1:3.000). Το αντι-HA αντίσωμα εντοπίζει τη HA-RGS4 όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (διαδρομή 2), δεν μπορεί όμως να ανιχνεύσει την HA-RGS4 όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το αντι-Gβ αντίσωμα, σε κυτταρικά λύματα από μη ενεργοποιημένα κύτταρα (διαδρομές 3 και 4). (B) Το αντι-Gβ αντίσωμα (αραίωση 1:5.000) ανιχνεύει την Gβ υπομονάδα όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (Διαδρομές 3 και 4). (B) Το αντι-Gβ αντίσωμα (διαδρομή 4), δεν μπορεί όμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα το ίδιο αντίσωμα (Διαδρομές 3 και 4). (B) Το αντι-Gβ αντίσωμα (διαδρομή 4), δεν μπορεί όμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (διαδρομές 3 και 4). (B) Το αντι-Gβ αντίσωμα (διαδρομή 4), δεν μπορεί όμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (διαδρομές 3 και 2), (B) το αντι-Gβ αντίσωμα (διαδρομή 4), δεν μπορεί όμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (διαδρομές 3 και 2), δεν μπορεί όμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (διαδρομές 3 και 2), δεν μπορεί όμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμνιση με το ίδιο αντίσωμα (διαδρομές 3 και 2), δεν μπορεί οιμως να εντοπίσει την Gβ όταν γίνεται ανοσοκατακρήμοιση των δειγμάτων έγινε σε πήκτωμα 12%. Στις διαδρομές 1 απεικονίζεται λύμα κυττάρων ως θετικός μάρτυρας για την έκφραση της HA-RGS4 (A) και της Gβ (B), ενώ στις διαδρομές 5 απεικονίζεται ο αρνητικός μάρτυρας όπου έχει γίνει ανοσοκατακρήμνιση των λυμάτων με ορό μη ανοσοποιημένου κουνελιού (Santa Cruz).

## 4.3.2 Η πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT προϋποθέτει την ενεργοποίηση του μ-OR

Είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς προάγουν την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και ότι οι RGS πρωτεΐνες τείνουν να προσδένονται με μεγαλύτερη συγγένεια στις ενεργοποιημένες G πρωτεΐνες *in vitro* (Popov et al., 1997). Με βάση αυτά τα δεδομένα θελήσαμε να ελέγξουμε κατά πόσο η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων και η επακόλουθη ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών προάγει την πρόσδεση των RGS πρωτεϊνών στους υποδοχείς. Για να απαντήσουμε σε αυτά τα ερωτήματα, κύτταρα COS-7 διαμολύνθηκαν με τα cDNAs που κωδικοποιούν τον μ-OR αρουραίου και την HA-RGS4 και ακολούθως επιδράσαμε σε αυτά με 1 μΜ του οπιοειδή αγωνιστή DAMGO για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, λύματα αυτών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα pull down με το ακινητοποιημένο GST-χιμαιρικό μ-CT.



Σχήμα 24. Πρόσδεση της RGS4, η οποία εκφράζεται από κύτταρα, στο μ-CT. COS-7 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το cDNA του μ-OR (3 μg) και ταυτόχρονα ή όχι με το cDNA της HA-RGS4 (5 μg). 48-72 ώρες μετά από τη διαμόλυνση τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 1 μM DAMGO για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα λύματα των κυττάρων (500-700 μg) επωάστηκαν για 60 λεπτά στους 4°C με το GST-μ-CT (διαδρομές 2-4) ή με GST πρωτεΐνη (διαδρομές 5-7). Ακολούθησαν πλύσεις, ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και η RGS4 ανιχνεύθηκε με το αντι-HA αντίσωμα (1:3.000). Διαδρομή 1, λύμα από κύτταρα διαμολυσμένα με HA-RGS4. Διαδρομές 2 και 5, πείραμα pull down με λύματα κυττάρων που δεν εκφράζουν την HA-RGS4 και επώαση με το μ-CT και την GST πρωτεΐνη, αντίστοιχα. Διαδρομές 3 και 4, pulldown με λύματα κυττάρων που εκφράζουν την HA-RGS4 και επώαση με το μ-CT της RGS4 που προέρχεται από ενεργοποιημένα με DAMGO κύτταρα. Διαδρομές 6 και 7, η GST πρωτεΐνη δεν προσδένει την HA-RGS4 από τα κυτταρικά λύματα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με το μ-CT μόνο όταν στα κύτταρα COS-7 ο εκφραζόμενος μ-OR έχει ενεργοποιηθεί με DAMGO (Σχήμα 24, διαδρομή 4). Αντίθετα, στην περίπτωση κυττάρων που δεν ενεργοποιούνται, δεν

παρατηρείται πρόσδεση της εκφρασμένης στα κύτταρα HA-RGS4 με το πεπτίδιο μ-CT (διαδρομή 3), όπως επίσης και στην περίπτωση μη διαμολυσμένων με HA-RGS4 κυττάρων (διαδρομή 2) ή στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας η GST πρωτεΐνη στη θέση του πεπτιδίου που εκφράζει το μ-CT (διαδρομές 5-7).

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η RGS4 προσδένεται στο μ-CT και ότι η πρόσδεση αυτή είναι εφικτή μόνο όταν ο μ-OR στα κύτταρα είναι ενεργοποιημένος. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση του μ-OR έχει ως αποτέλεσμα την αποσύζευξη των ενδογενών Gaβγ σε Ga και Gβγ υπομονάδες. Η ενεργές Ga υπομονάδες με την σειρά τους προάγουν την πρόσδεση της RGS4 στον μ-OR πιθανώς λόγω σχηματισμού ενός συμπλόκου μεταξύ της RGS4, των Ga υπομονάδων και του καρβοξυτελικού άκρου του μ-OR.

### 4.3.3 Προσδιορισμός *in vitro* ετεροτριμερών συμπλόκων μεταξύ του μ-OR, της RGS4 και της Ga πρωτεΐνης

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η RGS2 δημιουργεί σύμπλοκα με την Gqa στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του M1-μουσκαρινικού υποδοχέα (Bernstein et al., 2004). Η αλληλεπίδραση αυτή παρατηρείται παρουσία ιόντων  $AlF_4^{-1}$ , τα οποία σε συνδυασμό με τα ιόντα  $Mg^{+2}$  και το GDP (παράγοντας AMF), έχουν την δυνατότητα να προσδένονται στην ανενεργή Ga υπομονάδα, μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση της τελευταίας σε αυτή της μεταβατικής κατάστασης (Sondek et al., 1994) (βλ. Εισαγωγή, RGS4 πρωτεΐνη και Σχήμα 9, σελ. 44). Η μεταβατική κατάσταση της Ga υπομονάδας ευνοεί την πρόσδεση των RGS πρωτεϊνών, όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση των Gia και Gta (Berman et al., 1996), Watson et al., 1996).

Με γνώμονα τα παραπάνω, και σε συνδυασμό με τα προκαταρκτικά *in vitro* αποτελέσματα του εργαστηρίου όπου έχει δειχθεί ότι η Ga υπομονάδα δεν προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, υποθέσαμε ότι η RGS4 ενδεχομένως παίζει κομβικό ρόλο και προάγει την πρόσδεση των Ga υπομονάδων στον μ-OR, σχηματίζοντας με την Ga υπομονάδα και το μ-CT ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Για να διερευνήσουμε την υπόθεση αυτή, προ-επωάσαμε την RGS4 με την ανενεργή Gta-GDP παρουσία ή απουσία

του παράγοντα AMF και έγιναν in vitro πειράματα πρόσδεσης χρησιμοποιώντας το ακινητοποιημένο GST-χιμαιρικό μ-CT πεπτίδιο.



Σχήμα 25. Η RGS4 δημιουργεί σύμπλοκο με την Ga υπομονάδα και το μ-CT. (A) Ποσότητες 0,5 μM της Gta-GDP και της 0,5 μM His-RGS4 προ-επωάστηκαν σε PBS με αναστολείς πρωτεασών και 1 mM GDP παρουσία (διαδρομές 3 και 5) ή απουσία (διαδρομές 2, 4) AMF (100 mM NaF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM AlF<sub>3</sub>, 1 mM GDP, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος 3.3.4) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία για 20 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα αυτό επωάστηκε με το ακινητοποιημένο GST-χιμαιρικό μ-CT για 25 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησαν πλύσεις, ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντόπιση με αντι-Ga (OC1, 1:1.000) ή αντι-His (1:3.000) αντισώματα. Διαδρομή 1, καθαρή Gta πρωτεΐνη. (B) Απομονωμένη Gia (0,5 μM) επωάστηκε με 0,5 μM His-RGS4, όπως περιγράφεται και παραπάνω, παρουσία (διαδρομή 3) ή απουσία (διαδρομές 2,4) του AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 20 λεπτά στους 4°C. Διαδρομή 1, καθαρή Gia πρωτεΐνη. (B) Απομονωμένη Gia (διαδρομή 3) ή απουσία (διαδρομές 2,4) του AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 20 λεπτά στους 4°C. Διαδρομή 1, καθαρή Gia πρωτεΐνη. (B) Απομονωμένη Gia (διαδρομή 3) ή απουσία (διαδρομές 2,4) του AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 20 λεπτά στους 4°C. Διαδρομή 1, καθαρή Gia πρωτεΐνη.

Σε συμφωνία με τα προκαταρκτικά αποτελέσματα, η Gta-GDP δεν προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, όταν επωάζεται με το μ-CT παρουσία ή απουσία του παράγοντα AMF (Σχήμα 25A, επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 4 και 5), εν αντιθέσει με την RGS4 (μεσαίο ανοσοαποτύπωμα διαδρομή 2 και 3). Προ-επώαση της RGS4 πρωτεΐνης με την ανενεργή Gta παρουσία του παράγοντα AMF, έδειξε την παρουσία μιας ζώνης που αντιστοιχεί στην Ga υπομονάδα (επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 3). Επιπλέον, όταν η Gta προ-επωάζεται με την RGS4 απουσία του AMF, η Ga δεν προσδένεται με το μ-CT (επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 2). Για να επιβεβαιώσουμε

κατά πόσο θα έχουμε τα ίδια αποτελέσματα με την Gia υπομονάδα που αλληλεπιδρά in vivo με τους οπιοειδείς υποδοχείς, ελέγξαμε επίσης την ικανότητα της υπομονάδας αυτής να σχηματίζει σύμπλοκο με την RGS4 και το μ-CT. Προ-επώαση της ενενεργούς Gia με την RGS4 παρουσία του AMF και επακόλουθη επώαση με το ακινητοποιημένο μ-CT οδήγησε σε πρόσδεση της Gia υπομονάδας στο μ-CT, όπως και στην περίπτωση της Gta υπομονάδας (Σχήμα 25B, επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 3). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η Ga υπομονάδα στη μεταβατική κατάσταση (παρουσία AMF) προσδένεται στον μ-OR μέσω του μ-CT με τη βοήθεια της RGS4 πρωτεΐνης.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η πρόσδεση της RGS4 στον μ-OR πιθανόν να παίζει το ρόλο ικριώματος και να επάγει τη δέσμευση της Ga υπομονάδας και τη δημιουργία ενός ετεροτριμερούς συμπλόκου (μ-CT – RGS4 – Ga υπομονάδας) στον μ-OR. Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το γεγονός ότι η πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT ενισχύεται παρουσία της Ga υπομονάδας και του παράγοντα AMF (μεσαίο ανοσοαποτύπωμα, συγκρίνατε διαδρομές 2 με 3). Από τα αποτελέσματα αυτά μπορεί επίσης να συμπεράνει κανείς, ότι η RGS4 έχει διακριτές περιοχές με τις οποίες αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την Ga υπομονάδα και το μ-CT.

# 4.4 Χαρτογράφηση των θέσεων αλληλεπίδρασης της RGS4, των Ga υπομονάδων και των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων

### 4.4.1 Θέσεις πρόσδεσης της RGS4 πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR και δ-OR

Δεδομένου ότι τα προηγούμενα πειράματά μας απέδειξαν ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ-OR, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τις ακριβείς περιοχές αλληλεπίδρασης των μ-OR και δ-OR με την RGS4, καθώς επίσης και τις περιοχές της RGS4 που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με αυτούς τους υποδοχείς. Στόχος μας ήταν να προσδιορίσουμε εάν υπάρχει μια συντηρημένη περιοχή στα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων που ευθύνεται για τη δημιουργία των σταθερών συμπλόκων μεταξύ RGS4 και μ-, δ-CTs.

μ-CT:	329 SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSTRVRQNTREHP STANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
ΔС43-μ-СТ:	329 SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTS 355
ΔN27-μ-CT:	
Y→A:	* 329 SCLNPVLÅAFLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSTRVRQNTREHP STANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
Y→A,K→Q:	329 SCLNPVLÅAFLDENFÖRCFREFCIPTSSTIEQQNSTRVRQNTREHP STANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
ΔYXXL:	329 SCLNPVLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSTRVRQNTREHP STANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398
δ-CT:	311 <b>SSLNPVLYAFLDENFKRCFR</b> QL <b>C</b> RAPCGGQEPGSLRRPRQATAR ERVTACTPSDGPGGGAAA 372
ΔС36-δ-СТ:	311 SSLNPVLYAFLDENFKRCFRQLCRAP 336
ΔN26-δ-CT:	

**Σχήμα 26. Αμινοξικές αλληλουχίες των GST-χιμαιρικών, ελλειμματικών μ-CT και δ-CT.** Με κόκκινα γράμματα συμβολίζονται τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα στους μ-OR και δ-OR. Σε κίτρινο πλαίσιο ορίζονται τα μοτίβα NPXXY και YXXL. Με μπλε αστερίσκο δεικνύονται οι σημειακές μεταλλαγές της Tyr 336 και της Lys 344 σε Ala και Gln αντίστοιχα.

In vitro πειράματα πρόσδεσης με τη χρήση του ΔN27-μ-CT, έδειξαν ότι το τμήμα αυτό δεν μπορεί να προσδέσει την RGS4, σε σύγκριση με το πλήρες καρβοξυτελικό άκρο (θετικός μάρτυρας) (Σχήμα 27Α, σύγκριση διαδρομής 2 με 4). Αντίθετα, στο ελλειμματικό τμήμα ΔC43-μ-CT, το οποίο περιλαμβάνει το συντηρημένο μοτίβο, η RGS4 προσδένεται όπως φαίνεται από την παρουσία μιας ζώνης 26 KDa που αντιστοιχεί στην RGS4 (Σχήμα 27Α, διαδρομή 3). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την σημασία των

26 αμινοξέων, που ευθύνονται για τη δημιουργία μιας όγδοης έλικας, στην άμεση αλληλεπίδραση του μ-OR με την RGS4 πρωτεΐνη.



Σχήμα 27. Η RGS4 προσδένεται στο συντηρημένο τμήμα του μ-CT και δ-CT. (A) Τα GSTχιμαιρικά ΔC43-μ-CT, ΔN27-μ-CT και μ-CT επωάστηκαν με 0,5 μM ανασυνδιασμένη His-RGS4, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (παράγραφος 2.3.3). Διαδρομή 1, καθαρή His-RGS4. Διαδρομή 2, επώαση μ-CT αγρίου τύπου με His-RGS4 0,5 μM. Διαδρομή 3, επώαση ΔC43-μ-CT με His-RGS4 0,5 μM. Διαδρομή 4, επώαση ΔN27-μ-CT με His-RGS4 0,5 μM. Διαδρομή 5, επώαση GST πρωτεΐνης με την ίδια ποσότητα His-RGS4. (B) Τα ΔN26-δ-CT και δ-CT επωάστηκαν με 0,5 μM RGS4. Διαδρομή 1, καθαρή RGS4. Διαδρομή 2, επώαση δ-CT με RGS4. Διαδρομή 3, επώαση ΔN26-δ-CT με RGS4. Διαδρομή 4, επώαση GST πρωτεΐνης με την ίδια ποσότητα RGS4. Η ανοσοεντόπιση και στα δυο πειράματα έγινε με το αντι-His αντίσωμα (αραίωση 1:3.000).

Με γνώμονα τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης της RGS4 με το καρβοζυτελικό άκρο του μ-OR, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε αν η αντίστοιχη περιοχή ευθύνεται και για την πρόσδεση της RGS4 στον δ-OR. Για το λόγο αυτό σχεδιάσαμε αντίστοιχα ένα GST-χιμαιρικό πεπτίδιο του δ-CT, στο οποίο απουσιάζει η συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων, το οποίο ορίσαμε ως ΔΝ26-δ-CT (Σχήμα 26). Ακολούθησαν πειράματα *in vitro* πρόσδεσης, στα οποία το ακινητοποιημένο ΔΝ26-δ-CT επωάστηκε με την His-RGS4. Μετά από ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντόπιση με το αντι-His αντίσωμα δεν παρατηρήθηκε ζώνη που να αντιπροσωπεύει την RGS4 (Σχήμα 27, διαδρομή 3). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η RGS4 δεν προσδένεται σε αυτήν την περιοχή του υποδοχέα. Αντίθετα, σε δείγματα όπου έγινε επώαση ολόκληρου του δ-CT με την His-RGS4, παρατηρήθηκε όπως αναμενόταν πρόσδεση της RGS4 (διαδρομή 2).

Η πρόσδεση της RGS4 στο ΔC43-μ-CT μπορεί να οφείλεται σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα και συντηρημένα μοτίβα που περιλαμβάνονται στο μ-CT. Στη θέση 332-336 του μ-OR (θέση 314-318 για τον δ-OR) βρίσκεται το συντηρημένο δομικό μοτίβο NPXXY (Σχήμα 26 και Εισαγωγή, παράγραφος 1.4.2), το οποίο ευθύνεται για την ενδοκύττωση και αποικοδόμηση των υποδοχέων και την πρόσδεση μικρών G πρωτεϊνών (Barak et al., 1995). Καθοδικά αυτού του μοτίβου υπάρχει ένα δεύτερο δομικό μοτίβο, το ΥΧΧL που περιλαμβάνει ως αρχικό αμινοξύ την τυροσίνη του μοτίβου NPXXY, και ευθύνεται για την πρόσδεση των STAT5A και STAT5B μεταγραφικών παραγόντων (Mazarakou and Georgoussi, 2005, Georganta et al., 2010).  $\Gamma \mu \alpha \pi \rho \sigma \sigma \delta \iota \rho (\sigma \sigma \nu \mu \epsilon \alpha \tau)$ κοινή τυροσίνη (Tyr336) των παραπάνω μοτίβων, καθώς και όλο το YXXL μοτίβο, ευθύνονται για την πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT, σχεδιάστηκαν μεταλλαγμένα πεπτίδια του μ-CT που παρατίθενται στο Σχήμα 26: 1) πεπτίδιο Υ > Α, στο οποίο η τυροσίνη έχει μεταλλαχθεί σε αλανίνη (Y336 $\rightarrow$ A), 2) πεπτίδιο Y $\rightarrow$ A, K $\rightarrow$ Q, το οποίο φέρει την ίδια μετάλλαξη και στο οποίο η λυσίνη της θέσης 344 έχει επίσης μεταλλαχθεί σε γλουταμίνη (Y336→A, K344→Q), 3) πεπτίδιο ΔYXXL, στο οποίο ολόκληρο το συντηρημένο μοτίβο YXXL έχει αποκοπεί. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν GST-χιμαιρικές πρωτεΐνες με τα παραπάνω μεταλλαγμένα πεπτίδια του μ-CT, οι οποίες εκφράστηκαν σε βακτήρια E. coli και χρησιμοποιήθηκαν σε in vitro πειράματα πρόσδεσης, όπου επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη και απομονωμένη His-RGS4 πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 28, η έλλειψη του συντηρημένου μοτίβου ΥΧΧL δεν είναι ικανή να παρεμποδίσει την πρόσδεση της RGS4 πρωτεΐνης στο μ-CT (διαδρομή 3).



Σχήμα 28. Η περιοχή NPXXYXXL δεν ευθύνεται για την πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT. Τα GST-χιμαιρικά πεπτίδια του μ-CT επωάστηκαν με 0,5 μM His-RGS4, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (παράγραφος 2.3.3). Διαδρομή 2, ΔC43-μ-CT, διαδρομή 3, μ-CT που φέρει την έλλειψη στο μοτίβο YXXL, διαδρομή 4, μ-CT που φέρει σημειακή μετάλλαξη, διαδρομή 7, μ-CT που φέρει διπλή σημειακή μετάλλαξη. Διαδρομές 5 και 6, θετικός μάρτυρας μ-CT και αρνητικός μάρτυρας GST πρωτεΐνη αντίστοιχα. Διαδρομή 1, καθαρή His-RGS4H ανοσοεντόπιση έγινε με το αντι-His αντίσωμα (αραίωση 1:3.000).

Το ίδιο αποτέλεσμα πήραμε και για το μ-CT που φέρει τη μεταλλαγή Y336→A ή το μ-CT που φέρει τη διπλή μεταλλαγή Y336→A και K344→Q (διαδρομές 4, 7 αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η περιοχή NPXXYXXL δεν ευθύνεται για την άμεση πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT και πιθανότατα και στο δ-CT.

Καθοδικά της περιοχής ΝΡΧΧΥΧΧΙ στην συντηρημένη περιοχή των καρβοξυτελικών υποδοχέων άκρων των οπιοειδών βρίσκεται η περιοχή DENFKRCFRXXC, η οποία σχηματίζει την προβλεπόμενη έλικα VIII και περιλαμβάνει 10 συντηρημένα αμινοξέα μεταξύ των μ-, δ- και κ-OR υποδοχέων. Σε μια επιπλέον προσπάθεια να εντοπίσουμε την ακριβή θέση πρόσδεσης της RGS4 στο μ-CT και το δ-CT, εφαρμόσαμε μια διαφορετική προσέγγιση για να εξακριβώσουμε το ρόλο της περιοχής DENFKRCFRXXC στην πρόσδεση της RGS4. Η προσέγγιση βασίζεται στο γεγονός ότι, εάν ένα πεπτίδιο που περιέγει τα αμινοξέα της περιογής αυτής (DENFKRCFRQLC, πεπτίδιο i4) αλληλεπιδρά και δημιουργεί σύμπλοκο με την RGS4, τότε το σύμπλοκο RGS4-i4 θα ανιχνεύεται να μεταναστεύει με αργότερο ρυθμό (σε μεγαλύτερο μοριακό βάρος), σε ηλεκτροφόρηση κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες (native gel electrophoresis), όπου οι πρωτεΐνες διατηρούν τις φυσικές τους ιδιότητες και δεν καταστρέφονται τα πιθανά σύμπλοκα που δημιουργούν.

Για το λόγο αυτό, επωάσαμε την His-RGS4 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του i4 πεπτιδίου και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα υποβλήθηκε σε χρώση Coomassie και σε ανοσοαποτύπωση με το αντι-His αντίσωμα (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.12). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 29, επώαση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του i4 πεπτιδίου παρουσία της RGS4 πρωτεΐνης οδηγεί σε μετανάστευση της RGS4 σε υψηλότερο MB, για τις συγκεντρώσεις 10 και 100 μM του i4 πεπτιδίου, και στις διαδρομές όπου υπάρχει και η μεγαλύτερη συγκέντρωση του i4 πεπτιδίου, η RGS4 μεταναστεύει ακόμα πιο αργά και σταδιακά εξαφανίζεται (συγκρίνατε διαδρομές 3 με 5-8). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η RGS4 προσδένεται στο i4 πεπτίδιο και δημιουργεί ένα σύμπλοκο που μεταναστεύει με αργότερο ρυθμό στην ηλεκτροφόρηση. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι μέσα στα 12 αμινοξέα DENFKRCFRQL του πεπτιδίου i4 εντοπίζεται η περιοχή που ευθύνεται για την πρόσδεσή της RGS4 με ένα τυχαίο πεπτίδιο, το οποίο αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο του δ-OR, MELVPSAR (NH<sub>2</sub>), δεν οδήγησε σε οποιαδήποτε μετατόπιση της ζώνης της RGS4 κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (συγκρίνατε διαδρομές 9 και 10 με διαδρομή 3).



Σχήμα 29. Η RGS4 δημιουργεί σύμπλοκο με το πεπτίδιο i4. 62 μM της απομονωμένης His-RGS4 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10-500 μM) του i4 πεπτιδίου παρουσία DTT (διαδρομές 5-8). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα και έγινε ανοσοεντόπιση με το αντι-His αντίσωμα (1:3.000). Διαδρομή 1 και 3, καθαρή His-RGS4 απουσία ή παρουσία DTT, αντίστοιχα. Διαδρομές 2 και 4, 700 μM του i4 πεπτιδίου απουσία ή παρουσία DTT, αντίστοιχα. Διαδρομές 9 και 10, επώαση της His-RGS4 με 100 μM και 500 μM του πεπτιδίου NH<sub>2</sub>, αντίστοιχα.

### 4.4.2 Θέσεις πρόσδεσης της Ga πρωτεΐνης και του συμπλόκου RGS4-Ga στο καρβοζυτελικό άκρο του μ-OR και του δ-OR

Τα αρχικά in vitro πειράματα έδειξαν ότι το μ-CT δεν προσδένει την Ga υπομονάδα σε καμία διαμόρφωση (ενεργή, ανενεργή ή ετεροτριμερής). Επιπλέον, δείξαμε ότι η παρουσία της RGS4 προάγει την πρόσδεση της Ga στο μ-CT με τη δημιουργία ενός ετεροτριμερούς συμπλόκου μ-CT – Ga – RGS4. Το ερώτημα το οποίο τίθεται είναι εάν η Ga υπομονάδα, προσδενόμενη με την RGS4, αλληλεπιδρά με το μ-CT στις ίδιες περιοχές. Για να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, πραγματοποιήσαμε πειράματα pull down χρησιμοποιώντας τα GST-χιμαιρικά τμήματα του μ-CT και του δ-CT, τα οποία επωάσαμε με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της RGS4 και της Gta. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 30, στην περίπτωση του μ-OR η ανενεργή Gta (GtaGTP) δεν προσδένεται στο ΔC43-μ-CT (επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 2), ακόμα και παρουσία της RGS4 (επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 3), παρόλο που η RGS4 πρωτεΐνη προσδένεται σε αυτήν την περιοχή (μεσαίο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 3). Αντιθέτως, όταν η RGS4 πρωτεΐνη προ-επωάζεται με την Gta-GDP παρουσία του παράγοντα AMF (βλ. παράγραφο 4.3.3), τότε η Ga υπομονάδα προσδένεται στο ΔC43-μ-CT (επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 4). Από την άλλη πλευρά, στο μη συντηρημένο τμήμα ΔN27-μ-CT, όπου δεν ανιχνεύεται πρόσδεση της RGS4 (μεσαίο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομές 5-7), η πρόσδεση της Gta δεν είναι επίσης δυνατή, παρουσία ή απουσία του παράγοντα AMF (πάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομές 5-7).



**Σχήμα 30. Το σύμπλοκο Gta – RGS4 προσδένεται στο συντηρημένο τμήμα του μ-CT.** Η Gta-GDP (0,5 μM) και η His-RGS4 (0,5 μM) προ-επωάστηκαν σε PBS με αναστολείς πρωτεασών, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (παράγραφος 2.3.3), παρουσία (διαδρομή 4 και 7) ή απουσία (διαδρομές 3 και 6) AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 20 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε σφαιρίδια με ακινητοποιημένο το ΔC43-μ-CT ή το ΔN27-μ-CT και έγινε επώαση για 25 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησαν πλύσεις, ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντόπιση με αντι-Ga (OC1, αραίωση 1:1.000) και αντι-His (αραίωση 1:3.000). Διαδρομές 1 και 12, καθαρή Gta και His-RGS4 αντίστοιχα. Διαδρομές 9-11, επώαση με GST πρωτεΐνη (αρνητικός μάρτυρας). Διαδρομή 8, θετικός μάρτυρας με πρόσδεση του συμπλόκου Gta – RGS4 παρουσία AMF στο μ-CT αγρίου τύπου.

Με γνώμονα το γεγονός ότι α) ο δ-OR προσδένει την RGS4 πρωτεΐνη, β) η Ga υπομονάδα είναι ικανή να προσδένεται σε οποιαδήποτε διαμόρφωση με το δ-CT και γ) ο μ-OR σχηματίζει σύμπλοκα με την RGS4 και τη Ga, ελέγξαμε εάν ο δ-OR ακολουθεί το ίδιο πρότυπο πρόσδεσης και συμβάλλει στο σχηματισμό ετεροτριμερών συμπλόκων (RGS4 – Ga – δ-OR). Γι αυτόν τον λόγο, έγιναν παρόμοια *in vitro* pull down πειράματα με τη χρήση του πεπτιδίου ΔN26-δ-CT (στο οποίο λείπουν τα πρώτα 26 αμινοξέα), παρουσία των απομονωμένων Ga υπομονάδων ή/και της RGS4 πρωτεΐνης και παρουσία ή απουσία του παράγοντα AMF. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν είναι δυνατή η πρόσδεση της RGS4 και της Ga υπομονάδας σε αυτό το τμήμα του δ-OR (Σχήμα 31, διαδρομές 2 και 3). Στην περίπτωση όμως που η Ga υπομονάδα έχει ενεργοποιηθεί με τον παράγοντα AMF παρουσία της RGS4, είναι δυνατή η πρόσδεση τόσο της RGS4 όσο και της Ga στο ΔN26-δ-CT (Σχήμα 31, διαδρομή 4).



**Σχήμα 31. Το σύμπλοκο Gat-RGS4 προσδένεται στο μη συντηρημένο τμήμα του δ-CT.** Η Gta-GDP (0,5 μM) προ-επωάζεται παρουσία της RGS4 (0,5 μM) σε PBS με αναστολείς πρωτεασών παρουσία (διαδρομή 4) ή απουσία (διαδρομές 2, 3) AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 20 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα αυτό προστίθεται σε σφαιρίδια γλουταθειόνης που έχουν ακινητοποιημένο το ΔN26-δ-CT και ακολουθεί επώαση για 25 λεπτά στους 4°C. Ακολουθούν εκπλύσεις, και μετά από ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντόπιση με αντι-Ga (αραίωση 1:1.000) ή αντι-His (αραίωση 1:3.000) ανιχνεύεται η Gta ή η His-RGS4 πρωτεΐνη αντίστοιχα. Διαδρομές 7, 8, επώαση της GST πρωτεΐνης με τις Gta και His-RGS4, παρουσία ή απουσία AMF αντίστοιχα. Διαδρομές 1 και 6, καθαρή GtaGDP και ανασυνδιασμένη His-RGS4 αντίστοιχα. Κάτω ανοσοαποτύπωμα, ποσοτικοποίηση με αντίσωμα αντι-GST (αραίωση 1:5.000) για να ανιχνευθούν τα επίπεδα της ΔN26-δ-CT και της GST πρωτεΐνης.

Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το μη συντηρημένο τμήμα του δ-CT διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για το σύμπλοκο RGS4-Ga, σε αντίθεση με το αντίστοιχο τμήμα του μ-CT, όπου δεν παρατηρείται καμία πρόσδεση του ίδιου συμπλόκου.

## 4.4.3 Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης των Gβγ υπομονάδων στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR

Με την χρήση του πεπτιδίου ΔC43-μ-CT, που περιέχει το συντηρημένο τμήμα του μ-CT, ελέγξαμε επίσης εάν οι Gβγ υπομονάδες χρησιμοποιούν τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης. Παρόμοια *in vitro* πειράματα πρόσδεσης με τη χρήση του πεπτιδίου ΔC43-μ-CT, που έχει ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, και των απομονωμένων Gβ<sub>1</sub>γ<sub>1</sub> υπομονάδων έδειξαν την παρουσία ενός πολυπεπτιδίου 36 KDa, το οποίο αντιστοιχεί στην Gβ υπομονάδα, μετά από ανοσοεντόπιση με το αντι-Gβ αντίσωμα (Σχήμα 32, συγκρίνατε διαδρομή 2 με 3). Η πρόσδεση της Gβγ υπομονάδας στο τμήμα ΔC43-μ-CT είναι ίδια με αυτήν που παρατηρείται για το μ-CT αγρίου τύπου (Σχήμα 32, διαδρομή 3). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι οι Gβγ υπομονάδες των G πρωτεϊνών προσδένονται απευθείας και με μεγάλη συγγένεια στο συντηρημένο τμήμα του μ-OR, σε αντίθεση με τις Gα υπομονάδες στα παραπάνω πειράματα πρόσδεσης, όπου παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει απευθείας πρόσδεση αυτών στο ίδιο τμήμα του μ-OR.



Σχήμα 32. Οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στο συντηρημένο τμήμα του μ-CT. Διαδρομές 2 και 3, τα GST-χιμαιρικά ΔC43-μ-CT και μ-CT επωάστηκαν με 0,5 μM G $\beta_1\gamma_1$ , αντίστοιχα . Διαδρομή 1, καθαρή G $\beta_1\gamma_1$ . Διαδρομή 4, επώαση GST πρωτεΐνης με την ίδια ποσότητα G $\beta_1\gamma_1$ . Η ανοσοεντόπιση έγινε με το αντι-G $\beta$  αντίσωμα (αραίωση 1:5.000).

## 4.4.4 Προσδιορισμός των περιοχών αλληλεπίδρασης της RGS4 με τους οπιοειδείς υποδοχείς

#### α) Το αμινοτελικό άκρο της RGS4 ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον μ- και δ-OR

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το αμινοτελικό άκρο των RGS πρωτεϊνών είναι σημαντικό για την αλληλεπίδραση με τους GPCRs (Zeng et al., 1998; Bernstein et al., 2004). Για να εξετάσουμε τη σημασία του αμινοτελικού άκρου της RGS4 για την αλληλεπίδρασή της με τους μ-OR και δ-OR, κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με ένα HA-επισημασμένο μετάλλαγμα της RGS4, το HA-ΔNRGS4, στο οποίο λείπουν τα 57 αμινοτελικά αμινοξέα (Σχήμα 33 και Υλικά και Μέθοδοι, Πίνακας 15).



Σχήμα 33. RGS4 αγρίου τύπου και ελλειματικές μορφές της. Σε μπλε πλαίσιο φαίνεται το RGS-Box, με κόκκινο απεικονίζεται το αμινοτελικό άκρο που περιλαμβάνει την αμφιπαθική α έλικα και με πράσινο απεικονίζεται το μικρό καρβοζυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Λύματα κυττάρων που εκφράζουν την ΔNRGS4, χρησιμοποιήθηκαν σε in vitro πειράματα πρόσδεσης (pull down). Όπως φαίνεται από την έκφραση μιας ζώνης MB 34 kDa που αντιστοιχεί στην RGS4 πρωτεΐνη στο Σχήμα 34, η RGS4 άγριου τύπου προσδένεται στα καρβοξυτελικά άκρα των μ-OR και δ-OR (διαδρομές 4 και 8). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων παρουσία των οπιοειδών αγωνιστών DAMGO και DSLET (για τους μ-OR και δ-OR, αντίστοιχα) σε κύτταρα που εκφράζουν την RGS4 δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόσδεση της RGS4 σε αυτά τα τμήματα (διαδρομές 5 και 9, σύγκριση με διαδρομές 4 και 8). Αντίθετα, σε αντίστοιχα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά λύματα που εκφράζουν την ΔNRGS4, δεν παρατηρήθηκε η παρουσία ζωνών που να αντιπροσωπεύουν την ΔNRGS4, παρουσία ή απουσία των οπιοειδών αγωνιστών (διαδρομές 6, 7 και 10, 11). Παρόμοια πειράματα πρόσδεσης με τη γρήση διαμολυσμένων κυττάρων με κενό φορέα έκφρασης (διαδρομή 3) ή με τη γρήση της GST πρωτεΐνης (διαδρομή 12) δεν έδειξαν την παρουσία κάποιας ζώνης που να υποδηλώνει την πρόσδεση της RGS4. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η αμινοτελική περιοχή της RGS4 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση αυτής με τους μ-OR  $\kappa \alpha 1 \delta$ -OR.

Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις	πρωτεϊνών με	υποδοχείς που	συζεύγνυνται	με G	ι πρωτεΐνες
------------------------------	--------------	---------------	--------------	------	-------------

		_	μ-CT					δ-CT				GST
_	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
					_			_	_			
HA-RGS4	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
HA-ANRGS4	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
DAMGO	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
DSLET	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Σχήμα 34. Η HA-ANRGS4 δεν αλληλεπιδρά με τα μ- και δ-CTs. Λύματα από κύτταρα που εκφράζουν παροδικά την HA-RGS4 ή την ελλειμματική στο αμινοτελικό άκρο HA-ΔNRGS4, ενεργοποιούνται ή όχι με οπιοειδείς αγωνιστές και επωάζονται με τα GST χιμαιρικά πεπτίδια των μκαι δ-CT (0,5 μM), παρουσία διαλύματος PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες υποβάλλονται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, μεταφέρονται σε PVDF μεμβράνη και εντοπίζονται με τη χρήση του αντι-HA αντισώματος (1:3.000), όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (παράγραφος 2.3.3).

#### β) Η σημασία της 4Box περιοχής της RGS4 πρωτέινης

Δεδομένου του γεγονότος ότι το αμινοτελικό άκρο της RGS4 είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η έλλειψη και άλλων τμημάτων της RGS4 θα μπορούσε να επηρεάσει την αλληλεπίδραση αυτής τόσο με τον υποδοχέα, όσο και με τις Ga υπομονάδες. Για να διαπιστώσουμε κατά πόσο η έλλειψη τόσο του αμινοτελικού όσο και του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης RGS4 επηρεάζει την πρόσδεση αυτής στον μ-OR, χρησιμοποιήσαμε την 4Box (περιοχή που διαθέτει GAP ενεργότητα) ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, η οποία είναι επισημασμένη με τον επίτοπο 6His και δεν περιλαμβάνει το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της RGS4 αγρίου τύπου. Επώαση του τμήματος 4Box με τη χιμαιρική πρωτεΐνη του καρβοξυτελικού άκρου, έδειξε ότι η περιοχή 4Box δεν αλληλεπιδρά με το μ-CT (Σχήμα 35, επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 2). Επιπλέον, όπως φαίνεται στο ίδιο σχήμα, προ-επώαση του 4Box με την Gta-GDP, δεν επάγει την πρόσδεση ούτε του ίδιου 4Box (επάνω ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 3), αλλά ούτε και της Gta-GDP στο μ-CT (μεσαίο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 3). Αντίθετα, προ-επώαση του 4Box και της GtaGDP παρουσία του παράγοντα AMF, εμφανίζει μια ζώνη MB 19 kDa που αντιστοιχεί στο 4Box (επάνω ανοσοαποτύπωμα,

διαδρομή 4). Ανοσοαποτύπωση με ένα αντίσωμα έναντι της Ga υπομονάδας έδειξε επίσης μιας ζώνης που αντιστοιχεί στην Ga υπομονάδα (μεσαίο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομή 4). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι το τμήμα 4Box της RGS4 αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR παρουσία της Ga υπομονάδας, μόνο όταν η τελευταία βρίσκεται στην ενεργοποιημένη με τον παράγοντα AMF διαμόρφωσή της. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στο ότι η 4Box περιοχή ευθύνεται για την αλληλεπίδραση του συμπλόκου RGS4-Ga στον μ-OR, ενδεχομένως όταν ο υποδοχέας βρίσκεται σε κατάσταση ενεργοποίησης.



Σχήμα 35. Το 4Box τμήμα της RGS4 δημιουργεί ετεροτριμερές σύμπλοκο με την Gta και το μ-CT. Η Gta-GDP (0,5 μM) και η ανασυνδυασμένη His-4Box πρωτεΐνη (0,5 μM) προ-επωάζονται σε PBS με αναστολείς πρωτεασών παρουσία (διαδρομές 4, 7) ή απουσία (διαδρομές 2, 3 και 5, 6) AMF για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 20 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα αυτό προστίθεται στο ακινητοποιημένο μ-CT και επωάσεται για 25 λεπτά στους 4°C. Ακολουθούν πλύσεις, ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντόπιση με αντι-Ga (OC1, αραίωση 1:1.000) ή αντι-His (αραίωση 1:3.000). Διαδρομές 5-7, αρνητικοί μάρτυρες των δειγμάτων 2-4 με επώαση με GST πρωτεΐνη. Διαδρομή 8, καθαρή πρωτεΐνη 4Box. Διαδρομή 1, καθαρή GtaGTP. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με ανοσοεντόπιση με ένα αντι-GST αντίσωμα (αραίωση 1:5.000).

# 4.5 Ρόλος της RGS4 στην εξειδίκευση σύζευξης των οπιοειδών υποδοχέων με τις Ga υπομονάδες

#### 4.5.1 Η RGS4 αλληλεπιδρά με τον μ-OR και δ-OR σε κύτταρα ΗΕΚ293

Τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά την άμεση, in vitro αλληλεπίδραση της RGS4 πρωτεΐνης με τα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ-OR καθώς επίσης και με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του δ-OR. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των πειραμάτων πρόσδεσης που έγιναν με λύματα στα οποία έχει ενεργοποιηθεί ο μ-OR, καθώς και η *in vitro* αλληλεπίδραση του μ-CT, της RGS4 και των Gα υπομονάδων προς δημιουργία συμπλόκων μεταξύ τους, υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση της RGS4 με τις ενδοκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων επηρεάζεται από την κατάσταση ενεργοποίησης του υποδοχέα ή/και των G πρωτεϊνών.

Με βάση αυτά τα δεδομένα, θελήσαμε να προσδιορίσουμε κατά πόσο η RGS4 αλληλεπιδρά με τους οπιοειδείς υποδοχείς σε ολόκληρα κύτταρα και να εξακριβώσουμε το ρόλο που παίζει η ενεργοποίηση ή μη των οπισειδών υποδογέων στην αλληλεπίδραση αυτή. Για το λόγο αυτό, κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν σταθερά τον mycεπισημασμένο μ-OR, διαμολύνθηκαν παροδικά με την HA-RGS4 πρωτεΐνη και ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή DAMGO. Λύματα αυτών των κυττάρων επωάστηκαν στη συνέχεια με ένα αντι-myc αντίσωμα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το αντι-HA αντίσωμα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 36Α, η εμφάνιση μιας ζώνης στο ίδιο μοριακό βάρος με τον θετικό μάρτυρα (διαδρομή 1), υποδεικνύει ότι ο μ-OR συγκατακρημνίζει την RGS4 (σύγκριση διαδρομής 1 με 3-5). Η ποσότητα της RGS4 πρωτεΐνης που συνκατακρημνίσθηκε με τον μ-OR δεν διαφέρει στα κύτταρα που έχουν κατεργαστεί ή όχι με DAMGO, συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ενεργοποίηση του μ-OR δεν προκαλεί διαφορές στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την RGS4 (σύγκριση διαδρομών 3 με 5). Από την άλλη πλευρά, όταν τα κυτταρικά λύματα ενεργοποιήθηκαν με τον παράγοντα AMF, παρατηρήθηκε μια αύξηση στην πρόσδεση της RGS4 με τον μ-OR (διαδρομή 4), υποδηλώνοντας ότι η διαμόρφωση των G πρωτεϊνών στη μεταβατική τους κατάσταση (παρουσία του AMF) οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS4 με τον μ-OR

(Σχήμα 36A, συγκρίνατε διαδρομές 4 με 3, 5). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα *in vitro* πειράματα, όπου αποδείχθηκε ότι η RGS4 παρουσία της Ga υπομονάδας και του παράγοντα AMF προσδένεται ισχυρότερα στο μ-CT και δημιουργείται με αυτόν τον τρόπο ένα σύμπλοκο μεταξύ τη RGS4, της Ga υπομονάδας και του μ-CT.

A μ-OR WB: HA NMS HA RGS4 myc 2 3 4 5 7 8 6 RGS4 AMF + -DAMGO +B WB: myc NRS HA RGS4 2 3 4 u-OR ·

Σχήμα 36. Η RGS4 αλληλεπιδρά με τον μ-OR σε κύτταρα HEK293. (Α) Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν μόνιμα τον myc-μ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με 5 μg πλασμιδιακού DNA της HA-RGS4 (διαδρομές 3-8). Μετά από ανοσοκατακρήμνιση με 4 μg αντι-myc αντισώματος (9B11, #2276, Cell Signaling Biotechnology, Inc.) και ανοσοεντόπιση με το αντι-HA (1:3.000), παρατηρήσαμε την RGS4 η οποία μεταναστεύει περίπου στα 34 KDa (διαδρομές 3-5). Διαδρομές 7 και 8, θετικοί μάρτυρες από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-HA και αντι-RGS4 αντίστοιχα (4 μg). Διαδρομή 6, αρνητικός μάρτυρας από ανοσοκατακρήμνιση με φυσιολογικό ορό ποντικού (NMS, sc-2025, Santa Cruz). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων που εκφράζουν τη HA-RGS4. Διαδρομή 2, αρνητικός μάρτυρας από ανοσοκατακρήμνιση με την HA-RGS4 κυττάρων. (B) Σε κύτταρα που εκφράζουν παροδικά την HA-RGS4 (διαδρομές 3 και 4) έγινε ανοσοκατακρήμνιση με 4 μg από το αντι-HA και το αντι-RGS4 (N16, sc-6204, Santa Cruz) αντίσωμα αντίστοιχα και παρατηρήσαμε ανοσοεντόπιση του myc-μ-OR με το αντι-myc αντίσωμα (1:1.000). Ο φυσιολογικός ορός κουνελιού (NRS, sc-2027, Santa Cruz) δεν ανοσοκατακρημνίζει τον υποδοχέα (διαδρομή 2). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων που εκφράζουν τον πονοσοκατακρήμουση με 4 μg από το αντι-HA και το αντι-RGS4 (N16, sc-6204, Santa Cruz) αντίσωμα αντίστοιχα και παρατηρήσαμε ανοσοεντόπιση του myc-μ-OR με το αντι-myc αντίσωμα (διαδρομή 2). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα (διαδρομή 2). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα και παρατηρήσαμε ανοσοεντόπιση του myc-μ-OR με το αντι-myc αντίσωμα (διαδρομή 2). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων τον εκφράζουν τον υποδοχέα (διαδρομή 2). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων που εκφράζουν τον πολοχέα και παρατηρήσαμε ανοσοεντόπιση του myc-μ-OR με το αντι-myc αντίσωμα (διαδρομή 2). Διαδρομή 1, λύμα κυττάρων που εκφράζουν τον myc-μ-OR.

Ως αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε δείγματα από κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με κενό φορέα pcDNA3 (ψευδώς διαμολυσμένα κύτταρα) ή δείγματα διαμολυσμένων με HA-RGS4 κυττάρων που ανοσοκατακρημνίστηκαν με φυσικό ορό ποντικού, όπου δεν παρατηρείται η παρουσία ζώνης για την RGS4 (διαδρομές 2 και 6 αντίστοιχα). Αντίστοιχα, όταν λύματα από τα ίδια κύτταρα ανοσοκατακρημνίστηκαν με το αντι-HA ή ένα αντι-RGS4 αντίσωμα και έγινε ανοσοεντόπιση με το αντι-myc αντίσωμα, παρατηρήσαμε μια ζώνη που αντιστοιχεί στον μ-OR και η οποία υποδηλώνει την συγκατακρήμνιση του υποδοχέα με την RGS4 πρωτεΐνη (Σχήμα 36B, διαδρομές 3 και 4). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της RGS4 και του μ-OR σε κύτταρα HEK293. Η αλληλεπίδραση αυτή παρατηρείται ανεξαρτήτως της ενεργοποίησης του μ-OR, ενώ η παρουσία του AMF παράγοντα που ενεργοποιεί τις Ga υπομονάδες, οδηγεί στην αύξηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της RGS4 και του μ-OR.

Με γνώμονα τα αποτελέσματα αυτά θελήσαμε να ελέγξουμε επίσης τη φυσική αλληλεπίδραση της RGS4 και με τον δ-OR στα ίδια HEK293 κύτταρα. Για το λόγο αυτό, διαμολύναμε παροδικά κύτταρα HEK293, που εκφράζουν σταθερά τον flagεπισημασμένο δ-OR (flag-δ-OR), με την HA-RGS4 πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, ο δ-OR ενεργοποιήθηκε ή όχι με τον δ- οπιοειδή αγωνιστή DSLET και τα HEK293 κύτταρα λύθηκαν και επωάστηκαν με ένα αντι-flag αντίσωμα. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και ανοσοεντόπιση με το αντι-ΗΑ αντίσωμα, οπότε και παρατηρήσαμε την εμφάνιση μιας ζώνης στα 34 KDa που αντιστοιχεί στην HA-RGS4 πρωτεΐνη (Σχήμα 37A, σύγκριση διαδρομών 1-3 με 7). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ο δ-OR μπορεί να συγκατακρημνίσει την RGS4 πρωτεΐνη. Σύγκριση των επιπέδων της RGS4 στις διαδρομές 1-3 δείχνει ότι η ενεργοποίηση του δ-OR στα κύτταρα με τον αγωνιστή DSLET ή η κατεργασία των κυτταρικών λυμάτων με AMF δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση της RGS4 με τον δ-OR. Καμιά ζώνη για την RGS4 δεν ανιγνεύθηκε στην περίπτωση ψευδώς διαμολυσμένων κυττάρων (διαμόλυνση με κενό φορέα pcDNA3, διαδρομή 4). Όταν τα ίδια κυτταρικά λύματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με το αντι-ΗΑ ή το αντι-RGS4 αντίσωμα, επιβεβαιώσαμε μετά από ανοσοεντόπιση με αντι-flag αντίσωμα ότι ο δ-OR συγκατακρημνίζεται και άρα αλληλεπιδρά απευθείας με την RGS4 πρωτεΐνη (Σγήμα 37B, διαδρομές 3 και 4). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο δ-OR αλληλεπιδρά με την RGS4 σε HEK293 κύτταρα και ότι αυτή η αλληλεπίδραση είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησης του υποδοχέα ή της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών.



Σχήμα 37. Η RGS4 αλληλεπιδρά με τον δ-OR σε κύτταρα HEK293. (Α) Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον flag-δ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με την HA-RGS4 (5 μg) (διαδρομές 1-3 και 5-7). Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 1 μM DSLET για 5 λεπτά και τα κυτταρικά λύματα, κατεργασμένα ή όχι με AMF, ανοσοκατακρημνίστηκαν με 4 μg από ένα αντίσωμα έναντι του επιτόπου flag (monoclonal αντι-flag, F1804, Sigma). Η παρουσία της HA-RGS4 επιβεβαιώθηκε στο λύμα (διαδρομή 7) και στα ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα με το αντι-HA (4 μg) και το αντι-RGS4 (4 μg) αντίσωμα (διαδρομές 5 και 6). Διαδρομή 4, αρνητικός μάρτυρας μη διαμολυσμένων με HA-RGS4 κυττάρων. (Β) Σε κύτταρα που εκφράζουν παροδικά την HA-RGS4 (διαδρομές 3 και 4) έγινε ανοσοκατακρήμνιση με αντι-HA ή αντι-RGS4 (4 μg) και παρατηρήσαμε ανοσοεντόπιση του flag-δ-OR με ένα πολυκλωνικό αντι-flag αντίσωμα (1:500, F7425, Sigma). Λύματα που ανοσοκατακρημνίστηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (διαδρομή 2).

Συνολικά, οι παρατηρήσεις μας από τα παραπάνω πειράματα ανοσοκατακρήμνισης υποδεικνύουν ότι τόσο ο μ-OR όσο και ο δ-OR αλληλεπιδρούν με την RGS4 σε ζωντανά κύτταρα και ότι η ενεργοποίηση του εκάστοτε υποδοχέα δεν προαπαιτείται για την πρόσδεση με την RGS4. Φαίνεται ότι η RGS4 δημιουργεί ιδιοσύστατα σύμπλοκα με τους οπιοειδείς υποδοχείς, που δεν επηρεάζονται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων

αυτών. Παρόλα αυτά, όμως, παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των μ-OR και δ-OR όσον αφορά την πρόσδεση της RGS4 σε αυτούς τους υποδοχείς παρουσία του παράγοντα AMF, ο οποίος ενεργοποιεί με τεχνητό τρόπο απευθείας τις G πρωτεΐνες. Το γεγονός ότι η πρόσδεση της RGS4 στον μ-OR ενισχύεται παρουσία του παράγοντα AMF έρχεται σε συμφωνία με τα *in vitro* πειράματα, όπου παρατηρήθηκε ότι παρουσία του παράγοντα AMF η RGS4 επιτρέπει την πρόσδεση της Ga στο μ-CT, ενώ παράλληλα η αλληλεπίδραση της ίδιας της RGS4 στο μ-CT ενισχύεται.

## 4.5.2 Η RGS4 προάγει την αλληλεπίδραση συγκεκριμένων Ga υπομονάδων με τους μ-OR και δ-OR

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η RGS4 δημιουργεί in vitro ετεροτριμερή σύμπλοκα με την Ga υπομονάδα και τα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ- υποδοχέων και ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς σε κύτταρα HEK293, θελήσαμε να ελέγξουμε κατά πόσο η RGS4 προσδίδει εξειδίκευση στους ενεργοποιημένους υποδοχείς ώστε να επιλέξουν με ποιες Ga υπομονάδες θα αλληλεπιδράσουν επιλεκτικά (selectivity). Για το λόγο αυτό, ελέγξαμε την ικανότητα συγκεκριμένων Ga υπομονάδων να αλληλεπιδρούν με την RGS4, μετά από ενεργοποίηση ή όχι των μ- και δ-ORs σε κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν τους υποδοχείς αυτούς, με πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 38Α, λύματα κυττάρων που εκφράζουν σταθερά τον μ-OR και παροδικά ή όχι την HA-RGS4 ανοσοκατακρημνίζονται με το αντι-ΗΑ αντίσωμα (διαδρομές 2-5). Στην ανοσοεντόπιση χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα έναντι των Gia1.3 υπομονάδων, το οποίο αποκάλυψε την παρουσία μιας ζώνης που αντιστοιχεί στις Gia13, στα δείγματα που έχουν κατεργαστεί με DAMGO ή AMF (διαδρομές 4 και 5). Αντίθετα, καμία ζώνη δεν εντοπίστηκε στα μη ενεργοποιημένα δείγματα (διαδρομή 3), στα δείγματα από διαμολυσμένα κύτταρα με κενό φορέα pcDNA3 (ψευδώς διαμολυσμένα, διαδρομή 2) ή στα δείγματα που επωάστηκαν με φυσικό ορρό κουνελιού (διαδρομή 6). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι οι Gia1,3 αλληλεπιδρούν με την RGS4 στα HEK293 όταν ο μ-OR είναι ενεργοποιημένος ή όταν οι Ga πρωτεΐνες βρίσκονται στη μεταβατική διαμόρφωση. Κατά αντίστοιχο τρόπο, η RGS4 αλληλεπιδρά με την Gia<sub>2</sub> και την Goa μόνο σε κυτταρικά λύματα που έχουν κατεργαστεί με DAMGO ή AMF (Σχήμα 38B και Γ, διαδρομές 5, 6) και όχι υπό συνθήκες μη ενεργοποίησης.



Σχήμα 38. Αλληλεπίδραση της RGS4 πρωτεΐνης με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες σε κύτταρα που εκφράζουν τον μ-OR. Κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν σταθερά τον myc-μ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-RGS4 (5 μg) ή κενό φορέα έκφρασης pcDNA3 (5 μg). (A) Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 1 μΜ DAMGO για 5 λεπτά και τα κυτταρικά λύματα κατεργάστηκαν ή όχι με AMF, ενώ ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντι-HA αντίσωμα (4 μg). Οι Gia13 υπομονάδες ανοσοεντοπίστηκαν με ένα αντι-Gia13 αντίσωμα (C-10, sc-262, Santa Cruz, 1:1.000). Διαδρομή 1, οι Gia1.3 στα κυτταρικά λύματα, διαδρομή 7, οι Gia1.3 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με το αντι-Gia1.3 αντίσωμα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ανοσοκατακρημνισμένα λύματα με φυσικό ορό κουνελιού (NRS) (διαδρομή 6) ή ψευδώς διαμολυσμένα κύτταρα (διαδρομή 2). (Β) και (Γ) Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν ή όγι με 1 μΜ DAMGO ή AMF και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με τα αντι-Gia2 και αντι-Gao αντισώματα (4 μg). Οι διαδρομές 4-6 αντιπροσωπεύουν την RGS4 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με ένα αντι-Gia<sub>2</sub> ή αντι-Goa αντίσωμα (1: 800 και 1:1.000 αντίστοιχα), υπό συνθήκες ενεργοποίησης ή μη. Η RGS4 δεν ανοσοσυγκατακρημνίζεται στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα (διαδρομή 4). Οι διαδρομές 1 και 8 αντιπροσωπεύουν την παρουσία της RGS4 σε κυτταρικά λύματα και ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα αντίστοιγα. Ψευδώς διαμολυσμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (διαδρομές 3 και 7).

Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η RGS4 δημιουργεί ετεροτριμερή σύμπλοκα σε ΗΕΚ293 κύτταρα με επιλεγμένες G πρωτεΐνες μόνο μετά την ενεργοποίηση του μ-OR.

Για να διαπιστωθεί κατά πόσο η RGS4 προάγει την αλληλεπίδραση του δ-OR με τις Gia<sub>2</sub>, Gia<sub>1,3</sub> και Goa χωρίς ή μετά την ενεργοποίησή του, πραγματοποιήθηκαν παρόμοια πειράματα σε κύτταρα που εκφράζουν σταθερά τον δ-OR και διαμολύνθηκαν παροδικά με την HA-RGS4. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 39A, η ανοσοκατακρήμνιση των λυμάτων από HEK293 κύτταρα με το αντι-HA αντίσωμα έδειξε την παρουσία μιας ζώνης που αντιπροσωπεύει την Gia<sub>2</sub> μόνο όταν τα κύτταρα ενεργοποιούνται με DSLET ή στην περίπτωση που τα κυτταρικά λύματα κατεργαστούν με AMF (σύγκριση ζώνης σε διαδρομές 1, 2 με διαδρομές 5, 6). Καμία ζώνη δεν εντοπίστηκε σε δείγματα απουσία ενεργοποίησης με DSLET ή σε δείγματα ψευδώς διαμολυσμένων κυττάρων (διαδρομές 4, 3 αντίστοιχα). Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι η RGS4 δημιουργεί ετεροτριμερή σύμπλοκα με την Gia<sub>2</sub> μόνο μετά από ενεργοποίηση του δ-OR, όπως και στην περίπτωση του μ-OR.

Για να ελέγξουμε εάν η ενεργοποίηση του δ-OR προάγει την πρόσδεση των Gia1.3 με την RGS4, λύματα από τα ίδια κύτταρα ανοσοκατακρημνίστηκαν με το αντι-HA αντίσωμα και ακολούθησε ανοσοεντόπιση με το αντι-Gia13 αντίσωμα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 39B, οι Gia1.3 συγκατακρημνίζονται με την RGS4 σε δείγματα από κύτταρα όπου έχει δεν ενεργοποιηθεί ο δ-OR (διαδρομή 4). Σε δείγματα από κυτταρικά λύματα που έχουν κατεργαστεί με AMF παρατηρείται αυξημένη συγκατακρήμνιση των Gia<sub>1.3</sub> με την RGS4 (διαδρομή 6). Από την άλλη πλευρά, η αλληλεπίδραση της RGS4 με τις Gia<sub>1.3</sub> μειώνεται σημαντικά όταν τα κύτταρα ενεργοποιούνται με 1 μM DSLET (διαδρομή 5). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι ο ενεργοποιημένος δ-OR δεν προάγει τη δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ της RGS4 και των Gia1.3. Επιπλέον, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση της RGS4 με την Goa σε κύτταρα HEK293, έδειξαν ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με την Goa εξίσου καλά υπό οποιεσδήποτε συνθήκες ενεργοποίησης ή μη (DSLET, AMF ή απουσία αγωνιστή) (Σχήμα 39Γ, διαδρομές 3-5). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι η RGS4 δημιουργεί σύμπλοκα με την Goa και τον δ-OR στα HEK293 κύτταρα και ότι ο σχηματισμός των συμπλόκων αυτών δεν επηρεάζεται από την κατάσταση ενεργοποίησης του υποδοχέα.



Σχήμα 39. Αλληλεπίδραση της RGS4 πρωτεΐνης με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες σε κύτταρα που εκφράζουν τον δ-OR. Κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν σταθερά τον flag-δ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-RGS4 (5 μg) ή κενό φορέα έκφρασης pcDNA3. (A) Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 1 μM DSLET για 5 λεπτά και τα κυτταρικά λύματα κατεργάστηκαν ή όχι με AMF, και ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-ΗΑ αντίσωμα (4 μg). Η παρουσία της Gia<sub>2</sub> ανιχνεύθηκε με ένα αντι-Gia2 αντίσωμα (1:1.000). Οι διαδρομές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν την παρουσία της Gia2 σε εγκεφαλικά και κυτταρικά παρασκευάσματα αντίστοιχα. Η διαδρομή 3 αντιπροσωπεύει ψευδώς διαμολυσμένα κύτταρα ανοσοκατακρημνισμένα με ένα αντι-ΗΑ αντίσωμα. Οι διαδρομές 5 και 6 αντιπροσωπεύουν την Gia2 που έχει συγκατακρημνιστεί με το αντι-HA αντίσωμα έναντι του επιτόπου ΗΑ της RGS4. (B) Τα κύτταρα ΗΕΚ293 ανοσοκατακρημνίστηκαν με το αντι-ΗΑ αντίσωμα, όπως και στο Α. Η παρουσία των Gia13 στα κυτταρικά λύματα επιβεβαιώθηκε με ανοσοκατακρήμνιση με ένα αντι-Gia<sub>1,3</sub> αντίσωμα (διαδρομές 7 και 8). Οι Gia<sub>1,3</sub> αλληλεπιδρούν με την RGS4 απουσία αγωνιστή (διαδρομή 4). Αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνει όταν τα κυτταρικά λύματα ενεργοποιούνται με AMF (διαδρομή 6), ενώ αντίθετα ελαχιστοποιείται παρουσία του DSLET (διαδρομή 5). Οι διαδρομές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τις Gia13 σε κυτταρικά και εγκεφαλικά παρασκευάσματα αντίστοιγα. (Γ) Κυτταρικά λύματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-Goa αντίσωμα και έγινε ανοσοεντόπιση με αντι-HA. Η διαδρομή 1 αντιπροσωπεύει την HA-RGS4 σε κυτταρικά λύματα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε λύμα από ψευδώς διαμολυσμένα κύτταρα, το οποίο ανοσοκατακρημνίστηκε με αντι-Goa (διαδρομή 2). Οι διαδρομές αντιπροσωπεύουν την RGS4 που 3-5 έχει ανοσοσυγκατακρημνιστεί με το αντι-Goa αντίσωμα.

Συμπερασματικά, λοιπόν, στην περίπτωση του δ-OR, η έκφραση της RGS4 στα HEK293 έχει ως αποτέλεσμα την ιδιοσύστατη δημιουργία ετεροτριμερών συμπλόκων μεταξύ της RGS4, του υποδοχέα, των Gia<sub>1,3</sub> και των Goa πρωτεϊνών. Δηλαδή, έκφραση του δ-OR στα κύτταρα, προάγει τη δημιουργία ζευγών RGS4-Gia<sub>1,3</sub> και RGS4-Goa απουσία ενεργοποίησης του υποδοχέα και κατά συνέπεια δημιουργία τριμερών συμπλόκων μεταξύ του δ-OR υποδοχέα, των συγκεκριμένων Ga υπομονάδων και της RGS4. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα όπου η ενεργοποίηση του υποδοχέα δ-OR, έχει ως συνέπεια την απομάκρυνση των Gia<sub>1,3</sub> από την RGS4. Επιπλέον, τα ζεύγη RGS4-Goa δημιουργούνται ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση ή μη του δ-OR ή των Goa υπομονάδων.

### 4.6 Επίδραση της RGS4 στην κυτταρική σηματοδότηση των μκαι δ- οπιοειδών υποδοχέων

#### α) Έκφραση RGS4 και οπιοειδών υποδοχέων στα κύτταρα

Έχει βρεθεί ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός των RGS πρωτεϊνών μπορεί να επηρεαστεί α) από την παρουσία των G πρωτεϊνών στο εκάστοτε κυτταρικό σύστημα και β) από την παρουσία των ίδιων των GPCR υποδοχέων (Roy et al., 2003). Για να προσδιορίσουμε την κατανομή της RGS4 σε κύτταρα HEK293, χρησιμοποιήσαμε αρχικά απλή μικροσκοπία φθορισμού ώστε να λάβουμε μια γενική εικόνα της έκφρασης της RGS4 στα κύτταρα (το μικροσκόπιο φθορισμού δίνει μια γενική εικόνα του σήματος και δεν ξεχωρίζει υποκυτταρική κατανομή). Για το λόγο αυτό, εκφράσαμε τη χιμαιρική πρωτεΐνη RGS4-GFP σε κύτταρα HEK293 και παρατηρήσαμε τον φθορισμό του επιτόπου GFP. Οι εικόνες του φθορισμού της RGS4-GFP που λάβαμε από το μικροσκόπιο δείχνουν ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται ομοιογενώς σε όλο το κύτταρο (Σχήμα 40A). Αντίστοιχα πειράματα σε κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τους μ-OR και δ-OR και με τη χρήση αντισωμάτων που δίνουν φθορισμό μετά από όλο το κύτταρο, με εντονότερο φθορισμό να προέρχεται από τη μεμβράνη περιμετρικά των κυττάρων

(Σχήμα 40B και Γ αντίστοιχα). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει εντοπισμό των υποδοχέων περιμετρικά της μεμβράνης, όπως αναμένεται υπό φυσιολογικές συνθήκες.



Σχήμα 40. Κατανομή της RGS4-GFP και των μ-OR, δ-OR στο κύτταρο. (A) Ο φθορισμός της RGS4-GFP παρατηρείται ομοιογενής στο κύτταρο. Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με RGS4-GFP και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου και εντοπίστηκε η έκφραση της RGS4 από το έντονο, χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που δίνει ο επίτοπος GFP. Ο φθορισμός του μ-OR (B) και του δ-OR (Γ) κατανέμεται σε όλο το κύτταρο, αλλά κυρίως περιμετρικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπως και αναμένεται. Για την παρατήρηση των μ-OR και δ-OR, χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα EE-HEK και flag-δ-OR κύτταρα, τα οποία επεξεργάστηκαν με ένα αντι-EE (1:1.000, 18838, QED Bioscience Inc.) και ένα αντι-flag (1:200, monoclonal αντι-flag, Sigma) αντίσωμα αντίστοιχα και στη συνέχεια με το αντι-rabbit και αντι-mouse Alexa Fluor 568 (για διαδικασία βλ. παράγραφο 3.3.11) που δίνει το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα.

#### β) Υποκυτταρικός εντοπισμός της RGS4

Για να ελέγξουμε κατά πόσο η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή της RGS4 πρωτεΐνης, κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τους myc-μ-OR ή flag-δ-OR υποδοχείς, διαμολύνθηκαν παροδικά με την HA-RGS4 και ενεργοποιήθηκαν ή όχι με αγωνιστές. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων, επώαση με αντισώματα έναντι των επιτόπων των πρωτεϊνών και επακόλουθη επώαση με δεύτερα αντισώματα που φέρουν χρωμοφόρες ομάδες, όπως περιγράφεται στις *Μεθόδους*. Στις εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας που λάβαμε (Σχήμα 41A, πάνω σειρά) φαίνεται ότι στην κατάσταση ηρεμίας ο μ-OR εντοπίζεται στη μεμβράνη ενώ η RGS4 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και σε μικρότερο βαθμό παραμένει διάχυτη κατανεμημένη στη μεμβράνη των κυττάρων, χωρίς να παρατηρείται συν-εντοπισμός των δυο πρωτεϊνών (υπέρθεση, πάνω σειρά).



Σχήμα 41. Η RGS4 συνεντοπίζεται με τους ενεργοποιημένους μ- και δ-ORs. (A) Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον myc-μ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με τη HA-RGS4 (5 μg) και ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 5 μM DAMGO για 15 λεπτά και 1 ώρα, μονιμοποιήθηκαν και ανοσοεπισημάνθηκαν με το μονοκλωνικό αντι-myc (1:1.250) και το πολυκλωνικό αντι-HA αντίσωμα (1:500). Το κόκκινο αντιπροσωπεύει τον myc-μ-OR, το πράσινο αντιπροσωπεύει την HA-RGS4 και το κίτρινο αντιπροσωπεύει υπέρθεση του πράσινου και κόκκινου φθορισμού. (B) Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον flag-δ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-RGS4, ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 10 μM DSLET για 15 λεπτά και 1 ώρα, μονιμοποιήθηκαν και ανοσοεπισημάνθηκαν το μονοκλωνικό αντι-myc ποράσινου και κόκκινου φθορισμού. (B) Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον flag-δ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-RGS4, ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 10 μM DSLET για 15 λεπτά και 1 ώρα, μονιμοποιήθηκαν και ανοσοεπισημάνθηκαν το το πολυκλωνικό αντι-HA (1:500) αντίσωμα. Το κόκκινο αντιπροσωπεύει τον flag-δ-OR, το πράσινο αντιπροσωπεύει την HA-RGS4 και το κίτρινο αντιπροσωπεύει τον flag-δ-OR, το πράσινο αντιπροσωπεύει την HA-RGS4 και το κίτρινο αντιπροσωπεύει τον flag-δ-OR, το πράσινο και κόκκινου φθορισμού. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπεύει υπέρθεση του πράσινου και κόκκινου φθορισμού. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπεύει υπέρθεση του πράσινου και κόκκινου φθορισμού. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπεύει την HA-RGS4 και το κίτρινο αντιπροσωπεύει υπέρθεση του πράσινου και κόκκινου φθορισμού.

Η ενεργοποίηση των κυττάρων με DAMGO για 15 λεπτά, οδηγεί σε αλλαγή της κατανομής της RGS4. Πράγματι, όπως φαίνεται στο Σχήμα 41A, η ενεργοποίηση του μ-OR με 5 μM DAMGO για 10 λεπτά οδηγεί σε μετατόπιση της RGS4 στην κυτταρική μεμβράνη, όπου συνεντοπίζεται με τον μ-OR (Σχήμα 41A, υπέρθεση, μεσαία σειρά). Από την άλλη πλευρά, όταν τα κύτταρα ενεργοποιούνται με 5 μM DAMGO για 1 ώρα, η RGS4 συνεντοπίζεται με τον μ-OR στο κυτταρόπλασμα, όπου σημαντικό μέρος του υποδοχέα έχει πλέον εσωτερικευθεί (υπέρθεση, κάτω σειρά, δεξιά εικόνα).

Παράλληλα, πειράματα σε κύτταρα που εκφράζουν τον flag-επισημασμένο δ-OR έδειξαν ότι στην κατάσταση ηρεμίας του υποδοχέα, η έκφραση της RGS4 παρατηρείται κυρίως στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, ενώ ο υποδοχέας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στη μεμβράνη (Σχήμα 41B, πάνω σειρά). Ένα μικρό ποσοστό της RGS4 παρατηρείται να συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα (υπέρθεση, πάνω σειρά). Ενεργοποίηση των κυττάρων με DSLET για 15 λεπτά έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση μέρους της RGS4 προς την πλασματική μεμβράνη και την εσωτερίκευση ενός ποσοστού του δ-OR στο κυτταρόπλασμα (Σχήμα 41B, μεσαία σειρά). Στην υπέρθεση των δυο εικόνων της συνεστιακής μικροσκοπίας παρατηρούμε ότι η RGS4 συνεντοπίζεται με τον δ-OR στην πλασματική μεμβράνη, όπως επίσης ένα σημαντικό ποσοστό της RGS4 παρατηρείται να συνεντοπίζεται με τον εσωτερικευμένο δ-OR στο κυτταρόπλασμα (Σχήμα 41B, υπέρθεση, μεσαία σειρά). Ενεργοποίηση των κυττάρων με DSLET για 1 ώρα οδηγεί σε σχεδόν πλήρη ενδοκύττωση του δ-OR στο κυτταρόπλασμα (Σχήμα 41B, κάτω σειρά). Η RGS4 εξακολουθεί να συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα δ-OR, όμως ο συνεντοπισμός αυτός παρατηρείται εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα και όχι στην πλασματική μεμβράνη (Σχήμα 41Β, υπέρθεση, κάτω σειρά). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της RGS4 επηρεάζεται από την κατάσταση ενεργοποίησης των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων.

#### 4.6.1 Λειτουργική επίδραση της RGS4 σε κύτταρα HEK293

## α) Επίδραση της RGS4 στη συγγένεια πρόσδεσης του μ-OR για οπιοειδείς προσδέτες

Για να μελετήσουμε κατά πόσο η έκφραση της RGS4 πρωτεΐνης επηρεάζει την δυνατότητα πρόσδεσης του μ-OR για διάφορους αγωνιστές, έγιναν πειράματα εκτόπισης χρησιμοποιώντας τον τριτιωμένο ανταγωνιστή διπρενορφίνη ([<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνη) σε μεμβράνες κυττάρων HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον μ-OR επισημασμένο με τον επίτοπο ΕΕ (ΕΕ-μ-OR) και οι οποίες επωάζονται με την ανασυνδυασμένη His-RGS4. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η ικανότητα του μ- οπιοειδούς αγωνιστή DAMGO να εκτοπίζει την [<sup>3</sup>H] διπρενορφίνη δεν αλλάζει με την παρουσία της RGS4, συγκρινόμενη με την πρόσδεση που παρατηρείται σε αντίστοιχες μεμβράνες κυττάρων απουσία της

RGS4 (Σχήμα 42). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η RGS4 δεν τροποποιεί την κινητική πρόσδεσης του DAMGO στην εκτόπιση της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης. Δηλαδή, η RGS4, παρόλο που αλληλεπιδρά με τις Ga, δεν φαίνεται να οδηγεί τον υποδοχέα στην κατάσταση χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η RGS4 επηρεάζει τη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων, με τους οποίους αλληλεπιδρά, κυρίως στο επίπεδο των τελεστών και δεν τροποποιεί τη συγγένεια πρόσδεσής τους για τους αγωνιστές.



Σχήμα 42. Η RGS4 δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του μ-OR για το οπιοειδές πεπτίδιο DAMGO. Η μελέτη της εκτόπισης της ειδικής πρόσδεσης της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης στον μ-OR από τον αγωνιστή DAMGO, γίνεται σε μεμβράνες κυττάρων HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον EE-μ-OR. Οι μεμβράνες προ-επωάζονται ή όχι με σταθερή συγκέντρωση της His-RGS4 (1 μM) για 30 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί κλασμάτωση των μεμβρανών σε σωληνάκια και επώαση με τον ανταγωνιστή [<sup>3</sup>H] διπρενορφίνης (2,5 nM) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις DAMGO για 45 λεπτά στους 30°C, όπως περιγράφεται στις *Μεθόδους* (παράγραφος 3.4.1). Το αποτέλεσμα της εκτόπισης της [<sup>3</sup>H]-διπρενορφίνης από το DAMGO φαίνεται με την κόκκινη καμπύλη. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες των ίδιων κυττάρων που δεν προ-επωάστηκαν με την His-RGS4 (μαύρη καμπύλη). Η μη ειδική πρόσδεση μετρήθηκε παρουσία 10 μM του μη ραδιοσημασμένου ανταγωνιστή ναλοξόνη.

#### β) Επίδραση της RGS4 στην αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης μετά από ενεργοποίηση του μ-OR

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας έχουν δείξει ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με τους μκαι δ-ORs. Οι μελέτες μας επίσης έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή προσδίδει στους υποδοχείς την ικανότητα να επιλέγουν, ανάλογα με τις συνθήκες ενεργοποίησής τους, τον υποπληθυσμό των Ga υπομονάδων με τον οποίο θα αλληλεπιδράσουν, υποδεικνύοντας έτσι τη σημασία της RGS4 πρωτεΐνης στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων. Σε μια προσπάθεια να προσδιορίσουμε την λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης της RGS4 με τους οπιοειδείς υποδοχείς, εξετάσαμε την ικανότητα της HA-RGS4 να μεταβάλει την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, σε κύτταρα HEK293 που εκφράζουν τον μ-OR μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα.



Σχήμα 43. Η RGS4 αναστέλλει τη μείωση της συσσώρευσης του κυκλικού AMP που επάγεται από τη σηματοδότηση του μ-OR. Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον EE-μ-OR διαμολύνθηκαν με την HA-RGS4 (5 μg) ή με την HA-ΔNRGS4 (5 μg). 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επωάστηκαν με [<sup>3</sup>H]-αδενίνη (1,5 μCi/mL) όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η παραγωγή του ραδιενεργού κυκλικού AMP ([<sup>3</sup>H]-cAMP) μετρήθηκε ως απόκριση στην κατεργασία των κυττάρων με φορσκολίνη (50 μM) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις DAMGO, σε κύτταρα που εκφράζουν HA-RGS4, HA-ΔNRGS4 ή έχουν διαμολυνθεί με κενό φορέα pcDNA3. Τα δεδομένα παρατίθενται ως επί τοις εκατό της συσσώρευσης cAMP (το 100% αντιστοιχεί σε δείγμα ενεργοποιημένο με φορσκολίνη) και αντιπροσωπεύουν τη μέση τυπική απόκλιση τριπλών δειγμάτων από τουλάχιστον 4 πειράματα. Οι κύκλοι (•) αντιστοιχούν σε κύτταρα που εκφράζουν την RGS4 (κόκκινη καμπύλη), τα τετράγωνα (**■**) σε κύτταρα διαμολυσμένα με κενό φορέα (μαύρη καμπύλη) και τα τρίγωνα (**Δ**) σε κύτταρα που εκφράζουν την ΔNRGS4 (μπλε καμπύλη).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 43, η έκφραση της HA-RGS4 στα κύτταρα μείωσε σημαντικά την αναστολή που προκαλεί ο αγωνιστής DAMGO σε κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί
με φορσκολίνη και αυτό φαίνεται από τη μετατόπιση της καμπύλης των επιπέδων του συσσωρευμένου κυκλικού AMP (cAMP) προς τα δεξιά παρουσία της HA-RGS4, σε σύγκριση με τα επίπεδα του cAMP που παρατηρούνται απουσία αυτής. Πράγματι, όπως φαίνεται στο Σχήμα 43, κατεργασία των κυττάρων ΕΕ-ΗΕΚ με 500 nM DAMGO είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης του cAMP κατά  $50\pm3$  %, με συγκέντρωση αναστολής IC<sub>50</sub>= 3,2 nM. Η αναστολή αυτή μειώνεται σε  $32\pm8$  % μετά από την έκφραση της RGS4 στα HEK293 κύτταρα, με μια μετατόπιση της IC<sub>50</sub> στα 44 nM. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η RGS4 τροποποιεί την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης που προκαλείται από την ενεργοποίηση του μ-OR και ουσιαστικά αναχαιτίζει τη δράση του οπιοειδούς αγωνιστή, παρεμποδίζοντας έτσι την οπιοειδή σηματοδότηση.

## <u>Ρόλος του αμινοτελικού άκρου της RGS4 στην οπιοειδή σηματοδότηση μέσω της</u> αδενυλικής κυκλάσης

Δεδομένου ότι το αμινοτελικό άκρο της RGS4 παίζει σημαντικό ρόλο τόσο για την αλληλεπίδρασή της με τους οπιοειδείς υποδοχείς, όσο και για τον εντοπισμό της στη μεμβράνη, ελέγξαμε το ρόλο της περιοχής αυτής της RGS4 στη σηματοδότηση της αδενυλικής κυκλάσης μετά από ενεργοποίηση του μ-OR. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε την ελλειμματική μορφή της RGS4 πρωτεΐνης HA-ΔNRGS4, από την οποία έχουν αποκοπεί τα 57 αμινοξέα του αμινοτελικού της άκρου (Σχήμα 33 και Υλικά και Μέθοδοι, Πίνακας 15). Έκφραση της HA-ΔNRGS4 σε κύτταρα HEK293 που εκφράζουν τον μ-OR και μέτρηση της συσσώρευσης του cAMP μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με DAMGO, έδειξε ότι η παρουσία της ΔNRGS4 στα κύτταρα, αναστρέφει τη συσσώρευση του κυκλικού AMP στα επίπεδα που παρατηρούνται απουσία ΔNRGS4). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι το αμινοτελικό άκρο της RGS4 είναι απαραίτητο για τη δράση της RGS4 στη λειτουργία της αδενυλικής κυκλάσης.

#### γ) Επίδραση της RGS4 στην ενεργοποίηση των ERK1,2 από τους μ- και δ-ORs

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μ-OR και δ-OR ενεργοποιούν τις ERK1,2 μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν G πρωτεΐνες οι οποίες είναι ευαίσθητες στην

τοξίνη του κοκίτη (Belcheva et al., 2002, Morou and Georgoussi, 2005). Για να εξετάσουμε εάν η έκφραση της RGS4 μεταβάλει την ενεργοποίηση των ERK1,2 μετά από ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων, κύτταρα HEK293 που εκφράζουν τους myc-μ-OR και flag-δ-OR, επωάζονται με κατάλληλους αγωνιστές για διάφορους χρόνους. Στο Σχήμα 44A και B, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των μ-OR και δ-OR για 2 και 5 λεπτά με τους αγωνιστές DAMGO και DSLET αντίστοιχα, οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης των ERK1,2 (διαδρομές 5, 6). Η φωσφορυλίωση αυτή μειώνεται αισθητά όταν η RGS4 συνεκφράζεται στα HEK293 κύτταρα (διαδρομές 2, 3), δηλώνοντας ότι η RGS4 εμπλέκεται καθοριστικά στη σηματοδότηση των ERK1,2 από τους οπιοειδείς υποδοχείς.



Σχήμα 44. Η RGS4 μειώνει τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1,2 που επάγονται από την ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων. Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον myc-μ-OR (A) ή τον flag-δ-OR (B) διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-RGS4 ή κενό φορέα. 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με τους κατάλληλους αγωνιστές για 2 και 5 λεπτά και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE. Οι φωσφορυλιωμένες ERK ανοσοεντοπίστηκαν με ένα αντι-pERK αντίσωμα (αραίωση 1:1.000). Ποσοτικοποίηση της ERK: η ηλεκτροφόρηση ίσων ποσοτήτων πρωτεϊνικών δειγμάτων επιβεβαιώθηκε ύστερα από απομάκρυνση του αντι-pERK αντισώματος και ανοσοεντόπιση με ένα αντι-ERK αντίσωμα (1:1.000).

## Σημασία του αμινοτελικού άκρου της RGS4 στη σηματοδότηση μέσω των ERK1,2

Για να προσδιορίσουμε το λειτουργικό ρόλο του αμινοτελικού άκρου της RGS4 στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων, κύτταρα M27 διαμολύνθηκαν με την ελλειμματική για το αμινοτελικό άκρο HA-ΔNRGS4 και ακολούθησε φωσφορυλίωση των ERK1,2 παρουσία του μ- οπιοειδούς αγωνιστή DAMGO. Μετά από ενεργοποίηση με DAMGO και ηλεκτροφόρηση, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι σε κύτταρα που εκφράζουν την HA-ΔNRGS4 δεν παρατηρείται καμιά μεταβολή στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1,2, σε σύγκριση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με κενό φορέα (Σχήμα 45, σύγκριση διαδρομών 2, 3 με 5, 6). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη σημασία του αμινοτελικού άκρου της RGS4 στη λειτουργική δράση της πρωτεΐνης.



Σχήμα 45. Το αμινοτελικό άκρο της RGS4 ευθύνεται για τη δράση της στη φωσφορυλίωση των ERK1,2. Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν σταθερά τον myc-μ-OR διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-ΔNRGS4 ή κενό φορέα και ενεργοποιήθηκαν με DAMGO για τους δεικνυόμενους χρόνους. Οι φωσφορυλιωμένες ERK1,2 ανοσοεντοπίστηκαν με το αντι-pERK αντίσωμα (1:1.000). Κάτω πλαίσιο: μετά από απομάκρυνση του αντι-pERK αντισώματος και ανοσοεντόπιση με το αντι-ERK αντίσωμα (1:1.000) επιβεβαιώθηκαν οι ίσες ποσότητες των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται η λειτουργική επίδραση της RGS4 στην κυτταρική σηματοδότηση των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων. Ο σημαντικός ρόλος της RGS4 πρωτεΐνης έγκειται στο γεγονός ότι, όχι μόνο αλληλεπιδρά με τους οπιοειδείς υποδοχείς όπως έδειξαν τα *in vitro* πειράματα, αλλά επίσης η αλληλεπίδραση αυτή έχει λειτουργική σπουδαιότητα, καθώς ρυθμίζει καθοριστικά τη δράση των οπιοειδών υποδοχέων στους τελεστές τους.

## Επίδραση της RGS4 στην ενεργοποίηση των ERK1,2 από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων

Για να μελετήσουμε κατά πόσο η επίδραση της RGS4 στη φωσφορυλίωση των ERK1,2 εξειδικεύεται αποκλειστικά σε μέλη της οικογένειας των GPCR (οπιοειδείς υποδοχείς), εξετάσαμε τις ενδεχόμενες αλλαγές που παρατηρούνται παρουσία της RGS4 στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK κινασών από αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) που προκαλεί την ταχεία ενεργοποίηση των ERK μέσω του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης EGFR. Για το λόγο αυτό, κύτταρα HEK293 που εκφράζουν ενδογενώς τον EGFR επωάστηκαν με 10 nM του αναπτυξιακού παράγοντα και στα λύματά τους ανιχνεύθηκαν οι φωσφορυλιωμένες ERK1,2. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 46, ο υποδοχέας EGFR οδηγεί σε φωσφορυλίωση των ERK1,2 σε 2 και 30 λεπτά επώασης. Η έκφραση της RGS4 στα ίδια κύτταρα δεν μεταβάλει τη φωσφορυλίωση των ERK1,2 που προκλήθηκε από την ενεργοποίηση του EGF υποδοχέα. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι η RGS4 δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση των ERK1,2 κινασών από έναν υποδοχέα που σηματοδοτεί μέσω ενδιάμεσων μορίων, στα οποία δεν συμμετέχουν οι G και οι RGS πρωτεΐνες.



Σχήμα 46. Η RGS4 δεν επηρεάζει τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1,2 που επάγονται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR. Κύτταρα HEK293 που εκφράζουν ενδογενώς τον EGFR διαμολύνθηκαν παροδικά με HA-RGS4 ή κενό φορέα (5 μg αμφότερα) και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 10 nM EGF για 2 και 30 λεπτά, ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στις Μεθόδους. Διαδρομές 7 και 8, κύτταρα M27, τα οποία εκφράζουν τον myc-μ-OR, διαμολύνθηκαν με την HA-RGS4 και κενό φορέα αντίστοιχα και ενεργοποιήθηκαν με 1 μM DAMGO για 5 λεπτά. Κάτω ανοσοαποτύπωμα: Με τη βοήθεια του αντι-ERK αντίσωματος (1:1.000) ελέγχθηκαν οι ποσότητες των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

# 5. Συζήτηση

Οι οπιοειδείς υποδοχείς ευθύνονται για το φαινόμενο της αναλγησίας, εμπλέκονται όμως και σε δριμείες παρενέργειες στη φυσιολογία ενός οργανισμού, όπως στην ανοχή και εξάρτηση μετά από παρατεταμένη χρήση οπιοειδών. Τα φαινόμενα αυτά έχουν τη βάση τους σε μοριακούς μηχανισμούς σηματοδότησης των οπιοειδών υποδοχέων, οι οποίοι ξεκινούν από την αλληλεπίδραση αυτών με τις G πρωτεΐνες, αλλά και άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Τα πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δημιουργούνται με «πλατφόρμα» τους υποδοχείς αυτούς είναι καθοριστικά για τη μετάδοση του ερεθίσματος στο εσωτερικό του κυττάρου και για το λόγο αυτό η μελέτη νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους GPCRs και τους οπιοειδείς υποδοχείς ειδικότερα, θα μπορούσε να συμβάλλει στον προσδιορισμό νέων φαρμακολογικών παραγόντων για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Πρωταρχικά πειράματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι Ga υπομονάδες αλληλεπιδρούν απευθείας με τον δ-OR μέσω της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού άκρου του υποδοχέα. Τα αποτελέσματά μας επίσης δείχνουν ότι η συγγένεια πρόσδεσης των ενεργών Ga υπομονάδων (GaGTP) για την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του δ-OR είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τη συγγένεια πρόσδεσης των ανενεργών και ετεροτριμερών Ga για την ίδια περιοχή του υποδοχέα. Αντίθετα, η συγγένεια πρόσδεσης της ενεργής Ga είναι μικρότερη για το καρβοζυτελικό άκρο του δ-OR. Αυτό δηλώνει ότι ο δ-OR διαθέτει διακριτές κυτταροπλασματικές περιοχές για την αλληλεπίδραση με τις διαφορετικές διαμορφώσεις της Ga υπομονάδας, και είναι σε θέση να αλληλεπίδραση με τις διαφορετικές διαμορφώσεις της Ga υπομονάδας (ιδιοσύστατα) για να μεταβιβάζει γρήγορα το σήμα του στους τελεστές, αλλά επίσης για να είναι έτοιμος να δεχθεί ένα νέο ερέθισμα, αμέσως μετά την απενεργοποίησή του.

Στην περίπτωση του μ-OR, προκαταρκτικά πειράματα του εργαστηρίου έδειξαν ότι το καρβοξυτελικό του άκρο δεν είναι το σημείο πρόσδεσης των Ga υπομονάδων και ότι η απουσία πρόσδεσής τους δεν μεταβάλλεται από την κατάσταση ενεργοποίησης της Ga πρωτεΐνης ή από τον υπότυπο της Ga, π.χ. Gta, Gia ή Goa. Το γεγονός ότι η Ga υπομονάδα δεν αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR μπορεί να οφείλεται στο ότι α) η Ga αλληλεπιδρά κυρίως με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά και δεν χρειάζεται τη συμβολή του καρβοξυτελικού άκρου, β) οι Gβγ υπομονάδες καλύπτουν τη θέση πρόσδεσης για την Ga στο μ-CT, γ) η πρόσδεση της Ga στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR γίνεται μέσω άλλων πρωτεϊνών που επίσης συμμετέχουν στη μεταφορά ερεθίσματος. Το γεγονός ότι οι ενεργοποιημένοι μ-OR και δ-OR υποδοχείς αλληλεπιδρούν με διαφορετικές G πρωτεΐνες ενδεχομένως να παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση που παρατηρείται στην αλληλεπίδραση των Ga υπομονάδων με αυτούς.

Οι Gβy υπομονάδες είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση τελεστών (Hamm, 2001), στην ανάπτυξη της ανοχής στα οπιοειδή (Chakrabarti et al., 2001) και στην υπερ-ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (Rubenzik et al., 2001, Sunahara and Taussig, 2002), καθώς και σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες των θηλαστικών, όπως είναι η καταστολή της διέγερσης των νευρώνων, η αναστολή της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών, η δράση του ανοσοποιητικού, η φλεγμονή, και τέλος η μείωση της επίδρασης της μορφίνης που παρατηρείται σε φαινόμενα αναλγησίας (Smrcka, 2008). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής πιστοποιούν για πρώτη φορά ότι οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν απευθείας με τους οπιοειδείς υποδοχείς (μ-, δ-OR) μέσω του καρβοξυτελικού άκρου και της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς των υποδοχέων αυτών. Παράλληλα πειράματα του εργαστηρίου μας με τη χρήση ενδογενών Gβy υπομονάδων από μεμβράνες του ραβδωτού σώματος εγκεφάλου αρουραίου, αλλά και των Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> συμπλόκων εγκέφαλου ποντικού, επιβεβαίωσαν το παραπάνω αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν επίσης, ότι, όταν οι Gβγ υπομονάδες βρίσκονται σε σύμπλοκο με τις Ga υπομονάδες (ετεροτριμερής Gaby), η πρόσδεσή τους στα ενδοκυτταρικά τμήματα των οπιοειδών υποδογέων συνεγίζει να υφίσταται. Αυτό υποδηλώνει ότι, είτε η περιοχή αλληλεπίδρασης των Gβγ υπομονάδων με τα ενδοκυτταρικά αυτά τμήματα είναι ανεξάρτητη από την περιοχή με την οποία προσδένονται με τις Ga υπομονάδες, είτε ότι οι Gβγ υπομονάδες αποσυζεύγνυνται από το Gaβγ σύμπλοκο για να αλληλεπιδράσουν με τους οπιοειδείς υποδοχείς. Η δεύτερη περίπτωση μπορεί να εξηγήσει γιατί η Ga υπομονάδα στα πειράματά μας, σε αντίθεση με τις Gβγ υπομονάδες, δεν προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, όταν και οι δυο προέρχονται από το ετεροτριμερές Gaβy.

Απευθείας αλληλεπίδραση των Gβγ συμπλόκων με τους GPCRs είχε αναφερθεί αρχικά για τον υποδοχέα της ροδοψίνης, όπου η πρόσδεση των Gβγ προτείνεται ότι

παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του σήματος και στη ρύθμιση του υποδοχέα (Kelleher and Johnson, 1988). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε σε μελέτες ανασύστασης με λιποσώματα (reconstitution) ότι οι Gβγ υπομονάδες της τρανσντιουσίνης (G $\beta_1\gamma_1$  στα ραβδία), αναστέλλουν την φωσφορυλίωση που προκαλεί η κινάση της ροδοψίνης στον υποδοχέα ροδοψίνη. Παρόμοιες μελέτες που έγιναν στους M2 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς έδειξαν ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται επίσης στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά αυτών των υποδοχέων, αλλά η πρόσδεση εξαρτάται από την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και την αποσύνδεση του ετεροτριμερούς (Wu et al., 1998). Όσον αφορά στους οπιοειδείς υποδοχείς, μελέτες με την τεχνική plasmonwaveguide resonance (PWR) spectroscopy, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη για υποδοχείς που βρίσκονται ανασυσταμένοι σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες, έδειξαν ότι το απομονωμένο Gβy διμερές αλληλεπιδρά με τον δ-OR με μεγάλη συγγένεια (Alves et al., 2004). Στις ίδιες μελέτες φάνηκε επίσης ότι υπάρχει συνεργατικότητα μεταξύ των Ga και Gβγ υπομονάδων στην αλληλεπίδραση με τον δ-OR, διότι η συγγένεια πρόσδεσης των απομονωμένων Ga ή Gβγ υπομονάδων για τους υποδοχείς αυξάνεται όταν αυτές συνεπωάζονται, ενώ παρατηρήθηκε ότι στη συνεπώαση η συγγένεια των Ga για τον δ-OR αυξάνεται περισσότερο από αυτήν των Gβγ υπομονάδων.

Γνωρίζοντας ότι οι RGS πρωτεΐνες αποτελούν μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση των GPCRs, θελήσαμε να ελέγξουμε τη δυνατότητα εμπλοκής αυτών των πρωτεϊνών στην οπιοειδή δράση. Μελέτες έχουν δείζει ότι η RGS4, η οποία εκφράζεται εκτενέστατα στο νευρικό σύστημα, ενδεχομένως να ρυθμίζει τη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων (Hepler et al., 1997, Gold et al., 2003, Garnier et al., 2003). Πειραματικά δεδομένα έχουν δείζει ότι η RGS4 αναστέλλει τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης παρουσία του αγωνιστή [Leu]-enkephalin, σε μεμβράνες κυττάρων NG-108 (Hepler et al., 1997). Άλλες μελέτες έδειζαν επίσης ότι το mRNA της RGS4 αυξορυθμίζεται παρουσία αγωνιστών και η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης δρα ως ένας πιθανός μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης, που συμβάλλει στην απευαισθητοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων και στην ανοχή και εξάρτηση σε διάφορες ναρκωτικές ουσίες (Nakagawa et al., 2001, Gold et al., 2003, Garnier et al., 2003). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν για πρώτη φορά, τόσο in vitro όσο και σε ζωντανά κύτταρα, ότι η RGS4 αλληλεπιδρά απευθείας με τους μ- και δ-ORs, μέσω της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού τους άκρου. Η αλληλεπίδραση αυτή της RGS4 με τους οπιοειδείς υποδοχείς είναι ανεξάρτητη από την επίδραση οπιοειδών αγωνιστών. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι το ζεύγος υποδοχέα-RGS4 σχηματίζεται ιδιοσύστατα, δηλαδή απουσία ενεργοποίησης των υποδοχέων. Η δημιουργία ζευγών RGS4-οπιοειδών υποδοχέων (μ-OR, δ-OR) ενδεχομένως να επιτρέπει στην RGS4 πρωτεΐνη να στρατολογεί τις ενεργοποιημένες G πρωτεΐνες για να ρυθμίζει άμεσα τη δράση αυτών στους διάφορους τελεστές.

Η ανακάλυψη της αλληλεπίδρασης της RGS4 με συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές περιοχές των μ-OR και δ-OR έρχεται σε συμφωνία με μελέτες με τον M1-mAChR, όπου δείχθηκε ότι η RGS2 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά απευθείας με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του υποδοχέα αυτού (Bernstein et al., 2004). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της υδρόλυσης του PIP<sub>2</sub> που προκαλείται από την ενεργοποίηση του M1-mAChR υποδοχέα μέσω των Gq πρωτεϊνών. Άλλες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η RGS2 αλληλεπιδρά με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του α<sub>1A</sub>-AR και ρυθμίζει μέσω των Gq πρωτεϊνών τη σηματοδότηση του συγκεκριμένου υποδογέα (Hague et al., 2005). Μελέτες έδειξαν επίσης ότι η RGS4 πρωτεΐνη μεταναστεύει προς την πλασματική μεμβράνη των HEK293 κυττάρων λόγω της παρουσίας του M2-mAChR, ενώ η RGS2 μετατοπίζεται στη μεμβράνη λόγω της παρουσίας του AT<sub>1A</sub>-R και του β2-AR (Roy et al., 2003). Η ίδια μελέτη, όμως, δεν αποδεικνύει το σχηματισμό λειτουργικών συμπλόκων μεταξύ αυτών των RGS πρωτεϊνών με τους αντίστοιχους υποδοχείς, καθώς επίσης δεν αποδεικνύει κατά πόσο η ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί σε στρατολόγηση των RGS πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Πρόσφατες μελέτες προσδιόρισαν ότι η ενδογενής RGS4 συνανοσοκατακρημνίζεται με τον μεταβοτροπικό-γλουταμεργικό υποδογέα (mGluR5) από το ραβδωτό σώμα εγκεφάλου αρουραίου, απουσία αγωνιστή. Η αλληλεπίδραση αυτή της RGS4 με τον mGluR5 οδηγεί στη ρύθμιση της σηματοδότησης του mGluR5 υποδοχέα μετά από επίδραση αμφεταμίνης στους αρουραίους (Schwendt and McGinty, 2007). Πειράματα της ομάδας του Garzon σε συναπτοσωμικές μεμβράνες της περιοχής PAG εγκεφάλου ποντικού έδειξαν ότι η RGS4 συνανοσοκατακρημνίζεται με τον μ-OR (Garzon et al., 2005β). Στις ίδιες μελέτες δείχθηκε επίσης ότι στιγμιαία χορήγηση

μορφίνης στα ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του σχηματιζόμενου συμπλόκου RGS4 – μ-OR, ενώ χρόνια χορήγηση μορφίνης οδηγούσε σε μείωση των επιπέδων του RGS4 – μ-OR, σε σύγκριση με τα παρατηρούμενα επίπεδα απουσία αγωνιστή (μορφίνη). Από την άλλη πλευρά, η GAIP στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη μόνο μετά από την ενεργοποίηση του D2-R (Jeanneteau et al., 2004β). Αυτή η διαφορική συμπεριφορά των RGS πρωτεϊνών ως προς το είδος της αλληλεπίδρασής τους με τους διάφορους GPCRs (παρουσία ή απουσία ενεργοποίησης των υποδοχέων) ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι η σύζευξη RGS – υποδοχέα επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι α) τα επίπεδα έκφρασης του εκάστοτε υποδοχέα στο κύτταρο β) η φύση και πληθώρα των RGS και G πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον γ) τα ζεύγη συμπλόκων που δημιουργούνται μεταξύ των τριών αυτών αλληλεπιδρωσών πρωτεϊνών (RGS, Ga, GPCRs) και τέλος δ) η κατάσταση ενεργοποίησης του υποδοχέα και των G πρωτεϊνών.

Με τα παραπάνω συνηγορούν μελέτες που δηλώνουν ότι η μετάδοση ενός σήματος από τους υποδοχείς της μεμβράνης δεν γίνεται μόνο μέσω της μετακίνησης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (π.χ. G πρωτεϊνών, από τους υποδοχείς στους τελεστές), αλλά επίσης μέσω της δημιουργίας σηματοδοτικών πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζονται στις ενδοκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων (Abramow-Newerly et al., 2006). Τα πρωτεϊνικά αυτά σύμπλοκα δημιουργούνται είτε λόγω της ενεργοποίησης των υποδοχέων είτε προϋπάρχουν (ιδιοσύστατα). Οι ενδοκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων μάλιστα, λειτουργούν ως «πλατφόρμες» για το σχηματισμό αυτών των πολύπρωτεϊνικών συμπλόκων. Επιπλέον, εικάζεται ότι μόρια-«κλειδιά» παίζουν το ρόλο ικριώματος για το σχηματισμό αυτών των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Με γνώμονα το γεγονός ότι τόσο η RGS4 όσο και οι Gβγ υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τις ενδοκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων, υποθέσαμε ότι κάθε μια από αυτές τις πρωτεΐνες ενδεχομένως να λειτουργεί ως ικρίωμα για τη δημιουργία σταθερών συμπλόκων μεταξύ των οπιοειδών υποδοχέων, της RSG4 και των Gβγ υπομονάδων. Πράγματι, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι υπάρχει ταυτόχρονη αλληλεπίδραση της RGS4 και των Gβγ υπομονάδων με το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, και ότι η αλληλεπίδραση αυτή διέπεται από τα εξής χαρακτηριστικά: 1) οι Gβγ υπομονάδες ανταγωνίζονται την RGS4 για την πρόσδεση στο μ-CT, 2) η πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων και της RGS4 στο μ-CT δεν είναι αμοιβαίως αποκλειόμενη και άρα γίνεται ενδεχομένως σε μερικώς αλληλοεπικαλυπτόμενα σημεία, 3) η πρόσδεση των Gβγ υπομονάδων στο μ-CT ισχυροποιείται από την παρουσία της RGS4 πρωτεΐνης. Δεδομένου του γεγονότος ότι υπάρχει πάντα μια ποσότητα της RGS4 που παραμένει προσδεδεμένη στο μ-CT ταυτόχρονα με τις Gβγ υπομονάδες, συμπεραίνουμε ότι είναι δυνατή η δημιουργία ενός ετεροτριμερούς συμπλόκου που αποτελείται από το μ-CT, την RGS4 πρωτεΐνη και τις Gβγ υπομονάδες *in vitro*. Η RGS4 παίζει συνεργατικό ρόλο στην πρόσδεση των Gβγ στο μ-CT, διότι ενισχύει την πρόσδεση αυτή και άρα λειτουργεί ως κομβικό μόριο για τη δημιουργία του συμπλόκου.

Μελέτες με ανασύσταση πρωτεϊνών σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες και μέτρηση της συγγένειας πρόσδεσης με μεθόδους φθορισμού, έδειξαν ότι οι Gβγ υπομονάδες προσδένονται στην RGS4 και πιθανόν την εκτοπίζουν από την απενεργοποιημένη Gqa (Dowal et al., 2001). Στις ίδιες μελέτες φάνηκε ότι η συγγένεια πρόσδεσης της RGS4 για την Gβγ είναι μικρότερη σε σχέση με αυτήν της Gqa, και αυτό ενδεχομένως εξηγεί τη μη ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ RGS4 και Gβγ σε ζωντανά κύτταρα στα πειράματα της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά η ασθενής αλληλεπίδραση της RGS4 με την Gβy στο κυτταρικό περιβάλλον ενδεχομένως να εξυπηρετεί στη συγκράτηση της RGS4 στο σηματοδοτικό σύμπλοκο που σχηματίζει με έναν GPCR, και πιθανώς στην τοποθέτηση της RGS4 σε κατάλληλο προσανατολισμό για την επαναπρόσδεσή της με την Gqa. Η μη ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ της RGS4 και των Gβγ υπομονάδων στα κύτταρα ΗΕΚ293 συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες συν-ανοσοκατακρήμνισης, οι οποίες έδειξαν ότι η RGS4 δεν αλληλεπιδρά με το διμερές Gβγ, σε αντίθεση με την RGS3 (Shi et al., 2001). Εντούτοις, τα in vitro αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ενδεχομένως να δημιουργείται ένα σύμπλοκο μεταξύ του μ-CT, της RGS4 πρωτεΐνης και των Gβγ υπομονάδων. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι RGS4 και Gβy, ενώ προσδένονται ταυτόχρονα στα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων και μοιράζονται μερικώς αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης, ενδεχομένως να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μικρή συγγένεια και να μην μπορεί να ανιχνευθεί η αλληλεπίδραση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόσαμε.

Μελέτες στους M2 και M3-mAChR υποδοχείς, έδειξαν επίσης ότι οι Gβγ υπομονάδες, εκτός του ότι σχηματίζουν ζεύγη με τους υποδοχείς αυτούς, βοηθούν στη δημιουργία πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων (Wu et al., 1998). Πράγματι, οι συγκεκριμένες μελέτες έδειξαν ότι οι Gβγ υπομονάδες, προσδενόμενες στην τρίτη θηλιά του M3mAChR υποδοχέα, παίζουν το ρόλο ικριώματος και στρατολογούν άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όπως τη GRK2 κινάση, που εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση και στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα. Ο ρόλος του σχηματιζόμενου πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου μεταξύ υποδοχέα – Gβy – GRK2 φαίνεται ότι είναι η υποκυτταρική μετατόπιση της GRK2 και η τοποθέτησή της κοντά στον ενεργοποιημένο υποδογέα. Οι μελέτες των Wu et al., 1998 έδειξαν επίσης ότι οι Gβγ υπομονάδες, λειτουργώντας ως πρωτεΐνες πρόσδεσης, μπορούν να σχηματίζουν μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης για τους υποδοχείς, η οποία χρησιμοποιείται για την έναρξη και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Πράγματι, βρέθηκε πρόσφατα από μελέτες του εργαστηρίου μας ότι οι STAT5A/B μεταγραφικοί παράγοντες, αλληλεπιδρούν με τις Ga και Gβy υπομονάδες και την Src και δημιουργούν ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο χρησιμοποιώντας ως πλατφόρμα το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR και δ-OR. Τα σύμπλοκα αυτά οδηγούν στη φωσφορυλίωση των STAT5 μεταγραφικών παραγόντων και στη γονιδιακή ρύθμιση (Mazarakou and Georgoussi, 2005, Georganta et al., 2010). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δηλώνουν ότι οι Gβγ υπομονάδες ή/και η RGS4 πρωτεΐνη, που είναι αγκυροβολημένες στις ενδοκυτταρικές περιοχές των οπιοειδών υποδοχέων, παίζουν το ρόλο ικριώματος και στρατολογούν νέα σηματοδοτικά μόρια στον υποδοχέα (π.χ. Src, STAT5), οδηγώντας σε νέα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία καταλήγουν ακόμα και στη μεταγραφή και στη ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

Παρόλο που έχουν περιγραφεί επιδράσεις υποδοχέων σε RGS πρωτεΐνες ανεξάρτητες της κατάστασης ενεργοποίησης, μελέτες σε άλλα κυτταρικά συστήματα έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση των RGS πρωτεϊνών με τις G πρωτεΐνες προάγεται από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς (Zeng et al., 1998, Xu et al., 1999). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η αποδοτικότητα και η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης των GPCRs με συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορεί να ρυθμίζεται από τις RGS πρωτεΐνες. Δηλαδή, οι RGS πρωτεΐνες αλληλεπιδρώντας επιλεκτικά με τους υποδοχείς, σχηματίζουν πρωτεϊνικά ικριώματα και τους οδηγούν σε εξειδίκευση της σηματοδότησης (Hollinger and Hepler, 2002, Abramow-Newerly et al., 2006)

Όπως προαναφέρθηκε, ο τρόπος με τον οποίο η Ga υπομονάδα αλληλεπιδρά με τους μ-OR και δ-OR είναι διαφορετικός. Η απουσία απευθείας αλληλεπίδρασης της Ga με το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR ενδεχομένως να αντισταθμίζεται από την παρουσία της RGS4 που δημιουργεί ένα πρωτεϊνικό ικρίωμα. Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση του δ-OR η Ga υπομονάδα αλληλεπιδρά με τα ενδοκυτταρικά τμήματα του υποδοχέα, οπότε η παρουσία της RGS4 στο τριμερές σύμπλοκο RGS4 – Ga – υποδοχέας ενδεχομένως ενισχύει αυτήν την αλληλεπίδραση. Επιπλέον, προκαταρκτικές μελέτες της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι ο μ-OR σε κατάσταση ηρεμίας δεν αλληλεπιδρά μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου με την RGS4. Η πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT προϋποθέτει την ενεργοποίηση του υποδοχέα και κατ'επέκταση και των G πρωτεϊνών. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση του μ-OR αυξάνει τον πληθυσμό των σχηματιζόμενων RGS4-GaGTP συμπλόκων σε ένα κύτταρο. Τα σύμπλοκα αυτά με τη σειρά τους ενισχύουν την πρόσδεση της RGS4 στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR, σε σχέση με την πρόσδεση της απλής RGS4, διότι το σύμπλοκο RGS4-GaGTP διαθέτει περισσότερες ή νέες επιφάνειες αλληλεπίδρασης.

Με γνώμονα τις παραπάνω παρατηρήσεις, προσδιορίσαμε κατά πόσο η RGS4 στρατολογεί τις συγκεκριμένες Ga στο καρβοζυτελικό άκρο του μ-OR, με *in vitro* πειράματα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι Gia και Gta (στη μεταβατική διαμόρφωση) προσδένονται στο μ-CT παρουσία της RGS4 και δημιουργούν ένα ισχυρό ετεροτριμερές σύμπλοκο με αυτό το τμήμα του μ-OR (μ-CT – RGS4 – Gi/ta, εικόνα 47). Επίσης, παρατηρήθηκε μια αύξηση της πρόσδεσης της RGS4 στο μ-CT παρουσία της GaGDP·AlF4<sup>-1</sup> και αυτό συμφωνεί με το ότι η πρόσδεση της RGS4 στο μ-CT εξαρτάται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα και των G πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες που έχουν δείξει ότι: 1) η RGS4 αλληλεπιδρά απευθείας με μεγάλη συγγένεια με τη διαμόρφωση που έχει η Ga υπομονάδα στη μεταβατική της κατάσταση (Berman et al., 1996α) και ότι 2) η RGS4 προσδένεται εξειδικευμένα με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες όπως είναι οι Gia<sub>1-2</sub>, Goa και Gqa (Druey et al., 1998).



Σχήμα 47. Η RGS4 δημιουργεί in vitro ετεροτριμερή σύμπλοκα με την Ga υπομονάδα και τον μ-OR. Η RGS4 πρωτεΐνη προσδένεται στο μ-CT και λειτουργεί ως ικρίωμα για την πρόσδεση των Gia, Gta. Η αλληλεπίδραση αυτή παρατηρείται όταν οι Gia, Gta βρίσκονται στη μεταβατική κατάσταση ενεργοποίησης, η οποία διαμορφώνεται παρουσία του AMF παράγοντα.

Στην περίπτωση του δ-OR στα κύτταρα HEK293, δεν παρατηρούμε αυξημένη αλληλεπίδραση της RGS4 με τον υποδοχέα παρουσία του παράγοντα AMF, και αυτό οφείλεται ίσως στην ικανότητα της Ga να αλληλεπιδρά με το δ-OR σε οποιαδήποτε διαμόρφωση αυτή βρίσκεται. Επιπλέον, μια πιθανή εξήγηση είναι η ιδιοσύστατη ενεργότητα που διαθέτει ο δ-OR, η οποία και προάγει την αλληλεπίδρασή του με την RGS4.

Μελέτες των Bernstein et al. έδειξαν ότι η RGS2 προσδένεται στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του M1-mAChR και δημιουργεί επίσης σταθερά ετεροτριμερή σύμπλοκα μεταξύ του M1 υποδοχέα και της Gqa, η οποία είναι ενεργοποιημένη με τον παράγοντα AMF (Bernstein et al., 2004). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η πρόσδεση της RGS4 σε έναν GPCR (που συζεύγνυται με τις Gqa), οδηγεί στη δημιουργία σταθερών συμπλόκων μεταξύ της RGS4, του υποδοχέα, της Gqa και της καλμοδουλίνης με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της σηματοδότησης, μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται στα ιόντα Ca<sup>+2</sup> και στην ανταγωνιστική πρόσδεση της PIP<sub>3</sub> στην RGS4 (αρνητική ανάδραση) (Popov et al., 2000, Sierra et al., 2000).

Γνωρίζοντας ότι *in vitro* σχηματίζεται ένα τριμερές σύμπλοκο μεταξύ των RGS4 – Ga – μ-CT, θελήσαμε να διευκρινίσουμε αν η RGS4 είναι αυτή που οδηγεί τον υποδοχέα να επιλέξει με ποια Ga πρωτεΐνη θα αλληλεπιδράσει, μετά την ενεργοποίηση ή όχι των

μ-, δ-ORs, σε κύτταρα HEK293 που εκφράζουν τους υποδοχείς αυτούς. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η RGS4 δημιουργεί πράγματι ετεροτριμερή σύμπλοκα με επιλεγμένες G πρωτεΐνες, όπως είναι οι Gia1.3, Gia2 και Goa, μόνο μετά από ενεργοποίηση του μ-OR. Μελέτες σε κύτταρα SHSY5Y, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι διαφόρων υποτύπων των Ga υπομονάδων, έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του μ-OR έχει ως αποτέλεσμα την εξειδικευμένη σύζευξη του υποδοχέα και την ενεργοποίηση συγκεκριμένα των Gi<sub>3</sub> και Go υπομονάδων, με μεγαλύτερη συγγένεια για τις Go. Στις ίδιες μελέτες, η ενεργοποίηση του δ-OR οδηγεί σε σύζευξη και ενεργοποίηση κατά προτίμηση των  $Gi_{1,2}$  και Go και λιγότερο των  $Gi_3$  (Carter and Medzihradsky, 1993, Connor and Christie, 1999). Άλλες μελέτες στα ίδια κύτταρα έδειξαν ότι η σηματοδότηση του δ-OR, που οδηγεί στην αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, αναστέλλεται από αντισώματα έναντι των Gi<sub>1/2</sub>, Go και Gi<sub>3</sub> υπομονάδων, ενώ η σηματοδότηση του μ-OR αναστέλλεται κυρίως από αντισώματα έναντι της Go, αποτελέσματα που δηλώνουν την επιλεκτική σύζευξη των οπιοειδών υποδοχέων με συγκεκριμένες Ga πρωτεΐνες (Laugwitz et al., 1993). Παρόλα αυτά, οι συγκεκριμένες μελέτες δεν αποδεικνύουν ότι ενδεχομένως, ορισμένες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι υποδογείς, καθορίζουν την εξειδίκευση σύζευξης των Ga υπομονάδων με τους υποδοχείς. Τα κύτταρα SH-SY5Y που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω μελέτες εκφράζουν μεγάλες ποσότητες ενδογενούς RGS4, οπότε μπορεί να υποθέσει κανείς λαμβάνοντας υπόψη και τα δικά μας αποτελέσματα, ότι τελικά αυτή η πρωτεΐνη καθορίζει την εξειδίκευση πρόσδεσης των οπιοειδών υποδογέων για τις συγκεκριμένες Ga πρωτεΐνες, μέσω του σχηματισμού πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Παλιότερες μελέτες είχαν δώσει ενδείξεις για το γεγονός ότι ο δ-OR έχει διαφορετικό προφίλ αλληλεπίδρασης με τις G πρωτεΐνες, ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησής του. Πειράματα ανοσοσυγκατακρήμνισης υποδοχέων–G πρωτεϊνών έδειξαν ότι ο διαλυτοποιημένος δ-OR αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες Gia<sub>1</sub>, Gia<sub>3</sub>, Goa και Gβ<sub>1,2</sub> στην ανενεργή κατάσταση, ενώ αλληλεπιδρά με τις Gia<sub>2</sub>, Gia<sub>3</sub> και Gβ<sub>1,2</sub> παρουσία αγωνιστή DPDPE (Law and Reisine, 1997). Αυτές όμως οι μελέτες δεν ξεκαθαρίζουν με ποιες ακριβώς Ga υπομονάδες αλληλεπιδρά ο δ-OR, όταν βρίσκεται στην ενεργή ή μη ενεργή διαμόρφωση, και υποδηλώνουν ότι η εξειδίκευση στη σηματοδότηση του δ-OR δεν εξαρτάται μόνο από αυτήν την αλληλεπίδραση. Στην περίπτωση του δ-OR στην παρούσα

μελέτη, διαφαίνεται ένα διαφορετικό προφίλ επιλεκτικότητας στο σχηματισμό των RGS4-Ga συμπλόκων. Στην κατάσταση ηρεμίας του υποδοχέα, η RGS4 αλληλεπιδρά με την Gia<sub>1.3</sub> και την Goa, όχι όμως με την Gia<sub>2</sub>. Η DSLET-επαγόμενη ενεργοποίηση του δ-OR προάγει την αλληλεπίδραση της RGS4 με την Gia2, ενώ ελαττώνει την αλληλεπίδραση της με την Gia1.3. Η κατεργασία με τον παράγοντα AMF, σε αντίθεση με τα παραπάνω, οδηγεί την RGS4 να αλληλεπιδράσει με όλες τις Ga υπομονάδες, ανεξάρτητα υποτύπου (Gia1.3, Gia2 και Goa). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η RGS4 ρυθμίζει δυναμικά την αλληλεπίδραση του δ-OR με τις συγκεκριμένες Ga πρωτεΐνες, ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησης του υποδογέα. Το γεγονός ότι στην περίπτωση του δ-OR παρουσιάζεται ένα διαφορετικό προφίλ επιλεκτικότητας για τα διάφορα σύμπλοκα RGS4-Ga που σχηματίζονται στα HEK293 κύτταρα, σε σχέση με τον μ-OR, μπορεί να οφείλεται στο ότι α) η ιδιοσύστατη ενεργότητα (constitutive activity) του δ-OR επιτρέπει σε ένα συγκεκριμένο υποπληθυσμό Ga υπομονάδων να αλληλεπιδράσει με την RGS4 απουσία αγωνιστή, β) ο DSLET-ενεργοποιημένος δ-OR προάγει το σχηματισμό εξειδικευμένων ζευγών μεταξύ της RGS4 και των Ga υπομονάδων, διαφορετικών από αυτά που επάγονται από τον παράγοντα AMF, ο οποίος θεωρείται ένας γενικός ενεργοποιητής των G πρωτεϊνών γ) ο δ-OR εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο πρόσδεσης των συμπλόκων RGS4-Ga στο καρβοξυτελικό του άκρο σε σχέση με τον μ-OR, διαθέτοντας επιπλέον θέσεις πρόσδεσης.

Με τη χρήση μεμβρανικών παρασκευασμάτων που εκφράζουν χιμαιρικές πρωτεΐνες μεταξύ του α2-AR υποδοχέα και των G πρωτεϊνών, μελέτες έδειξαν ότι η RGS4 ενισχύει επιλεκτικά την ενεργότητα GTPάσης των Goa<sub>1</sub> και Gia<sub>2</sub> υπομονάδων και όχι των Gia<sub>1</sub> και Gia<sub>3</sub>, μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα (Cavalli et al., 2000). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις των RSG2 και RGS4 με τις G πρωτεΐνες επάγονται από τους υποδοχείς, καθώς πειραματικά δεδομένα σε κύτταρα HEK293 έδειξαν ότι απλή έκφραση των GPCR υποδοχέων AT<sub>1A</sub>-R, β2-AR και M2-mAChR και των Gq, Gs και Gi με τις οποίες αυτοί αλληλεπιδρούν αντίστοιχα, ήταν αρκετή για να στρατολογήσει κατά περίπτωση τις RGS2 και RGS4 στη μεμβράνη κοντά στους υποδοχείς (Roy et al., 2003). Το ερώτημα, λοιπόν, που τίθεται είναι πώς οι RGS, οι Ga πρωτεΐνες, καθώς επίσης και οι υποδοχείς, αποφασίζουν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους επιλεκτικά σε διάφορα κυτταρικά συστήματα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι: α)

οι οπιοειδείς υποδοχείς στρατολογούν ειδικά την RGS4 στη μεμβράνη του κυττάρου, β) η RGS4 οδηγεί τους οπιοειδείς υποδοχείς να επιλέξουν με ποιες Ga υπομονάδες θa συζευχθούν. Γίνεται, λοιπόν, σαφές ότι η RGS4 παίζει ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων, διότι συμβάλλει στην εξειδίκευση σύζευξης των υποδοχέων αυτών με τις G πρωτεΐνες, κάτι που ήταν άγνωστο μέχρι σήμερα για τη λειτουργία αυτών των υποδοχέων.

Οι Neitzel and Hepler, βασιζόμενοι στις αλληλεπιδράσεις των RGS πρωτεϊνών με τους GPCRs και τις Ga πρωτεΐνες, έχουν προτείνει ένα μοντέλο στο οποίο οι GPCRs λειτουργούν ως πλατφόρμες σηματοδότησης που στρατολογούν διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Neitzel and Hepler, 2006). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι RGS πρωτεΐνες στρατολογούνται εξειδικευμένα από τους υποδοχείς και δημιουργούν λειτουργικά σύμπλοκα ώστε να ρυθμίζουν τη δράση των G πρωτεϊνών ως εξής: η RGS πρωτεΐνη μπορεί αρχικά να είναι προσδεδεμένη στην πλασματική μεμβράνη (πιθανώς ιδιοσύστατα) κοντά στους υποδοχείς-στόχους και τις G πρωτεΐνες. Παρουσία ενός υποδοχέα με τον οποίο η RGS πρωτεΐνη επιλέγει να αλληλεπιδράσει, η RGS προσδένεται στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά ή το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα, απευθείας ή μέσω μιας βοηθητικής πρωτεΐνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις η RGS είναι προσδεδεμένη ιδιοσύστατα στον ανενεργό υποδοχέα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η RGS προσδένεται στον υποδοχέα μετά από την ενεργοποίησή του. Μετά την ενεργοποίηση του τελεστή από την G πρωτεΐνη, η προσδεδεμένη στον υποδοχέα RGS πρωτεΐνη είναι ήδη σε θέση να δράσει στη GaGTP, να επιταχύνει την υδρόλυση του GTP και να τερματίσει τη σηματοδότηση των Ga και Gβy υπομονάδων. Με αυτόν τον τρόπο οι υποδοχείς επιλέγουν συγκεκριμένες RGS πρωτεΐνες και τις στρατολογούν στην πλασματική μεμβράνη. Εκεί οι υποδοχείς, αλληλεπιδρώντας με τις RGS πρωτεΐνες, προσανατολίζουν την GAP ενεργότητα των RGS πρωτεϊνών προς συγκεκριμένες Ga πρωτεΐνες, όπως επίσης μεγιστοποιούν τη δράση των RGS πρωτεϊνών προς τις επιλεγμένες Ga υπομονάδες, λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης. Το συγκεκριμένο μοντέλο προτείνει ότι η εξειδίκευση στη ρύθμιση της σηματοδότησης των GPCRs από τις RGS στηρίζεται στην αλληλεπίδραση υποδοχέα-RGS πρωτεΐνης και δεν συντελείται μόνο στο επίπεδο της αλληλεπίδρασης RGS-Ga, όπως είχε αρχικά θεωρηθεί.

Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα, προτείνουμε ένα δυνητικό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η RGS4 ρυθμίζει την επιλεκτικότητα του μ-OR και δ-OR για τις G πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 48, στην κατάσταση ηρεμίας ο μ-OR αλληλεπιδρά με την RGS4 πρωτεΐνη μέσω της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού άκρου, ενώ οι διάφοροι τύποι των Ga υπομονάδων (Gia<sub>1,3</sub>, Gia<sub>2</sub> και Goa) δεν αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο. Ενεργοποίηση του μ-OR προάγει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ της RGS4, του μ-OR και των Gia<sub>1,3</sub>, Gia<sub>2</sub> και Goa υπομονάδων, το οποίο χρησιμοποιεί ως «πλατφόρμα» το καρβοξυτελικό άκρο, αλλά ενδεχομένως και την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά του υποδοχέα. Από τα *in vitro* πειράματά μας υποδηλώνεται ότι το καρβοξυτελικό άκρο χρησιμοποιείται ως θέση πρόσδεσης κυρίως μετά από την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η RGS4 λειτουργεί ως πρωτεΐνη-ικρίωμα για το σχηματισμό του ετεριτριμερούς συμπλόκου.



Σχήμα 48. Σχηματισμός ετεροτριμερών συμπλόκων RGS4 – Ga – οπιοειδών υποδοχέων. (Α) Στην κατάσταση ηρεμίας ο μ-OR αλληλεπιδρά με την RGS4 πρωτεΐνη στην τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά και το καρβοξυτελικό άκρο. Μετά την ενεργοποίηση του μ-OR δημιουργούνται ετεροτριμερή σύμπλοκα μεταξύ του υποδοχέα, της RGS4 και των Gia<sub>1,3</sub>, Gia<sub>2</sub> και Goa. (B) Διαφορική αλληλεπίδραση του δ-OR με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες. Στην κατάσταση ηρεμίας ο δ-OR αλληλεπιδρά με τα ζεύγη RGS4-Gia<sub>1,3</sub> και RGS4-Goa. Παρουσία αγωνιστή ο δ-OR αλληλεπιδρά με το ζεύγος RGS4-Gia<sub>2</sub> και με το ζεύγος RGS4-Goa.

Στην περίπτωση του δ-OR, ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με την RGS4 απουσία αγωνιστή, μέσω της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού του άκρου, όπως επίσης και με τις Gia<sub>1.3</sub> και Goa, λόγω ιδιοσύστατης ενεργότητας. Η ενεργοποίηση του δ-OR προάγει τη δημιουργία νέων ζευγών RGS4-Gia2, που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα, ενώ οδηγεί σε αποσύζευξη των Gia1.3 υπομονάδων από το σύμπλοκο μεταξύ του δ-OR και της RGS4. Η συγγένεια πρόσδεσης των ετεροτριμερών συμπλόκων που σχηματίζονται μεταξύ του δ-OR, της RGS4 και της Goa δεν μεταβάλλεται. Τα αποτελέσματά μας δηλώνουν ότι η πρόσδεση της RGS4 στους μ-OR και δ-OR οδηγεί τους υποδοχείς να συζευχθούν επιλεκτικά με ορισμένες μόνο Ga υπομονάδες και όχι με άλλες, ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησης των υποδοχέων. Αυτός ο μηχανισμός δράσης της RGS4 για τους GPCRs δεν έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες και καθιερώνει την RGS4 ως ένα βασικό ρυθμιστή της σηματοδότησης των υποδοχέων, ο οποίος εμπλέκεται στη μεσεπιφάνεια (interface) μεταξύ ενός GPCR και μιας ή πολλών G πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν την RGS4 πρωτεΐνη ένα νέο φαρμακολογικό στόχο, διότι είναι δυνατόν να κατασκευαστούν ενώσεις που να παρεμποδίζουν τη δράση της RGS4 στοχεύοντας στη δέσμευση της RGS περιοχής με την οποία προσδένεται στις Ga υπομονάδες, αλλά και στη διάρρηξη της αλληλεπίδρασης της RGS4 με τον υποδοχέα στο σηματοδοτικό σύμπλοκο.

Με γνώμονα τα παραπάνω επιδιώξαμε να προσδιορίσουμε αν οι δυο εμπλεκόμενες πρωτεΐνες του ρυθμιστικού συμπλόκου (Ga, RGS4) μοιράζονται τις ίδιες θέσεις αλληλεπίδρασης στα καρβοξυτελικά άκρα των οπιοειδών υποδοχέων. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας με τη χρήση οπιοειδών πεπτιδίων έχουν δείξει ότι ένα τμήμα της συντηρημένης περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου των μ- και δ-OR που βρίσκεται κοντά στην έβδομη διαμεμβρανική περιοχή (DENFKRCFRQLC), είναι υπεύθυνο για τη σύζευξη υποδοχέα-G πρωτεΐνης και την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών (Merkouris et al., 1996, Georgoussi et al., 1997). Το ερώτημα που τίθεται είναι εάν η ίδια περιοχή είναι σημείο πρόσδεσης και για την RGS4. Τα αποτελέσματά μας από τα πειράματα με τη χρήση ελλειμματικών τμημάτων του μ-CT αποδεικνύουν ότι απαλοιφή της περιοχής κοντά στη μεμβράνη, που περιλαμβάνει 20 συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα (Ser329-Ser355), καταργεί την πρόσδεση της RGS4. Πιο στοχευμένες μελέτες έδειξαν ότι η περιοχή 12 συντηρημένων αμινοξέων DENFKRCFRXXC στο καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR που σχηματίζει την έλικα VIII, προσδένει απευθείας την RGS4, όπως φάνηκε σε *in vitro* πειράματα κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Σημειακές μεταλλαγές ή ελλείψεις μικρού αριθμού αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου του μ-OR έδειξαν ότι τα μοτίβα NPXXY και YXXL, που περιλαμβάνονται στο καρβοξυτελικό άκρο και βρίσκονται ακριβώς πριν την DENFKRCFRXXC αλληλουχία, δεν αποτελούν σημεία αγκυροβόλησης της RGS4 στον μ-OR. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν επίσης ότι το αρχικό συντηρημένο τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου του μ-OR (Ser329-Ser355) είναι η θέση πρόσδεσης του συμπλόκου της RGS4 με την Gα και συμβάλλει στο σχηματισμό του ετεροτριμερούς συμπλόκου, που αποτελείται από αυτό το τμήμα του μ-CT, την RGS4 πρωτεΐνη και την υπομονάδα Gα.

Πρόσφατες μελέτες που έγιναν στον υποδοχέα 2 της χολοκυστοκινίνης CCK2R, έδειξαν ότι η RGS2 αλληλεπιδρά με το καρβοζυτελικό άκρο του υποδοχέα αυτού (Langer et al., 2009). Πράγματι, πειράματα πρόσδεσης αλλά και λειτουργικά πειράματα μέτρησης της παραγωγής της φωσφορικής ινοσιτόλης (IP) έδειξαν ότι μια περιοχή 11 αμινοξέων του καρβοζυτελικού άκρου, είναι υπεύθυνη για την λειτουργική αλληλεπίδραση του CCK2R με την RGS2. Βρέθηκε επίσης ότι δυο αμινοξικά κατάλοιπα, μια Ser και μια Thr, μέσα σε αυτήν την περιοχή είναι σημαντικά μέσω της φωσφορυλίωσής τους για την αλληλεπίδραση με την RGS2 και για την ικανότητα της RGS2 να ρυθμίζει την παραγωγή της IP που επάγεται από τον υποδοχέα CCK2-R. Παρόλα αυτά, αντιστοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του καρβοζυτελικού άκρου του δ-OR και του μ-OR με αυτού του CCK2R δεν έδειξε κάποια ομολογία μεταξύ της περιοχής των 12 αμινοξέων, όπου προσδένεται η RGS4, με την αντίστοιχη περιοχή του CCK2R όπου προσδένεται η RGS2.

Αντίστοιχα πειράματα χαρτογράφησης της πρόσδεσης της RGS4 στον δ-OR έδειξαν ότι η RGS4 χρειάζεται το τμήμα Ser311-Pro336 του καρβοξυτελικού άκρου του δ-OR για να προσδεθεί. Στην περίπτωση του δ-OR, η πρόσδεση του ετεροτριμερούς συμπλόκου RGS4 – Ga – δ-CT γίνεται επίσης και στο μη συντηρημένο τμήμα του δ-OR, το ΔN26-δ-CT, που περιλαμβάνεται μεταξύ της Cys337 και της Ala372. Αυτό αποδεικνύει ότι ο δ-OR διαθέτει μια επιπλέον περιοχή (Cys337-Ala372) στο καρβοξυτελικό του άκρο, για τη δημιουργία συμπλόκου RGS4-Ga-δ-CT και επιβεβαιώνει για άλλη μια φορά ότι η πρόσδεση των Ga στον δ-OR γίνεται σε διαφορετικές περιοχές από αυτές του μ-OR. Σύγκριση του καρβοζυτελικού άκρου του δ-OR με αυτό του CCK2 υποδοχέα, δείχνει ότι στο τμήμα Cys337-Ala372 του δ-OR υπάρχει μια αντίστοιχη περιοχή που παρουσιάζει έναν βαθμό ομοιότητας με την περιοχή των 11 αμινοξέων του CCK2R όπου προσδένεται η RGS2, και αυτό υποδηλώνει ότι σε αυτήν την περιοχή του δ-CT ενδεχομένως προσδένεται το σύμπλοκο RGS4-Ga (Langer et al., 2009, Πίνακας 26). Τα αποτελέσματα στην περίπτωση του δ-OR δηλώνουν επίσης ότι η αλληλεπίδραση της RGS4 με την ενεργή Ga, δημιουργεί ένα πρωτεϊνικό διμερές σύμπλοκο, το οποίο διαθέτει νέες θέσεις αλληλεπίδρασης σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται για τις μονομερείς RGS4 ή Ga. Αυτός ο σχηματισμός του διμερούς συμπλόκου επιτρέπει στις RGS4 και Ga να προσδένονται στο μη συντηρημένο τμήμα του καρβοζυτελικού άκρου του δ-OR, και ενισχύει την υπόθεση για την πολυπλοκότητα του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της RGS4 και των ενεργών ή μη Ga υπομονάδων σε ένα κυτταρικό περιβάλλον μετά από την επίδραση οπιοειδών αναλόγων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η στρατολόγηση νέων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ή συμπλόκων στο καρβοξυτελικό άκρο των οπιοειδών υποδογέων γίνεται σε συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουγίες των υποδογέων. Τα υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με την RGS4 αμινοξικά κατάλοιπα βρίσκονται στη συντηρημένη περιογή που σχηματίζει την τέταρτη ενδοκυτταρική θηλιά **DENFKRCFRQLC** yia tov  $\delta$ -OR kai **DENFKRCFREFC** yia tov  $\mu$ -OR. H περιοχή αυτή περιλαμβάνει 2 αρνητικά φορτισμένα (1D, 1E) και 3 θετικά φορτισμένα αμινοξέα (2R, 1K) στην περίπτωση του δ-OR, ενώ ο μ-OR διαθέτει τα ίδια θετικά φορτισμένα αμινοξέα και ένα παραπάνω αρνητικό (1D, 2E). Τα αμινοξέα αυτής της περιοχής σχηματίζουν μια αμφιπαθική α έλικα που τοποθετείται παράλληλα με την κυτταρική μεμβράνη μέχρι το αμινοξικό κατάλοιπο της κυστεΐνης, το οποίο παλμιτυλιώνεται και αγκυροβολεί στην κυτταρική μεμβράνη (Palczewski et al., 2000). Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι ο ρόλος του τμήματος των καρβοξυτελικών άκρων που δεν περιλαμβάνει την συντηρημένη περιοχή είναι εξίσου σημαντικός, όπως διαπιστώθηκε με πειράματα που αποδεικνύουν ότι στην περίπτωση του δ-OR συμμετέγουν επιπλέον αλληλουχίες για την πρόσδεση του RGS4-Ga συμπλόκου σε αυτόν τον υποδογέα. Συμπερασματικά, σε αυτό το μη συντηρημένο τμήμα των καρβοξυτελικών άκρων ενδεχομένως να οφείλεται η διαφορική σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων προς τους τελεστές.

## 

Πίνακας 26. Αντιστοίχιση των καρβοξυτελικών άκρων των υποδοχέων δ-OR και CCK2R. Σημειώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι ταυτόσημα (\*), αυτά που είναι συντηρημένα (:) και τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι ημι-συντηρημένα (.). Με κίτρινο σημειώνεται η περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου του CCK2R (CCK2R-CT), όπου προσδένεται η RGS2, και η αντίστοιχη περιοχή του δ-CT. Η αντιστοίχιση των αμινοξικών καταλοίπων έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL W.

Από την πλευρά της RGS4, το αμινοτελικό της άκρο αποτελείται από 57 αμινοξικά κατάλοιπα και περιλαμβάνει μια αμφιπαθική α έλικα (33 πρώτα αμινοξέα) και δυο σημεία παλμιτυλίωσης (Πίνακας 27) (Srinivasa et al., 1998, Bernstein et al., 2000). Μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην στόχευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη και στη δράση της στην αναστολή της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών (Srinivasa et al., 1998, Chatterjee and Fisher, 2000, Bernstein et al., 2000, Xie and Palmer, 2005, Bansal et al., 2007). Με την απαλοιφή του αμινοτελικού άκρου της RGS4 (ΔNRGS4), τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η RGS4 δεν αλληλεπιδρά με τους οπιοειδείς υποδοχείς. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αμινοτελική περιοχή της RGS4 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με τους μ-OR και δ-OR. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτά άλλες μελέτες έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο της RGS2 ευθύνεται επίσης για την αλληλεπίδραση αυτής με την τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά των M1-mAChR και  $\alpha_{1A}$ -AR (Bernstein et al., 2004; Hague et al., 2005). Μεταλλάξεις στο αμινοτελικό άκρο των RGS4 και RGS16 πρωτεϊνών τις αποτρέπουν να προσδεθούν στην κυτταρική μεμβράνη και μεταβάλλουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (Zeng et al., 1998, Chatterjee and Fisher, 2000).

NH <sub>2</sub> RGS4	1- <mark>MC</mark> KGLAGLPAS <mark>C</mark> LRSAKDMKHRLGFLLQKSDSCEHNSSHNKK DKVVICQRVSQEEVK-57
4Box	58-KWAESLENLISHECGLAAFKAFLKSEYSEENIDFWISCEEYK KIKSPSKLSPKAKKIYNEFISVQATKEVNLDSCTREETSRNMLEPT ITCFDEAQKKIFNLMEKDSYRRFLKSRFYLDL-205

Πίνακας 27. Αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου και της περιοχής Box της RGS4. Με κίτρινο σημειώνεται η περιοχή του αμινοτελικού άκρου, η οποία θεωρείται ότι σχηματίζει την αμφιπαθική α έλικα. Με κόκκινο σημειώνονται οι κυστεΐνες στις θέσεις 2 και 12 που θεωρούνται ότι παλμιτυλιώνονται.

Η συντηρημένη περιοχή Box των RGS πρωτεϊνών, όπως προαναφέρθηκε, είναι η περιοχή με την οποία οι RGS πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις Ga υπομονάδες (Πίνακας 27) (Tesmer et al., 1997). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι αμινοξικές αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της 4Box περιοχής στην RGS4 είναι απαραίτητες για την δραστικότητα της GAP ενεργότητας έναντι της Gia υπομονάδας στη σηματοδότηση των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων (Popov et al., 1997). Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι, εκτός από την GAP δράση, το 4Box περιέχει μέσα στην αμινοξική του αλληλουχία μια περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) ικανή να ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό και πιθανόν και τη δράση ολόκληρης της RGS4 (Chatterjee and Fisher, 2000).

Τα πειράματά μας με την ανασυνδιασμένη RGS περιοχή της RGS4 (4Box), έδειξαν ότι αυτό το τμήμα της RGS4 δεν προσδένεται στο μ-CT, επιβεβαιώνοντας τη σημασία των αμινο- και καρβοξυ- τελικών περιοχών της RGS4 για τις αλληλεπιδράσεις με τους μ-OR και δ-OR. Παρόλα αυτά, όταν η Ga βρίσκεται στη μεταβατική διαμόρφωση λόγω του AMF παράγοντα (Σχήμα 9, Εισαγωγή), τότε το ζεύγος 4Box – GaGDP·AlF4<sup>-1</sup> προσδένεται στο μ-CT, πιθανώς λόγω σχηματισμού νέων επιφανειών αλληλεπίδρασης του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν για μια ακόμη φορά την πολυπλοκότητα της σύζευξης των Ga πρωτεϊνών, της RGS4 και του συμπλόκου που αυτές δημιουργούν μεταξύ τους. Επιπλέον, δεικνύουν ότι οι μεσεπιφάνειες επαφής μεταξύ υποδοχέων, G πρωτεϊνών και RGS εξαρτώνται από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα α) το είδος του υποδοχέα και την κατάσταση ενεργοποίησής του, β) το είδος των G πρωτεϊνών και την κατάσταση στην οποία αυτές βρίσκονται (ενεργή, ανενεργή, μεταβατική) και τέλος γ) την πολυπλοκότητα των πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζονται μεταξύ των υποψήφιων πρωτεϊνών.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν επίσης ότι ένα ελλειμματικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή 4Box, αν και μπορεί από μόνο του να ρυθμίζει τη σηματοδότηση του υποδοχέα M3-mAChR και του υποδοχέα της χολοκυστοκινίνης CCK-R, δεν εμφανίζει επιλεκτικότητα στην ρύθμιση της σηματοδότησης του M3-mAChR έναντι του CCK-R, όπως συμβαίνει με ολόκληρη την πρωτεΐνη RGS4 αγρίου τύπου. Αυτό υποδηλώνει ότι το αμινοτελικό και καρβοζυτελικό άκρο της RGS4 ενισχύουν την δραστικότητα της πρωτεΐνης και μεσολαβούν στην αναγνώριση του αλληλεπιδρώντος υποδοχέα (Zeng et al., 1998). Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματά μας δηλώνουν ότι το αμινοτελικό, αλλά ενδεχομένως και το καρβοζυτελικό άκρο της RGS4 πρωτεΐνης είναι απαραίτητα και συνεισφέρουν ουσιαστικά στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, στην πρόσδεσή της με τους οπιοειδείς υποδοχείς, και συμβάλλουν στη δημιουργία πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Περαιτέρω μελέτες μας έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική μετακίνηση της RGS4 και η στρατολόγησή της από τους υποδοχείς, τροποποιείται μετά την ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού έδειξαν ότι η RGS4 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, ενώ μικρή ποσότητα υπάρχει εντοπισμένη στη μεμβράνη. Η ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων με DAMGO (μ-OR) ή DSLET (δ-OR) οδήγησε στη μετατόπιση της RGS4 στη μεμβράνη όπου συνεντοπίζεται με τους μ-OR και δ-OR, αντίστοιχα. Μεγαλύτερη έκθεση με τους ίδιους αγωνιστές, οδήγησε σε εσωτερίκευση της RGS4 μαζί με τους υποδοχείς και συνεντοπισμό αυτών στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση του δ-OR, μικρή ποσότητα της RGS4 βρέθηκε να συνεντοπίζεται με τον δ-OR στο κυτταρόπλασμα, απουσία αγωνιστή. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι ένας πληθυσμός του δ-OR εμφανίζει ιδιοσύστατη ενεργότητα (constitutive activity), και μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα πριν την ενεργοποίηση του υποδοχέα όπου συνεντοπίζεται με την RGS4. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η κατανομή της RGS4 δεν επηρεάζεται από την έκφραση των οπιοειδών υποδοχέων, αλλά ο υποκυτταρικός εντοπισμός της μεταβάλλεται ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησης αυτών. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν με προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η

RGS4 στρατολογείται στη μεμβράνη μετά από την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα ένας μικρός πληθυσμός της RGS4 στο κύτταρο παραμένει προσδεδεμένος στη μεμβράνη οποιαδήποτε στιγμή (Druey et al., 1998). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι συνέκφραση της RGS4 με τον M2-mAChR οδήγησε στην στρατολόγηση της RGS4 στην κυτταρική μεμβράνη ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του υποδοχέα ή των G πρωτεϊνών (Roy et al., 2003). Η παρατήρηση ότι μέρος της RGS4 συνεντοπίζεται με τον δ-OR στο κυτταρόπλασμα, πριν και πολύ περισσότερο μετά την ενεργοποίηση αυτού, συμφωνεί με μελέτες του εργαστηρίου μας που δείχνουν αλλαγές στην εσωτερίκευση του δ-OR παρουσία της RGS4. Πράγματι, πειράματα κυτταρομετρίας ροής σε κύτταρα ΗΕΚ293 που εκφράζουν τον δ-OR, έδειξαν ότι παρουσία της RGS4 επιταχύνεται ο ρυθμός εσωτερίκευσης του δ-OR, μετά από την ενεργοποίηση του τελευταίου με τον αγωνιστή DSLET. Στα ίδια πειράματα φάνηκε επίσης ότι ο δ-OR στην κατάσταση ηρεμίας του, παρουσιάζει αυξημένη εσωτερίκευση, παρουσία της RGS4. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη σημασία της RGS4 πρωτεΐνης στην εσωτερίκευση του υποδογέα και τον πιθανό ρόλο αυτής στα φαινόμενα ανογής και απευαισθητοποίησης (μέρος διδακτορικής διατριβής Μ. Παπακωνσταντίνου).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι RGS πρωτεΐνες ρυθμίζουν τους τελεστές επιταχύνοντας την απενεργοποίηση των Ga υπομονάδων ή δρουν απευθείας ως ανταγωνιστές των τελεστών (Bernstein et al., 2004, Anger et al., 2004). Προκαταρκτικές μελέτες του ρόλου της στους τελεστές είχαν δείξει ότι η RGS4, όταν επωάζεται με μεμβράνες κυττάρων NG-108, αναστρέφει την αναστολή της συσσώρευσης του cAMP που προκαλείται από την εγκεφαλίνη (Hepler et al., 1997). Με δεδομένο ότι η RGS4 δεν επηρεάζει τη συγγένεια πρόσδεσης του μ-OR για μ- οπιοειδείς αγωνιστές, εξετάσαμε κατά πόσο η έκφρασή της ρυθμίζει τη σηματοδότηση του μ- και δ-OR καθοδικά, επηρεάζοντας την αναστολή που προκαλείται στα επίπεδα του cAMP. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η έκφραση της RGS4 τροποποιεί την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης. Η παρατηρούμενη μείωση της αναστολής του παραγόμενου cAMP παρουσία της RGS4 πρωτεΐνης θα μπορούσε να αποδοθεί στη δράση της πρωτεΐνης αυτής ως ενεργοποιητής της δράσης GTPάσης (GAP – GTPase activating protein) των G πρωτεϊνών, χωρίς να

αδενυλικής κυκλάσης (effector antagonist), παρεμποδίζοντας δηλαδή την πρόσδεση των Ga υπομονάδων σε αυτήν. Πράγματι, μελέτες με ανασύσταση του M1-mAChR σε φωσφολιπιδικά κυστίδια έδειξαν ότι η RGS4 πρωτεΐνη εμποδίζει τη σηματοδότηση στην PLCβ μέσω των Gqa πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από το GTPyS, ένα μηυδρολυόμενο GTP ανάλογο (Hepler et al., 1997). Αυτή η παρατήρηση δεικνύει ότι η RGS4, στο σύστημα των ανασυσταμένων φωσφολιπιδικών κυστιδίων, λειτουργεί ως ανταγωνιστής του τελεστή PLCβ με το να δεσμεύει την Gqa και να την εμποδίζει να αλληλεπιδράσει με την PLCβ, χωρίς να επιταχύνει την ενεργότητα GTPάσης της Gqa. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μέλη της C/R7 υποοικογένειας των RGS πρωτεϊνών μπορούν να δρουν ως ανταγωνιστές των τελεστών όπως συμβαίνει στην περίπτωση του μ-OR στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Garzon et al., 2005α). Σε αυτές τις μελέτες δεικνύεται ότι οι RGS πρωτεΐνες της R7 υποοικογένειας προσδένουν και συσσωρεύουν τις ενεργοποιημένες από τους οπιοειδείς υποδοχείς Gi/o/za υπομονάδες. Με αυτόν τον τρόπο ανταγωνίζονται τους τελεστές και οδηγούν τους υποδοχείς σε απευαισθητοποίηση και τον οργανισμό σε βραδύτερη ανοχή. Μελέτες με τη χρήση μ- και δ- χιμαιρικών οπιοειδών υποδοχέων, στους οποίους έχει γίνει ανταλλαγή των καρβοξυτελικών τους άκρων, αναφέρουν επίσης ότι η RGS4 μειώνει δραστικά την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης που παρατηρείται μετά από την ενεργοποίηση του μ-OR, γωρίς να προκαλεί καμιά αλλαγή στη λειτουργία της αδενυλικής κυκλάσης στην περίπτωση του δ-OR (Xie et al., 2007).

Σε συμφωνία με αυτές τις μελέτες, μη δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου μας έχουν δείξει ότι στην περίπτωση του δ-OR, η RGS4 πρωτεΐνη δεν επηρεάζει τη σηματοδότηση του υποδοχέα στην αδενυλική κυκλάση (διδακτορική διατριβή Μ. Παπακωνσταντίνου). Το ερώτημα που ανακύπτει είναι τελικά γιατί υπάρχει διαφοροποίηση στη δράση της RGS4 στη σηματοδότηση των μ-OR και δ-OR. Μια εξήγηση για αυτό θα μπορούσε να αποτελεί το γεγονός ότι στην περίπτωση της ενεργοποίησης του μ-OR, η RGS4 δεσμεύει και λειτουργεί ως GAP (ή/και ως ανταγωνιστής του τελεστή αδενυλική κυκλάση) για τις Gia<sub>1</sub>, Gia<sub>2</sub> και Gia<sub>3</sub> υπομονάδες, όπως μας έδειξαν τα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης. Στην περίπτωση όμως του ενεργοποιημένου δ-OR, τα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης δεικνύουν ότι η RGS4 απελευθερώνει τις Gia<sub>1,3</sub> και δεν δημιουργεί πλέον ζεύγη με αυτές. Έτσι οι Gia<sub>1,3</sub> είναι ενδεχομένως ελεύθερες να δράσουν και να ενεργοποιήσουν την αδενυλική κυκλάση. Μια δεύτερη πιθανή εξήγηση για την διαφοροποίηση στη δράση της RGS4 στους μ-OR και δ-OR, είναι ότι ο δ-OR ενδεχομένως σηματοδοτεί μέσω διαφορετικής ισομορφής της αδενυλικής κυκλάσης έναντι του μ-OR, και η RGS4 λειτουργεί ως ανταγωνιστής της αδενυλικής κυκλάσης αλληλεπιδρώντας απευθείας και μόνο με τον υπότυπο της αδενυλικής κυκλάσης στην οποία σηματοδοτεί ο μ-OR, μην επιτρέποντας έτσι την πρόσδεση των Gia πρωτεϊνών σε αυτόν τον τελεστή.

Από τα αποτελέσματά μας επίσης διαφαίνεται ότι το αμινοτελικό άκρο της RGS4 είναι απαραίτητο για την δράση της στην αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η ελλειμματική RGS4 δεν μπορεί να στρατολογηθεί στη μεμβράνη ή/και να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα, και αποδεικνύει της σημασία αυτής της περιοχής για την RGS4 στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων. Πειράματα όπου προσδιορίστηκαν οι περιοδικές μεταβολές της ροής ιόντων Cl λόγω μετατόπισης του ενδοκυτταρικού Ca<sup>+2</sup> από την ενεργοποίηση των M3-mAChR και CCK-R υποδοχέων, έδειξαν ότι η έλλειψη του αμινοτελικού άκρου της RGS4 προκαλεί δραματική μείωση στην αναστολή του σήματος, σε σχέση με αυτή που παρατηρείται για την RGS4 αγρίου τύπου (Zeng et al., 1998). Από τις ίδιες μελέτες φάνηκε επίσης ότι η έλλειψη του αμινοτελικού άκρου της RGS4 την αποτρέπει να αναστείλει επιλεκτικά τη σηματοδότηση του M3-mAChR, έναντι της σηματοδότησης του CCK-R. Σε άλλες μελέτες φάνηκε ότι η έλλειψη του NH<sub>2</sub> άκρου από την RGS4 οδηγεί σε απώλεια της ανασταλτικής δράσης της RGS4 στη σηματοδότηση των φερομονών στο S. cerevisiae και στον τερματισμό της ανάπτυξης της ζύμης (Srinivasa et al., 1998). Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η απώλεια του NH<sub>2</sub> άκρου της RGS4 μειώνει σημαντικά την δραστικότητα της RGS4 στην επιτάχυνση του ρυθμού απενεργοποίησης των Kir3 καναλιών που προκαλείται από τη δράση της ακετυλοχολίνης στον M2-mAChR υποδογέα (Jaen and Dupnik, 2006), ενώ η RGS4 αγρίου τύπου ρυθμίζει δυναμικά τη λειτουργία των Kir3 καναλιών, διότι στοχεύεται μέσω του αμινοτελικού της άκρου στο συζευγμένο M2-mAChR υποδοχέα. Οι μελέτες αυτές οδηγούν σε ένα μοντέλο όπου η RGS4 συνδέεται με τον υποδοχέα ήδη πριν την ενεργοποίησή του, μέσω του αμινοτελικού της άκρου (pre-coupling), και έτσι αποκτά μεγαλύτερη ικανότητα να επιταχύνει την κινητική των συζευγμένων Kir3 καναλιών. Στις ίδιες μελέτες δείχθηκε ότι μια άλλη RGS πρωτεΐνη, η RGS3 που δεν μπορεί να προσδένεται με το αμινοτελικό άκρο της στους υποδοχείς, μπορεί και αυτή να ρυθμίσει τη λειτουργία των Kir3 καναλιών, όμως αυτή η ικανότητά της είναι περιορισμένη σε σχέση με την RGS4, όπως εξηγεί στην περίπτωσή της ένα μοντέλο πρόσκρουσηςσύζευξης (collision-coupling).

Έχει δειχθεί ότι οι RGS πρωτεΐνες, και μεταξύ αυτών και η RGS4, εμπλέκονται στη σηματοδότηση των MAPK μέσω των GPCRs. Πειράματα σε COS-7 κύτταρα που εκφράζουν παροδικά την RGS4 και τους υποδοχείς της βομβεσίνης (BB-R) και τον D2-R ντοπαμινεργικό υποδοχέα, έδειξαν ότι η RGS4 αναστέλλει την ενεργοποίηση των MAP κινασών διαμέσου των Gia και Gq/11 πρωτεϊνών (Yan et al., 1997). Με βάση αυτά τα δεδομένα θεωρήσαμε ότι η RGS4 πρωτεΐνη είναι σε θέση να αναστείλει την ενεργοποίηση των ERK1,2 που προκαλείται από την ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδογέων. Πράγματι, οι μελέτες μας έδειξαν ότι η RGS4 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των ERK1,2 που προκαλείται από τους ενεργοποιημένους μ- και δ- οπιοειδείς υποδοχείς. Επιπλέον, για άλλη μια φορά επιβεβαιώθηκε ο σημαντικός ρόλος του αμινοτελικού άκρου της RGS4 στη ρυθμιστική της δράση. Σε άλλες μελέτες σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστόματος παρατηρήθηκε ότι η RGS4 μειώνει την ενεργοποίηση των ERK1,2 κινασών που προκαλείται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα 5-HT<sub>1B</sub> της σεροτονίνης, ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η συνέκφραση των RGS2, 3, 4, 5 και 16 σε κύτταρα COS-7 που εκφράζουν τους M2 και M3-mAChRs, οδηγεί σε διαφορική αναστολή της ενεργοποίησης των ERK1,2 που προκαλείται από ενεργοποίηση των υποδοχέων με καρμπακόλη (Leone et al., 2000, Anger et al., 2007). Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι η δράση των RGS πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση των MAPKs οφείλεται σε μια συνολική ικανότητά τους, αφενός να ασκούν GAP ενεργότητα έναντι των Gia ή Gqa υπομονάδων και αφετέρου στην ικανότητα που έχουν να αλληλεπιδρούν με τις Ga υπομονάδες, να τις απομονώνουν και εν τέλει να μην επιτρέπουν την αλληλεπίδρασή τους με τους τελεστές των υποδοχέων (ανταγωνισμός των τελεστών, effector antagonism). Στην περίπτωση όμως της παρούσας διατριβής, η δράση της RGS4 στη σηματοδότηση των ERK1,2 δεν διαφέρει μεταξύ των μ-OR και δ-OR. Αυτό οφείλεται ενδεχομένως στο γεγονός ότι η RGS4, σε αντίθεση με την περίπτωση της αδενυλικής κυκλάσης, δρα ως GAP σε κοινές για τους δυο υποδοχείς Ga υπομονάδες, μέσω των οποίων οι μ-OR και δ-OR μεταβιβάζουν το σήμα τους στις ERK1,2. Για παράδειγμα, οι Gia<sub>2</sub> υπομονάδες δείχνουν το ίδιο πρότυπο αλληλεπίδρασης με την RGS4 και τους μ-, δ-OR, όπως φαίνεται από τα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης. Μια δεύτερη πιθανότητα για το γεγονός ότι δεν υπάρχει διαφορά στη δράση της RGS4 στη σηματοδότηση των ERK1,2 από τους μ-,δ-ORs, είναι ότι ενδεχομένως στο σύστημά μας οι οπιοειδείς υποδοχείς μεταφέρουν το ερέθισμα μέσω των Gβγ υπομονάδων, οι οποίες είναι κοινές και για τους δυο τύπους υποδοχέων που εξετάσαμε.

Συμπερασματικά, με τη χρήση διαφορετικών λειτουργικών πειραματικών μεθόδων αποδείξαμε ότι η RGS4 μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νέος «αρνητικός» ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης των οπιοειδών υποδοχέων. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η RGS4 είναι ένα μόριο-κλειδί για την ρύθμιση της σηματοδότησης των οπιοειδών υποδοχέων, γιατί α) αλληλεπιδρά απευθείας με τους οπιοειδείς υποδοχείς, β) συμμετέχει ενεργά και καθοριστικά στην οργάνωση των σηματοδοτικών συμπλόκων RGS4 – Ga – OR στις ενδοκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων, γ) είναι υπεύθυνη για την εξειδίκευση σύζευξης των υποδοχέων αυτών με συγκεκριμένες Ga υπομονάδες και δ) τροποποιεί τη δράση των τελεστών (αδενυλική κυκλάση, MAP κινάσες) μετά από ενεργοποίηση των μ-OR και δ-OR.

Το κύριο ερώτημα που αναδύεται από την παρούσα μελέτη είναι γιατί τελικά υπάρχει εξειδίκευση στην αλληλεπίδραση της RGS4 με τις G πρωτεΐνες και τους οπιοειδείς υποδοχείς, και πώς αυτή η εξειδίκευση στην αλληλεπίδραση μεταφράζεται σε διαφοροποίηση του λειτουργικού της ρόλου στη σηματοδότηση του εκάστοτε οπιοειδούς υποδοχέα. Είναι γνωστό ότι η RGS4 αλληλεπίδρά *in vitro* με συγκεκριμένες υποοικογένειες των Ga πρωτεΐνών, όπως τις Gia και Gqa, για να επιταχύνει την ενεργότητα GTPάσης τους, χωρίς όμως να ξεχωρίζει συγκεκριμένους υποτύπους αυτών των υποοικογενειών. Η πληθώρα των μελετών που αναφέρθηκαν δείχνουν επίσης, ότι η RGS4 αλληλεπιδρά τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι η RGS4 αλληλεπιδρά και με τους μ- και δ- οπιοειδείς υποδοχείς (ακόμα και με τον κ-OR, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Φαίνεται λοιπόν, ότι τα ζεύγη RGS4-Ga

και RGS4-GPCRs που μπορούν να δημιουργηθούν είναι πολλά και δεν εξηγούν την εξειδίκευση στη δράση της RGS4 στα διάφορα συστήματα. Αυτό, όμως, που δεικνύεται από τα πειράματά μας είναι ότι η RGS4 συμμετέχει και οργανώνει το σχηματισμό εξειδικευμένων τριμερών συμπλόκων οπιοειδούς υποδογέα – RGS4 πρωτεΐνης – G πρωτεϊνών, τα οποία περιλαμβάνουν συγκεκριμένες Ga υπομονάδες (Gia1.3, Gia2, Goa), ανάλογα με τον υπότυπο του οπιοειδούς υποδοχέα (μ- ή δ-) και με την κατάσταση ενεργοποίησής του. Συνεπώς, η εξειδίκευση στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων δεν «χτίζεται» σε επίπεδο αλληλεπίδρασης δυο πρωτεϊνών (RGS4-Ga ή RGS4-OR), αλλά σε επίπεδο αλληλεπίδρασης περισσότερων πρωτεϊνών μέσα σε ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Με αυτόν τον τρόπο μια RGS πρωτεΐνη μπορεί να αλληλεπιδρά με όλους τους οπισειδείς υποδοχείς, αλλά να σχηματίζει ένα λειτουργικό σηματοδοτικό σύμπλοκο με συγκεκριμένους υποτύπους οπισειδών υποδογέων και Ga υπομονάδων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (ενεργοποίηση ή μη). Η μετάδοση του σήματος μέσω αυτών των εξειδικευμένων συμπλόκων θα μπορούσε να οδηγήσει ακόμα και υποδοχείς της ίδιας κατηγορίας (π.χ. μ-, δ-ORs) σε διαφορετικές αποκρίσεις στους τελεστές, όπως είναι η αδενυλική κυκλάση, οι MAPKs ή άλλοι. Επιπλέον, οι μηχανισμοί απευαισθητοποίησης και εσωτερίκευσης των υποδοχέων ενδεχομένως να βασίζονται σε αυτά τα εξειδικευμένα σύμπλοκα και με τον τρόπο αυτόν να διαφοροποιούνται ακόμα και για υποδοχείς της ίδιας οικογένειας.

Είναι σημαντικό να αναλυθούν περισσότερο οι δομικοί καθοριστές της αλληλεπίδρασης της RGS4 με τους μ- και δ- οπιοειδείς υποδοχείς. Σε μια προσπάθεια για εξεύρεση των συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων του καρβοζυτελικού άκρου των μ-OR και δ-OR που είναι απαραίτητα για τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, θα μπορούσαν να δημιουργηθούν νέα χιμαιρικά πεπτίδια των καρβοζυτελικών άκρων με σημειακές αμινοξικές μεταλλαγές μέσα στο τμήμα που βρήκαμε ότι ευθύνεται για την αλληλεπίδραση, και να πραγματοποιηθούν πειράματα *in vitro* πρόσδεσης. Από την άλλη πλευρά, η αναζήτηση των αμινοξικών καταλοίπων της RGS4 που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με τους οπιοειδείς υποδοχείς θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με παρόμοιο τρόπο, δημιουργώντας μεταλλαγμένες μορφές της RGS4 σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα ή περιοχές του αμινοτελικού της άκρου. Η ανακάλυψη των περιοχών της RGS4 που είναι σημαντικές για την αλληλεπίδραση με τους οπιοειδείς υποδοχείς θα ανοίξει το δρόμο για στόχευση αυτών των περιοχών από φαρμακολογικούς παράγοντες, όπως αναλύεται παρακάτω. Η δομική μελέτη θα μπορούσε να ολοκληρωθεί με την προσπάθεια συγκρυστάλλωσης της RGS4 με το καρβοξυτελικό άκρο του μ-OR και του δ-OR, ώστε να αποκαλυφθούν οι δομικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης αυτών των πρωτεϊνών χωροταξικά.

Πέραν όμως από τις δομικές μελέτες, θα ήταν ενδιαφέρον να αναλυθεί περαιτέρω και η επίδραση που έχει η RGS4 στην εξειδίκευση της μετάδοσης του σήματος των οπιοειδών υποδοχέων προς τους τελεστές τους. Με δεδομένο το γεγονός ότι κατά την ενεργοποίηση των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων δημιουργούνται πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεταξύ των υποδοχέων, της RGS4 και συγκεκριμένων Ga υπομονάδων, θα ήταν δυνατό με τεχνικές υπερέκφρασης αρνητικών επικρατών (dominant negative) μεταλλαγμάτων συγκεκριμένων Gia υπομονάδων σε κύτταρα, να μελετηθεί η σηματοδότηση στους τελεστές παρουσία της RGS4. Από την άλλη πλευρά, θα μπορούσε να μελετηθεί ο ρόλος και των Gβγ υπομονάδων στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων παρουσία της RGS4. Χρησιμοποιώντας μόρια που απομονώνουν τις Gβγ υπομονάδων στην αναστολή της σηματοδότησης των υποδοχέων από την RGS4 και στη δημιουργία των εξειδικευμένων τριμερών συμπλόκων μεταξύ υποδοχέων και συγκεκριμένων Ga υπομονάδων στης ρόλος των Gβγ υπομονάδων στην προς τους ποριονών τος Gβγ υπομονάδων στην εξειδικευμένων τοι και των σρουσία της RGS4. Και συγκεκριμένουν της Gβγ υπομονάδων στην αναστολή της σηματοδότησης των υποδοχέων από την RGS4 και στη δημιουργία των εξειδικευμένων τριμερών συμπλόκων μεταξύ υποδοχέων RGS4 και συγκεκριμένων Ga υπομονάδων.

Ένα επίσης αναπάντητο ερώτημα που παραμένει, είναι κατά πόσο η RGS4 λειτουργεί τελικά ως GAP ή ως ανταγωνιστής των τελεστών στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων. Με χρήση του μη υδρολυόμενου GTPγS αναλόγου ή dominant negative μεταλλάξεων της RGS4 που αλληλεπιδρούν με τις Gia και δεν διαθέτουν GAP ενεργότητα, θα μπορούσε να διαπιστωθεί εάν η RGS4 παρεμποδίζει τη σηματοδότηση λειτουργώντας ως GAP για τις Ga υπομονάδες ή απλά δεσμεύοντας και συσσωρεύοντας τις Ga υπομονάδες (ανταγωνισμός έναντι των τελεστών), αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάδοση του σήματος στους τελεστές. Τέλος, θα ήταν σημαντικό να μελετηθεί ο ρόλος της RGS4 στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων μετά από μεγάλης διάρκειας χορήγηση αγωνιστών σε κύτταρα. Η χορήγηση οπιοειδών αναλόγων για μεγάλο χρονικό διάστημα οδηγεί σε απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση των οπιοειδών υποδοχέων.

επιταχύνει το ρυθμό εσωτερίκευσης του δ-OR, ενώ οι έρευνες συνεχίζονται για την εξεύρεση άλλων RGS πρωτεϊνών που ενδεχομένως εμπλέκονται στην απευαισθητοποίηση των διαφόρων υποτύπων των οπιοειδών υποδοχέων. Η χρόνια χορήγηση οπιοειδών οδηγεί, επίσης, σε φαινόμενα όπως η υπερευαισθητοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί ο ρόλος της RGS4 στη σηματοδότηση της υπερευαισθητοποιημένης κυκλάσης σε αυτές τις περιπτώσεις.

Με γνώμονα το γεγονός ότι οι RGS πρωτεΐνες ρυθμίζουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη, τον υποκυτταρικό εντοπισμό σηματοδοτικών μορίων και την εν γένει σηματοδότηση στους τελεστές από τους ενεργοποιημένους GPCRs, είναι φανερό ότι οι πρωτεΐνες αυτές εξυπηρετούν σημαντικές λειτουργίες σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού και μπορούν να θεωρηθούν ως νέοι φαρμακολογικοί στόχοι (Sjogren et al., 2010). Για το λόγο αυτό, η RGS4 μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νέος φαρμακολογικός στόχος για την επιλεκτική παρέμβαση στα σηματοδοτικά μονοπάτια των οπιοειδών υποδοχέων, ώστε να γίνει δυνατή η ρύθμιση της δράσης, της ειδικότητας και της διάρκειας επίδρασης συγκεκριμένων οπιοειδών αναλόγων. Με αυτόν τον τρόπο, θα ήταν δυνατόν να αποτραπούν οι ενδεχόμενες αρνητικές επιδράσεις που προκαλεί η μορφίνη και άλλες ναρκωτικές ουσίες. Μελέτες με knock out ποντίκια για την RGS4 δεν έδειξαν μεταβολές στη στιγμιαία ή γρόνια απόκριση στα οπιοειδή (Grillet et al., 2005). Παρόλα αυτά μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τοπική αποσιώπηση της έκφρασης της RGS4 στον επικλινή πυρήνα αυξάνει την ανταμοιβή στην μορφίνη (Han et al., 2010). Η ίδια μελέτη έδειξε, επίσης, ότι στοχευμένη αποσιώπηση της RGS4 στον υπομέλανα τόπο αυξάνει τη φυσική εξάρτηση στη μορφίνη. Από αυτές τις μελέτες συμπεραίνει κανείς ότι η RGS4 ενδεχομένως εμπλέκεται σε φαινόμενα που παρατηρούνται με την κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών, υπόθεση που χρήζει περισσότερης έρευνας. Το ερώτημα που επίσης τίθεται είναι κατά πόσο υπάρχουν και άλλες RGS πρωτεΐνες, εκτός από την RGS4, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της δράσης των οπιοειδών υποδογέων. Έχει ήδη αναφερθεί η RGS9-2 πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται στη δράση αγωνιστών του μ-OR, καθώς επίσης και στη σηματοδότηση και εσωτερίκευση του υποδοχέα. Μια άλλη ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη είναι η RGS2 για την οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται σε φαινόμενα αναλγησίας (Garzon et al.,

2005α) και ότι παρεμβαίνει στη δράση της αδενυλικής κυκλάσης με διαφορετικό τρόπο στους μ-, δ- και κ- οπιοειδείς υποδοχείς (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η δημιουργία νέων φαρμακολογικών παραγόντων μπορεί να στογεύει είτε στην αναστολή της GAP ενεργότητας της RGS4, είτε στη διάρρηξη της αλληλεπίδρασης αυτής με τους υποδοχείς ή ακόμα και στην τροποποίηση της εξειδίκευσης σύζευξης των G πρωτεϊνών με τους διάφορους GPCR υποδοχείς. Ήδη ερευνητικές ομάδες έχουν κατασκευάσει μικρά κυκλικά πεπτίδια, με παρόμοια δομή αυτής της περιοχής διακόπτη Ι της Gia υπομονάδας, τα οποία παρεμποδίζουν την GAP δράση της RGS4 (Jin et al., 2004). Αυτοί οι φαρμακολογικοί παράγοντες παρεμβαίνουν άμεσα στην περιοχή αλληλεπίδρασης της RGS4 με την Ga υπομονάδα. Νεώτερες μελέτες με τη χρήση τεχνικών high throughput screening αναγνώρισαν ένα φαρμακολογικό παράγοντα, τον CCG-4986, ένα μη πεπτιδικό συστατικό, ο οποίος προσδένεται στην RGS4 και αναστέλλει την GAP ενεργότητα της RGS4 in vitro καθώς και τη δράση της στη σηματοδότηση του μ-OR στην αδενυλική κυκλάση. Η δράση του CCG-4986 παράγοντα είναι εξειδικευμένη για την RGS4 και δεν επιδρά σε άλλες RGS πρωτεΐνες (Roman et al., 2007). Μελέτες επίσης του εργαστηρίου του Neubig έδειξαν ότι η δράση του CCG-4986 οφείλεται στο ότι το φάρμακο αυτό τροποποιεί ομοιοπολικά την Cys148, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια απέναντι από την RGS Box περιοχή της RGS4 (Roman et al., 2010). Η δράση αυτή του μορίου έχει ως αποτέλεσμα τη διάρρηξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ζεύγους RGS-Ga, μέσω ενός αλλοστερικού μηγανισμού.

Από τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι στιγμής για τις RGS πρωτεΐνες και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής διαφαίνεται ότι οι RGS πρωτεΐνες δεν έχουν μόνο έναν περιορισμένο ρόλο στην απενεργοποίηση των Ga πρωτεΐνών και στην παρεμπόδιση της σηματοδότησης των GPCRs, αλλά ένα γενικότερο ρόλο στην εξειδικευμένη ρύθμιση της σηματοδότησης των υποδοχέων αυτών καθοδικά. Για το λόγο αυτό, είναι επιτακτική η αναζήτηση νέων φαρμακολογικών παραγόντων που να στοχεύουν στις RGS πρωτεΐνες και όχι στους υποδοχείς ή στις G πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο θα αποτρέπονται παρενέργειες, όπως στην περίπτωση ενός φαρμακολογικού παράγοντα που επιδρά γενικευμένα στη σηματοδότηση πολλών GPCRs. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ένας τρόπος για να επιτευχθεί εξωγενώς η ακριβής ρύθμιση της σηματοδότησης είναι η αναζήτηση φαρμακολογικών παραγόντων, οι οποίοι θα εμποδίζουν την αλληλεπίδραση μιας RGS πρωτεΐνης με τον υποδοχέα. Ένα μόριοαναστολέας θα μπορούσε επίσης να στοχεύει στη διάρρηξη της στόχευσης της RGS πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Θα μπορούσαν επίσης να κατασκευαστούν εξειδικευμένοι ενεργοποιητές, οι οποίοι θα ενισχύουν τις επιδράσεις των RGS πρωτεϊνών. Τέτοια σκευάσματα θα μπορούσαν να ενισχύσουν για παράδειγμα την επίδραση της RGS2, έλλειψη της οποία προκαλεί σύσφιξη των αγγείων (Heximer et al., 2003), για την αντιμετώπιση της υπέρτασης, καθώς επίσης να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση της νόσου του Parkinson ως μια εξειδικευμένη θεραπεία επιλεκτικής ρύθμισης στο επίπεδο της RGS9, υπερέκφραση της οποίας στο ραβδωτό σώμα τρωκτικών και πρωτευόντων καταστέλλει την προκαλούμενη από L-DOPA δυσκινησία (Gold et al., 2007, Sjogren et al., 2010).

Οι μελλοντικές προοπτικές για τη στοχευμένη παρεμπόδιση ή ενίσχυση της λειτουργίας των RGS πρωτεϊνών διευρύνονται καθημερινά με μελέτες στο χώρο των RGS πρωτεϊνών και της συμμετοχής αυτών σε νέες θεραπευτικές καινοτόμες μεθοδολογίες. Όσον αφορά στη δράση της RGS4, η οποία αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι φανερό από τα προαναφερθέντα ότι ανοίγει μια νέα προοπτική για την ανακάλυψη φαρμάκων που θα μπορούσαν να μειώνουν τις παρενέργειες των οπιοειδών αναλόγων, διατηρώντας τις ευεργετικές επιδράσεις των οπιοειδών στα φαινόμενα αναλγησίας.
## 6. Βιβλιογραφία

Abramow-Newerly M., Roy A.A., Nunn C., Chidiac P. (2006). RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors and auxiliary proteins. Cell. Signal. 18(5): 579-91.

Alfaras-Melainis K., Gomes I., Rozenfeld R., Zachariou V., Devi L. (2009). Modulation of opioid receptor function by protein-protein interactions. Front. Biosci. 14: 3594-607.

Alves I.D., Ciano K.A., Boguslavski V., Varga E., Salamon Z., Yamamura H.I., Hruby V.J., Tollin G. (2004). Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. J. Biol. Chem. 279(43): 44673-82.

Anger T., Klintworth N., Stumpf C., Daniel W.G., Mende U., Garlichs C.D. (2007). RGS protein specificity towards Gq- and Gi/o-mediated ERK 1/2 and Akt activation, in vitro. J. Biochem. Mol. Biol. 40: 899-910.

Anger T., Zhang W., Mende U. (2004). Differential contribution of GTPase activation and effector antagonism to the inhibitory effect of RGS proteins on Gq-mediated signaling in vivo. J Biol Chem. 279(6): 3906-15.

Arshavsky V.Y. and Pugh E.N. Jr. (1998). Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins. Neuron 20(1): 11-14.

Avidor-Reiss T., Nevo I., Saya D., Bayewitch M., Vogel Z. (1997). Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. J. Biol. Chem. 272(8): 5040-7.

Bansal G., Druey K.M., Xie Z. (2007). R4 RGS proteins: regulation of G-protein signaling and beyond. Pharmacol. Ther. 116: 473-95.

Barak L.S., Ménard L., Ferguson S.S., Colapietro A.M., Caron M.G. (1995). The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)2,3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor. Biochemistry 34(47): 15407-14.

Behrens J., Jerchow B.A., Würtele M., Grimm J., Asbrand C., Wirtz R., Kühl M., Wedlich D., Birchmeier W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. Science 280(5363): 596-9.

Belcheva M.M., Haas P.D., Tan Y., Heaton V.M., Coscia C.J. (2002). The fibroblast growth factor receptor is at the site of convergence between mu-opioid receptor and growth factor signaling pathways in rat C6 glioma cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303: 909-18.

Benzing T., Yaffe M.B., Arnould T., Sellin L., Schermer B., Schilling B., Schreiber R., Kunzelmann K., Leparc G.G., Kim E., Walz G. (2000). 14-3-3 interacts with regulator of

G protein signaling proteins and modulates their activity. J. Biol. Chem. 275(36): 28167-72.

Berman D.M. and Gilman A.G. (1998). Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. J. Biol. Chem. 273: 1269-72.

Berman D.M., Kozasa T., Gilman A.G. (1996,  $\alpha$ ). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. J. Biol. Chem. 271: 27209-212.

Berman D.M., Wilkie T.M., Gilman A.G. (1996,  $\beta$ ). GAIP and RGS4 are GTPaseactivating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. Cell 86: 445-52.

Bernstein L.S., Grillo A.A., Loranger S.S., Linder M.E. (2000). RGS4 binds to membranes through an amphipathic alpha-helix. J. Biol. Chem. 275: 18520-6.

Bernstein L.S., Ramineni S., Hague C., Cladman W., Chidiac P., Levey A.I., Hepler J.R. (2004). RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate Gq/11alpha signaling. J. Biol. Chem. 279: 21248-56.

Bishop G.B., Cullinan W.E., Curran E., Gutstein H.B. (2002). Abused drugs modulate RGS4 mRNA levels in rat brain: comparison between acute drug treatment and a drug challenge after chronic treatment. Neurobiol. Dis. 10(3): 334-43.

Bockaert J., Fagni L., Dumuis A., Marin P. (2004,  $\alpha$ ). GPCR interacting proteins (GIP). Pharmacol. Ther. 103(3): 203-21.

Bockaert J., Marin P., Dumuis A., Fagni L. (2003). The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. FEBS Lett. 546(1): 65-72.

Bockaert J. and Pin J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO J. 18(7): 1723-9.

Bockaert J., Roussignol G., Bécamel C., Gavarini S., Joubert L., Dumuis A., Fagni L., Marin P. (2004,  $\beta$ ). GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. Biochem. Soc. Trans. 32(Pt 5): 851-5.

Bourne H.R. (1997). Pieces of the true grail: a G protein finds its target. Science 278 (5345): 1898-9.

Bouvier M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. Nat. Rev. Neurosci. 2: 274-286.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 2: 248-254.

Broom D.C., Jutkiewicz E.M., Rice K.C., Traynor J.R., Woods J.H. (2002). Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants? Jpn. J. Pharmacol. 90(1): 1-6.

Brzostowski J.A. and Kimmel A.R. (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. Trends Biochem. Sci. 26: 291-7.

Burchett S.A. (2000). Regulators of G protein signaling: a bestiary of modular protein binding domains. J. Neurochem. 75(4): 1335-51.

Burchett S.A. (2005). Psychostimulants, madness, memory...and RGS proteins? Neuromolecular Med. 7(1-2): 101-27.

Burchett S.A., Volk M.L., Bannon M.J., Granneman J.G. (1998). Regulators of G protein signaling: rapid changes in mRNA abundance in response to amphetamine. J. Neurochem. 70(5): 2216-9.

Cabrera-Vera T.M., Hernandez S., Earls L.R., Medkova M., Sundgren-Andersson A.K., Surmeier D.J., Hamm H.E. (2004). RGS9-2 modulates D2 dopamine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> channel inhibition in rat striatal cholinergic interneurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(46): 16339-44.

Calo' G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D. (2000). Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. Br. J. Pharmacol. 129(7): 1261-83.

Carlton J., Bujny M., Rutherford A., Cullen P. (2005). Sorting nexins-unifying trends and new perspectives. Traffic 6(2): 75-82.

Carman C.V., Parent J.L., Day P.W., Pronin A.N., Sternweis P.M., Wedegaertner P.B., Gilman A.G., Benovic J.L., Kozasa T. (1999). Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. J. Biol. Chem. 274(48): 34483-92.

Carter B.D. and Medzihradsky F. (1993). Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(9): 4062-6.

Cavalli A., Druey K.M., Milligan G. (2000). The regulator of G protein signaling RGS4 selectively enhances alpha 2A-adrenoreceptor stimulation of the GTPase activity of Go1alpha and Gi2alpha. J. Biol. Chem. 275: 23693-9.

Cen B., Xiong Y., Ma L., Pei G. (2001,  $\alpha$ ). Direct and differential interaction of betaarrestins with the intracellular domains of different opioid receptors. Mol. Pharmacol. 59(4): 758-64. Cen B., Yu Q., Guo Y., Wu Y., Ling K., Cheng Z., Ma L., Pei G. (2001,  $\beta$ ). Direct binding of beta-arrestins to two distinct intracellular domains of the  $\delta$ -opioid receptor. J. Neurochem. 76: 1887-94.

Chaipatikul V., Loh H.H., Law P.Y. (2003). Ligand selective activation of mu opioid receptor: demonstrated with deletion and single amino acid mutations of 3rd intracellular loop domain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 305: 909-18.

Chakrabarti S., Oppermann M., Gintzler A.R. (2001). Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulating cell signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(7): 4209-14.

Chan J.S., Chiu T.T., Wong Y.H. (1995). Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. J. Neurochem. 65(6): 2682-9.

Chan A.S., Law P.Y., Loh H.H., Ho P.N., Wu W.M., Chan J.S., Wong Y.H. (2003). The first and third intracellular loops together with the carboxy terminal tail of the delta-opioid receptor contribute toward functional interaction with Galpha16. J. Neurochem. 87(3): 697-708.

Chan R.K. and Otte C.A. (1982). Isolation and genetic analysis of Saccharomyces cerevisiae mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. Mol. Cell. Biol. 2: 11-20.

Charlton J.J., Allen P.B., Psifogeorgou K., Chakravarty S., Gomes I., Neve R.L., Devi L.A., Greengard P., Nestler E.J., Zachariou V. (2008). Multiple actions of spinophilin regulate mu opioid receptor function. Neuron 58(2): 238-47.

Chatterjee T.K., Eapen A.K., Fisher R.A. (1997). A truncated form of RGS3 negatively regulates G protein-coupled receptor stimulation of adenylyl cyclase and phosphoinositide phospholipase C. J. Biol. Chem. 272(24): 15481-7.

Chatterjee T.K. and Fisher R.A. (2000). Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs. J. Biol. Chem. 275: 24013-24021.

Chen C., Zheng B., Han J., Lin S.C. (1997). Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to Galpha proteins and inhibits pheromone signaling in yeast. J. Biol. Chem. 272: 8679-85.

Chen C.K., Eversole-Cire P., Zhang H., Mancino V., Chen Y.J., He W., Wensel T.G., Simon M.I. (2003). Instability of GGL domain-containing RGS proteins in mice lacking the G protein beta-subunit Gbeta5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(11): 6604-9.

Chen X. and Manning D.R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modifications. Oncogene 20: 1643-52.

Chen Y., Mestek A., Liu J., Yu L. (1993). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. Biochem. J. 295: 625-8.

Cheng Z.J., Yu Q.M., Wu Y.L., Ma L., Pei G. (1998). Selective interference of betaarrestin 1 with kappa and delta but not mu opioid receptor/G protein coupling. J. Biol. Chem. 273(38): 24328-33.

Chidiac P. (1998). Rethinking receptor-G protein-effector interactions. Biochem. Pharmacol. 55(5): 549-56.

Chidiac P., Gadd M.E., Hepler J.R. (2002). Measuring RGS protein interactions with Gq alpha. Methods Enzymol. 344: 686-702.

Chidiac P. and Roy A.A. (2003). Activity, regulation and intracellular localization of RGS proteins. Receptors Channels 9: 135-47.

Clapham D.E. and Neer E.J. (1997). G protein beta gamma subunits. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 167-203.

Connor M. and Christie M.D. (1999). Opioid receptor signalling mechanisms. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 26(7): 493-9.

Connor M., Schuller A., Pintar J.E., Christie M.J. (1999). Mu-opioid receptor modulation of calcium channel current in periaqueductal grey neurons from C57B16/J mice and mutant mice lacking MOR-1. Br. J. Pharmacol. 126(7): 1553-8.

Corbett A.D., Henderson G., McKnight A.T., Paterson S.J. (2006). 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. Br. J. Pharmacol. 147, Suppl 1: S153-62.

Crain S.M. and Shen K.F. (2000). Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability. Pain 84(2-3): 121-31.

Cvejic S. and Devi L.A. (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: Implication for a role in receptor internalization. J.Biol.Chem. 272: 26959-64.

De Vries L., Lou X., Zhao G., Zheng B., Farquhar M.G. (1998). GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(21): 12340-5.

De Vries L., Mousli M., Wurmser A., Farquhar M.G. (1995). GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11916-20.

De Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E., Farguhar M.G. (2000). The regulator of G protein signaling family. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 235-71.

Derrien A. and Druey K.M. (2001). RGS16 function is regulated by epidermal growth factor receptor-mediated tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. 276(51): 48532-8.

Devi L.A. (2001). Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. Trends Pharmacol. Sci. 22(10): 532-7.

Ding L., Mychaleckyj J.C., Hegde A.N. (2007). Full length cloning and expression analysis of splice variants of regulator of G-protein signaling RGS4 in human and murine brain. Gene 401(1-2): 46-60.

Dowal L., Elliott J., Popov S., Wilkie T.M., Scarlata S. (2001). Determination of the contact energies between a regulator of G protein signaling and G protein subunits and phospholipase C beta 1. Biochemistry 40: 414-21.

Drenan R.M., Doupnik C.A., Boyle M.P., Muglia L.J., Huettner J.E., Linder M.E., Blumer K.J. (2005). Palmitoylation regulates plasma membrane-nuclear shuttling of R7BP, a novel membrane anchor for the RGS7 family. J. Cell Biol. 169(4): 623-33.

Druey K.M., Blumer K.J., Kang V.H., Kehrl, J.H. (1996). Inhibition of G-proteinmediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. Nature 379: 742-6.

Druey K.M., Sullivan B.M., Brown D., Fischer E.R., Watson N., Blumer K.J., Gerfen C.R., Scheschonka A., Kehrl J.H. (1998). Expression of GTPase-deficient Gialpha2 results in translocation of cytoplasmic RGS4 to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 273: 18405-10.

Dulin N.O., Sorokin A., Reed E., Elliott S., Kehrl J.H., Dunn M.J. (1999). RGS3 inhibits G protein-mediated signaling via translocation to the membrane and binding to Galpha11. Mol. Cell. Biol. 19(1): 714-23.

Dupré D.J., Robitaille M., Rebois R.V., Hébert T.E. (2009). The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 49: 31-56.

Elenko E., Fischer T., Niesman I., Harding T., McQuistan T., Von Zastrow M., Farquhar M.G. (2003). Spatial regulation of Galphai protein signaling in clathrin-coated membrane microdomains containing GAIP. Mol. Pharmacol. 64(1): 11-20.

Evans C.J., Keith D.E. Jr, Morrison H., Magendzo K., Edwards R.H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. Science. 258: 1952-5.

Faurobert E. and Hurley J.B. (1997). The core domain of a new retina specific RGS protein stimulates the GTPase activity of transducin in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2945-50.

Feng G.J., Kellett E., Scorer C.A., Wilde J., White J.H., Milligan G. (2003). Selective interactions between helix VIII of the human mu-opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation. J. Biol. Chem. 278(35): 33400-7.

Fine P.G. and Portenoy R.K. (2004). The endogenous opioid systems. Chapter 2 in Fine P.G. and Portenoy R.K. (Eds.), "A clinical guide to opioid analgesia". The McGraw-Hill Companies, pp 9-15.

Fowler C.B., Pogozheva I.D., LeVine H. 3rd, Mosberg H.I. (2004,  $\alpha$ ). Refinement of a homology model of the mu-opioid receptor using distance constraints from intrinsic and engineered zinc-binding sites. Biochemistry 43(27): 8700-10.

Fowler C.B., Pogozheva I.D., Lomize A.L., LeVine H. 3rd, Mosberg H.I. (2004,  $\beta$ ). Complex of an active mu-opioid receptor with a cyclic peptide agonist modeled from experimental constraints. Biochemistry 43(50): 15796-810.

Fredericks Z.L., Pitcher J.A., Lefkowitz R.J. (1996). Identification of the G proteincoupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. J. Biol. Chem. 271(23): 13796-803.

Fujita S., Inanobe A., Chachin M., Aizawa Y., Kurachi Y. (2000). A regulator of G protein signalling (RGS) protein confers agonist-dependent relaxation gating to a G protein-gated  $K^+$  channel. J. Physiol. 526, Pt 2: 341-7.

Garnier M., Zaratin P.F., Ficalora G., Valente M., Fontanella L., Rhee M.H., Blumer K.J. and Scheideler M.A. (2003). Up-regulation of regulator of G protein signaling 4 expression in a model of neuropathic pain and insensitivity to morphine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 304(3): 1299-306.

Garrison T.R., Zhang Y., Pausch M., Apanovitch D., Aebersold R., Dohlman H.G. (1999). Feedback phosphorylation of an RGS protein by MAP kinase in yeast. J. Biol. Chem. 274(51): 36387-91.

Garzón J., López -Fando A., Sánchez-Blázquez P. (2003). The R7 subfamily of RGS proteins assists tachyphylaxis and acute tolerance at mu-opioid receptors. Neuropsychopharmacol. 28(11): 1983-90.

Garzón J., Rodríguez-Díaz M., López-Fando A., Sánchez-Blázquez P. (2001). RGS9 proteins facilitate acute tolerance to mu-opioid effects. Eur. J. Neurosci. 13(4): 801-11.

Garzón J., Rodríguez-Muñoz M., López-Fando A., García-España A., Sánchez-Blázquez P. (2004). RGSZ1 and GAIP regulate mu- but not delta-opioid receptors in mouse CNS: role in tachyphylaxis and acute tolerance. Neuropsychopharmacol. 29(6): 1091-104.

Garzón J., Rodríguez-Muñoz M., López -Fando A., Sánchez-Blázquez P. (2005,  $\gamma$ ). Activation of mu-opioid receptors transfers control of Galpha subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization. J. Biol. Chem. 280(10): 8951-60.

Garzón J., Rodríguez-Muñoz M., de la Torre-Madrid E., Sánchez-Blázquez P. (2005,  $\alpha$ ). Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS. Psychopharmacol. (Berl). 180(1): 1-11.

Garzón J., Rodríguez-Muñoz M., Sánchez-Blázquez P. (2005,  $\beta$ ). Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. Neuropharmacol. 48(6): 853-68.

Georganta E.M., Agalou A., Georgoussi Z. (2010). Multi-component signaling complexes of the delta-opioid receptor with STAT5B and G proteins. Neuropharmacol. 59(3): 139-48.

George S., Fan T., Zhidong X., Tse R., Tam V., Varghese G., O'Dowd B.F (2000). Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors, generation of novel functional properties. J. Biol. Chem. 275: 26128-35.

Georgoussi Z. (2008). Novel interacting partners regulating opioid receptor signalling. Chapter 6 in Ciruela F. and Lujan R. (Eds.) "Molecular aspects of G protein coupled receptors: interacting proteins and function". Nova Science Publishers, pp 169-207.

Georgoussi Z., Carr C., Milligan G. (1993). Direct measurements of in situ interactions of rat brain opioid receptors with the guanine nucleotide-binding protein Go. Mol. Pharmacol. 44(1): 62-9.

Georgoussi Z., Leontiadis L., Mazarakou G., Merkouris M., Hyde K. and Hamm H. (2006). Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. Cell. Signal. 18(6): 771-82.

Georgoussi Z., Merkouris M., Mullaney I., Megaritis G., Carr C., Zioudrou C. and Milligan G. (1997). Selective interactions of mu-opioid receptors with pertussis toxinsensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling. Biochim. Biophys. Acta 1359: 263-74. Georgoussi Z., Milligan G., Zioudrou C. (1995). Immunoprecipitation of opioid receptor-Go-protein complexes using specific GTP-binding-protein antisera. Biochem. J. 306(Pt 1): 71-5.

Gether U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein coupled receptors. Endocr. Rev. 21: 90-113.

Ghavami A., Hunt R.A., Olsen M.A., Zhang J., Smith D.L., Kalgaonkar S., Rahman Z., Young K.H. (2004). Differential effects of regulator of G protein signaling (RGS) proteins on serotonin 5-HT1A, 5-HT2A, and dopamine D2 receptor-mediated signaling and adenylyl cyclase activity. Cell. Signal. 16(6): 711-21.

Gilchrist A., Bünemann M., Li A., Hosey M.M., Hamm H.E. (1999). A dominantnegative strategy for studying roles of G proteins in vivo. J. Biol. Chem. 274(10): 6610-6.

Gilchrist A., Vanhauwe J., Li A., Thomas T., Voyno-Yasenetskaya T., Hamm H.E. (2001). G $\alpha$  minigenes expressing C-terminal peptides serve as specific inhibitors of thrombin-mediated endothelial activation. J. Biol. Chem. 276: 25672-9.

Gilman A.G. (1987). G protein: Transducers of Receptor-Generated signals. Ann. Rev. Biochem. 56: 615-49.

Gold S.J., Han M.H., Herman A.E., Ni Y.G., Pudiak C.M., Aghajanian G.K., Liu R.J., Potts B.W., Mumby S.M., Nestler E.J. (2003). Regulation of RGS proteins by chronic morphine in rat locus coeruleus. Eur. J. Neurosci. 17(5): 971-80.

Gold S.J., Hoang C.V., Potts B.W., Porras G., Pioli E., Kim K.W., Nadjar A., Qin C., LaHoste G.J., Li Q., Bioulac B.H., Waugh J.L., Gurevich E., Neve R.L., Bezard E. (2007). RGS9-2 negatively modulates L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. J. Neurosci. 27(52): 14338-48.

Gold S.J., Ni Y.G., Dohlman H.G., Nestler E.J. (1997). Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. J. Neurosci. 17: 8024-37.

Gonzalez-Nicolini V., McGinty J.F. (2002). Gene expression profile from the striatum of amphetamine-treated rats: a cDNA array and in situ hybridization histochemical study. Brain Res. Gene Expr. Patterns 1(3-4): 193-8.

Grillet N., Pattyn A., Contet C., Kieffer B.L., Goridis C., Brunet J.F. (2005). Generation and characterization of Rgs4 mutant mice. Mol. Cell Biol. 25(10): 4221-8.

Guo J., Wu Y., Zhang W., Zhao J., Devi L.A., Pei G., Ma L. (2000). Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation. Mol. Pharmacol. 58(5): 1050-6.

Gutkind J.S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. J. Biol. Chem. 273: 1839-42.

Hague C., Bernstein L.S., Raminemi S., Chen Z., Minneman K.P., Hepler J.R. (2005). Selective inhibition of alpha1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. J. Biol. Chem. 280: 27289-95.

Hall R.A., Premont R.T., Lefkowitz R.J. (1999). Heptahelical receptor signalling: Beyond the G protein paradigm. J. Cell Biol. 145: 927-32.

Hamm H.E. (1998). The Many Faces of G Protein Signaling J. Biol. Chem. 273: 669-72.

Hamm H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(9): 4819-21.

Hamm H.E. and Gilchrist A. (1996). Heterotrimeric G proteins. Curr. Opin. Cell. Biol. 8(2): 189-96.

Han M.H., Renthal W., Ring R.H., Rahman Z., Psifogeorgou K., Howland D., Birnbaum S., Young K., Neve R., Nestler E.J., Zachariou V. (2010). Brain region specific actions of regulator of G protein signaling 4 oppose morphine reward and dependence but promote analgesia. Biol. Psychiatry 67(8): 761-9.

Hart M.J., Jiang X., Kozasa T., Roscoe W., Singer W.D., Gilman A.G., Sternweis P.C. Bollag G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. Science 280: 2112-4.

Hawes B., Luttrel L.M., Exum S.T., Lefkowitz R.J. (1994). Inhibition of G Proteincoupled Receptor Signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptor. J. Biol. Chem. 269: 15776-85.

He L., Fong J., von Zastrow M., Whistler J.L. (2002). Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. Cell 108(2): 271-82.

Henderson G. and McKnight A.T. (1997). The orphan opioid receptor and its endogenous ligand – nociceptin/orphanin FQ. Trends Pharmacol. Sci. 18(8): 293-300.

Hepler J.R. (1999). Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. Trends Pharmacol. Sci. 20: 376-82.

Hepler J.R., Berman D.M., Gilman A.G., Kozasa T. (1997). RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 428-32.

Hepler J.R. and Gilman A.G. (1992). G proteins. Trends Biochem. Sci. 17: 383-7.

Heuss C. and Gerber U. (2000). G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. Trends Neurosci. 23: 469-75.

Heximer S.P., Knutsen R.H., Sun X., Kaltenbronn K.M., Rhee M.H., Peng N., Oliveirados-Santos A., Penninger J.M., Muslin A.J., Steinberg T.H., Wyss J.M., Mecham R.P., Blumer K.J. (2003). Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2deficient mice. J. Clin. Invest. 111(4): 445-52.

Heximer S.P., Watson N., Linder M.E., Blumer K.J., Hepler J.R. (1997). RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(26): 14389-93.

Hollinger S. and Hepler J.R (2002). Cellular Regulation of RGS proteins: Modulators and integrators of G protein signaling. Pharmacol. Rev. 54: 552-9.

Hu L.A., Chen W., Martin N.P., Whalen E.J., Premont R.T., Lefkowitz R.J. (2003). GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation. J. Biol. Chem. 278(28): 26295-301

Hu G. and Wensel T.G. (2002). R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(15): 9755-60.

Hu Y., Xing J., Chen L., Guo X., Du Y., Zhao C., Zhu Y., Lin M., Zhou Z., Sha J. (2008). RGS22, a novel testis-specific regulator of G-protein signaling involved in human and mouse spermiogenesis along with GNA12/13 subunits. Biol. Reprod. 79(6): 1021-9.

Ikeda S.R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. Nature 380: 255-8.

Ikeda K., Kobayashi T., Kumanishi T., Yano R., Sora I., Niki H. (2002). Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? Neurosci. Res. 44(2): 121-131.

Inanobe A., Morishige K., Takahashi N., Ito H., Yamada M., Takumi T., Nishina H., Takahashi K., Kanaho Y., Katada T., Kurachi Y. (1995). G beta gamma directly binds to the carboxyl terminus of the G protein-gated muscarinic  $K^+$  channel, GIRK1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 212, 1022-1028.

Ingi T., Krumins A.M., Chidiac P., Brothers G.M. Chung S., Snow B.E., Barnes C.A., Lanahan A.A., Siderovski D.P., Ross E.M., Gilman A.G., Worley P.F. (1998). Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. J. Neurosci. 18: 7178-88.

Ippolito D.L., Temkin P.A., Rogalski S.L., Chavkin C. (2002). N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. J. Biol. Chem. 277(36): 32692-6.

Ishii M., Fujita S., Yamada M., Hosaka Y., Kurachi Y. (2005). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and  $Ca^{2+}$ /calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action. Biochem. J. 385(Pt 1): 65-73.

Ishii M., Inanobe A., Kurachi Y. (2002). PIP3 inhibition of RGS protein and its reversal by Ca2+/calmodulin mediate voltage-dependent control of the G protein cycle in a cardiac K+ channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(7): 4325-30.

Itoh M., Nagatomo K., Kubo Y., Saitoh O. (2006). Alternative splicing of RGS8 gene changes the binding property to the M1 muscarinic receptor to confer receptor type-specific Gq regulation. J. Neurochem. 99(6): 1505-16.

Jaen C. and Doupnik C.A. (2006). RGS3 and RGS4 differentially associate with G protein-coupled receptor-Kir3 channel signaling complexes revealing two modes of RGS modulation. Precoupling and collision coupling. J. Biol. Chem. 281: 34549-60.

Jean-Baptiste G., Yang Z., Greenwood M.T. (2006). Regulatory mechanisms involved in modulating RGS function. Cell. Mol. Life Sci. 63(17): 1969-85.

Jeanneteau F., Diaz J., Sokoloff P., Griffon N. (2004,  $\alpha$ ). Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors. Mol. Biol. Cell 15(2): 696-705.

Jeanneteau F., Guillin O., Diaz J., Griffon N., Sokoloff P. (2004, β). GIPC recruits GAIP (RGS19) to attenuate dopamine D2 receptor signaling. Mol. Biol. Cell 15: 4926-37.

Jeong S.W. and Ikeda S.R. (2000). Endogenous regulator of G-protein signaling proteins modify N-type calcium channel modulation in rat sympathetic neurons. J. Neurosci. 20(12): 4489-96.

Jeong S.W. and Ikeda S.R. (2001). Differential regulation of G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channel kinetics by distinct domains of RGS8. J. Physiol. 535(Pt 2): 335-47.

Jin Y., Zhong H., Omnaas J.R., Neubig R.R., Mosberg H.I. (2004). Structure-based design, synthesis, and activity of peptide inhibitors of RGS4 GAP activity. Methods Enzymol. 389: 266-77.

Johansson B.B., Minsaas L., Aragay A.M. (2005). Proteasome involvement in the degradation of the G(q) family of Galpha subunits. FEBS J. 272(20): 5365-77.

Jones T.L. (2004). Role of palmitoylation in RGS protein function. Methods Enzymol. 389: 33-55.

Jones M.B., Siderovski D.P., Hooks S.B. (2004). The G betagamma dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention. Mol. Interv. 4(4): 200-14.

Jordan B.A. and Devi L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. Nature 399: 697-700. Jordan B.A., Gomes I., Rios C., Filipovska J., Devi L.A. (2003). Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. Mol. Pharmacol. 64(6): 1317-24.

Jordan B.A., Trapaidze N., Gomes I., Nivarthi R., Devi L.A. (2001). Oligomerization of opioid receptors with  $\beta$ 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(1): 343-8.

Kammermeier P.J., Ruiz-Velasco V., Ikeda S.R. (2000). A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. J. Neurosci. 20(15): 5623-9.

Kane B.E., Svensson B., Ferguson D.M. (2006). Molecular recognition of opioid receptor ligands. AAPS J. 8(1): E126-37.

Kelleher D.J and Johnson G.L. (1988). Transducin inhibition of light-dependent rhodopsin phosphorylation: evidence for beta gamma subunit interaction with rhodopsin. Mol. Pharmacol. 34(4): 452-60.

Kenakin T.P. (2006). Pharmacological assay formats: Binding, in: Kenakin T.P. (Ed.), "A Pharmacology Primer: Theory, Applications and Methods" (2<sup>nd</sup> edition). Academic Press, Elsevier Inc., pp. 59-77.

Kieffer B.L, Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Hirth C.G. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA clone by expression cloning and pharmacological characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 12048-52.

Kimple R.J., De Vries L., Tronchère H., Behe C.I., Morris R.A., Gist Farquhar M., Siderovski D.P. (2001). RGS12 and RGS14 GoLoco motifs are G alpha(i) interaction sites with guanine nucleotide dissociation inhibitor Activity. J. Biol. Chem. 276(31): 29275-81.

Kino T., Tiulpakov A., Ichijo T., Chheng L., Kozasa T., Chrousos G.P. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. J. Cell. Biol. 169(6): 885-96.

Ko J.K., Choi K.H., Kim I.S., Jung E.K., Park D.H. (2001). Inducible RGS2 is a crosstalk regulator for parathyroid hormone signaling in rat osteoblast-like UMR106 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287(4): 1025-33. Koelle M.R. and Horvitz H.R. (1996). EGL-10 regulates G protein signaling in the C. elegans nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. Cell 84: 115-25.

Kovoor A., Nappey V., Kieffer B.L., Chavkin C. (1997). Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 272(44): 27605-11.

Kovoor A., Seyffarth P., Ebert J., Barghshoon S., Chen C.K., Schwarz S., Axelrod J.D., Cheyette B.N., Simon M.I., Lester H.A., Schwarz J. (2005). D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RGS9-2) via the RGS9 DEP domain, and RGS9 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways. J. Neurosci. 25(8): 2157-65.

Kramer H.K., Andria M.L., Kushner S.A., Esposito D.H., Hiller J.M., Simon E.J. (2000). Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation. Brain Res. Mol. Brain Res. 79(1-2): 55-66.

Kroeger K.M., Pfleger K.D., Eidne K.A. (2004). G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. Front. Neuroendocrinol. 24(4): 254-78.

Krupnick J.G. and Benovic J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein coupled receptor regulation Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38: 289-319.

Langer I., Tikhonova I.G., Boulègue C., Estève J.P., Vatinel S., Ferrand A., Moroder L., Robberecht P., Fourmy D. (2009). Evidence for a direct and functional interaction between the regulators of G protein signaling-2 and phosphorylated C terminus of cholecystokinin-2 receptor. Mol. Pharmacol.. 75(3): 502-13.

Laugwitz K.L., Offermanns S., Spicher K. Schultz G. (1993). mu and delta opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Neuron 10: 233-42.

Law P.Y., Wong Y.H., Loh H.H. (1999). Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors. Biopolymers 51: 440-55.

Law P.Y., Wong Y.H., Loh H.H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 389-430.

Law S.F. and Reisine T. (1997). Changes in the association of G protein subunits with the cloned mouse delta opioid receptor on agonist stimulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 281(3): 1476-86.

Lefkowitz R.J. and Shenoy S.K. (2005). Transduction of receptor signals by betaarrestins. Science 308(5721): 512-7. Leone A.M., Errico M., Lin S.L., Cowen D.S. (2000). Activation of extracellular signalregulated kinase (ERK) and Akt by human serotonin 5-HT(1B) receptors in transfected BE(2)-C neuroblastoma cells is inhibited by RGS4. J. Neurochem. 75: 934-938.

Levitt P., Ebert P., Mirnics K., Nimgaonkar V.L., Lewis D.A. (2006). Making the case for a candidate vulnerability gene in schizophrenia: Convergent evidence for regulator of G-protein signaling 4 (RGS4). Biol. Psychiatry 60(6): 534-7.

Levitzki A. and Klein S. (2002). G-protein subunit dissociation is not an integral part of G-protein action. Chembiochem. 3(9):815-8.

Li J.G., Benovic J.L., Liu-Chen L.Y. (2000). Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. Mol. Pharmacol. 58(4): 795-801.

Li J.G., Chen C., Liu-Chen L.Y. (2002). Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein- $50/Na^+/H^+$  exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate. J. Biol. Chem. 277(30): 27545-52.

Liu Z. and Fisher R.A. (2004). RGS6 interacts with DMAP1 and DNMT1 and inhibits DMAP1 transcriptional repressor activity. J. Biol. Chem. 279(14): 14120-8.

Liu Z, Chatterjee TK, Fisher RA. (2002). RGS6 interacts with SCG10 and promotes neuronal differentiation. Role of the G gamma subunit-like (GGL) domain of RGS6. J. Biol. Chem. 277(40): 37832-9.

Lord J.A., Waterfield A.A., Hughes J., Kosterlitz H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. Nature 267: 495-9.

Lou X., Yano H., Lee F., Chao M.V., Farquhar M.G. (2001). GIPC and GAIP form a complex with TrkA: a putative link between G protein and receptor tyrosine kinase pathways. Mol. Biol. Cell 12(3): 615-27.

Lu Z.L., Saldanha J.W., Hulme E.C. (2002). Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. Trends Pharmacol. Sci. 23(3): 140-6.

Luttrell L.M. (2008). Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. Mol. Biotechnol. 39(3): 239-64.

Luttrell L.M., Ostrowsky J., Cotecchia, S., Kendall H., Lefkowitz, R.J. (1993). Antagonism of catecholamine receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptors. Science 259: 1453-7.

Maggio R., Vogel Z., Wess J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptor provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(7): 3103-7.

Mahon M.J., Bonacci T.M., Divieti P., Smrcka A.V. (2006). A docking site for G protein betagamma subunits on the parathyroid hormone 1 receptor supports signaling through multiple pathways. Mol. Endocrinol. 20(1): 136-46.

Mansson E., Bare L., Yang D., (1994). Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202: 1431-7.

Martemyanov K.A., Yoo P.J., Skiba N.P., Arshavsky V.Y. (2005). R7BP, a novel neuronal protein interacting with RGS proteins of the R7 family. J. Biol. Chem. 280(7): 5133-6.

Martin W.R. (1979). History and development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists. Br. J. Clin. Pharmacol. 7, Suppl 3: 273S-279S.

Mazarakou G. and Georgoussi Z. (2005). STAT5A interacts with and is phosphorylated upon activation of the mu-opioid receptor. J. Neurochem. 93(4): 918-31.

Mazzoni M.R., Malinski J.A., Hamm H.E (1991). Structural analysis of rod GTP-binding protein, Gt. Limited proteolytic digestion pattern of Gt with four proteases defines monoclonal antibody epitope. J. Biol.Chem. 266: 14072-81.

McCudden C.R., Hains M.D., Kimple R.J., Siderovski D.P. Willard F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. Cell. Mol. Life Sci. 62(5): 551-77.

McVey M., Ramsay D., Kellett E., Rees S., Wilson S., Pope A.J., Milligan G. (2001). Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta-opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. J. Biol. Chem. 276(17): 14092-9.

Megaritis G., Merkouris M., Georgoussi Z. (2000). Functional domains of delta- and muopioid receptors responsible for adenylyl cyclase inhibition. Receptors Channels 7: 199-212.

Melliti K., Meza U., Adams B. (2000). Muscarinic stimulation of alpha1E Ca channels is selectively blocked by the effector antagonist function of RGS2 and phospholipase C-beta1. J. Neurosci. 20: 7167-73.

Melliti K., Meza U., Adams B.A. (2001). RGS2 blocks slow muscarinic inhibition of N-type Ca(2+) channels reconstituted in a human cell line. J. Physiol. 532(Pt 2): 337-47.

Merkouris M., Dragatsis I., Megaritis G., Konidakis G., Zioudrou C., Milligan G. and Georgoussi Z. (1996). Identification of the critical domains of the delta-opioid receptor involved in G protein coupling using site-specific synthetic peptides. Mol. Pharmacol. 50: 985-93.

Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monsarrat B., Mazarguil H., Vassart G., Parmentier M., Costentin J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature. 377: 532-5.

Milligan G. (2000). Neurobiology. Enhanced: Receptors as Kissing Cousins. Science 288: 65-7.

Milligan G. (2004). G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. Mol. Pharmacol. 66(1): 1-7.

Milligan G. (2005). Opioid receptors and their interacting proteins. Neuromolecular Med. 7(1-2): 51-9.

Milligan G. (2008). A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. Br. J. Pharmacol. 153, Suppl 1: S216-29.

Milligan G. and Kostenis E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. Br. J. Pharmacol. 147, Suppl 1: S46-55.

Mirnics K., Middleton F.A., Stanwood G.D., Lewis D.A., Levitt P. (2001). Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. Mol. Psychiatry. 6(3): 293-301.

Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., Meunier J.C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. FEBS Lett. 341: 33-8.

Moratz C., Harrison K., Kehrl J.H. (2004). Role of RGS proteins in regulating the migration of B lymphocytes. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 52(1): 27-35.

Moratz C., Kang V.H., Druey K.M., Shi C.S., Scheschonka A., Murphy P.M., Kozasa T., Kehrl J.H. (2000). Regulator of G protein signaling 1 (RGS1) markedly impairs Gi alpha signaling responses of B lymphocytes. J. Immunol. 164(4): 1829-38.

Morou E. and Gergoussi Z. (2005). Expression of the third intracellular loop of the deltaopioid receptor inhibits signaling by opioid receptors and other G protein-coupled receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 315(3): 1368-79. Nakagawa T., Minami M., Satoh M. (2001). Up-regulation of RGS4 mRNA by opioid receptor agonists in PC12 cells expressing cloned mu- or kappa- opioid receptors. Eur. J. Pharmacol. 433(1): 29-36.

Neer E.J. (1995). Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80: 249-257.

Neitzel K.L. and Hepler J.R. (2006). Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling. Semin. Cell. Dev. Biol. 17: 383-9.

Neubig R.R. and Siderovski D.P. (2002). Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. Nat. Rev. Drug Discov. 1(3): 187-97.

Ni Y.G., Gold S.J., Iredale P.A., Terwilliger R.Z., Duman R.S., Nestler E.J. (1999). Region-specific regulation of RGS4 (Regulator of G-protein-signaling protein type 4) in brain by stress and glucocorticoids: in vivo and in vitro studies. J. Neurosci. 19(10): 3674-80.

Nixon A.B., Grenningloh G., Casey P.J. (2002). The interaction of RGSZ1 with SCG10 attenuates the ability of SCG10 to promote microtubule disassembly. J. Biol. Chem. 277(20): 18127-33.

Offermanns S. and Simon M.I. (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple to a wide variety of receptors to phospholipase C. J. Biol. Chem. 270: 15175-80.

Ogier-Denis E., Pattingre S., El Benna J., Codogno P. (2000). Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. J. Biol. Chem. 275(50): 39090-5.

Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science. 289:739-45.

Pan L., Xu J., Yu R., Xu M.M., Pan Y.X., Pasternak G.W. (2005). Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm. Neuroscience 133(1): 209-20.

Parenty G., Appelbe S., Milligan G. (2008). CXCR2 chemokine receptor antagonism enhances DOP opioid receptor function via allosteric regulation of the CXCR2-DOP receptor heterodimer. Biochem. J. 412(2): 245-56.

Pasternak G.W. (2001). Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. Life Sci. 68: 2213-9.

Pasternak G.W. (2005). Molecular biology of opioid analgesia. J. Pain. Symptom Manage. 29(5 Suppl): S2-9.

Pei G., Kieffer B.L., Lefkowitz R.J., Freedman N.J. (1995). Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. Mol. Pharmacol. 48: 173-7.

Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz R.J. (1998). G protein-coupled Receptor Kinases. Annu. Rev. Biochem. 67: 653-92.

Popov S.G., Krishna U.M., Falck J.R., Wilkie T.M. (2000). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin reverses phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-dependent inhibition of regulators of G protein-signaling GTPase-activating protein activity. J. Biol. Chem. 275(25): 18962-8.

Popov S., Yu K., Kozasa T., Wilkie T.M. (1997). The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7216-20.

Probst W.C., Snyder L.A., Schuster D.I., Brosius J., Sealfon S.C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. DNA Cell. Biol. 11(1): 1-20.

Psifogeorgou K., Papakosta P., Russo S.J., Neve R.L., Kardassis D., Gold S.J., Zachariou V. (2007). RGS9-2 is a negative modulator of mu-opioid receptor function. J. Neurochem. 103(2): 617-25.

Quock R.M., Burkey T.H., Varga E, Hosohata Y., Hosohata K., Cowell S.M., Slate C.A., Ehlert F.J., Roeske W.R., Yamamura H.I. (1999). The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. Pharmacol. Rev. 51(3): 503-32.

Rahman Z., Gold S.J., Potenza M.N., Cowan C.W., Ni Y.G., He W., Wensel T.G., Nestler E.J. (1999). Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene. J. Neurosci. 19(6): 2016-26.

Rahman Z., Schwarz J., Gold S.J., Zachariou V., Wein M.N., Choi K.H., Kovoor A., Chen C.K., DiLeone R.J., Schwarz S.C., Selley D.E., Sim-Selley L.J., Barrot M., Luedtke R.R., Self D., Neve R.L., Lester H.A., Simon M.I., Nestler E.J. (2003). RGS9 modulates dopamine signaling in the basal ganglia. Neuron .38(6): 941-52.

Rebois R.V. and Hébert T.E. (2003). Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. Receptors Channels 9(3): 169-94.

Richman R.W., Strock J., Hains M.D., Cabanilla N.J., Lau K.K., Siderovski D.P., Diversé-Pierluissi M. (2005). RGS12 interacts with the SNARE-binding region of the Cav2.2 calcium channel. J. Biol. Chem. 280(2): 1521-8.

Rios C., Gomes I., Devi L.A. (2006). Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. Br. J. Pharmacol. 148(4): 387-95.

Roman D.L., Blazer L.L., Monroy C.A., Neubig R.R. (2010). Allosteric inhibition of the regulator of G protein signaling-Galpha protein-protein interaction by CCG-4986. Mol. Pharmacol. 78(3): 360-5.

Roman D.L., Talbot J.N., Roof R.A., Sunahara R.K., Traynor J.R., Neubig R.R. (2007). Identification of small-molecule inhibitors of RGS4 using a high-throughput flow cytometry protein interaction assay. Mol. Pharmacol. 71(1): 169-75.

Ross E.M. and Wilkie T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G-protein signalling (RGS) and RGS-like proteins. Annu. Rev Biochem. 69: 795-827.

Rothman R.B., France C.P., Bykov V., De Costa B.R., Jacobson A.E., Woods J.H., Rice K.C. (1989). Pharmacological activities of optically pure enantiomers of the kappa opioid agonist, U50,488, and its cis diastereomer: evidence for three kappa receptor subtypes. Eur. J. Pharmacol. 167(3): 345-53.

Roy A.A., Baragli A., Bernstein L.S., Hepler J.R., Hebert T.E., Chidiac P. (2006). RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. Cell. Signal. 18: 336-48.

Roy A.A., Lemberg K.E., Chidiac P. (2003). Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions. Mol. Pharmacol. 64(3): 587-93.

Rubenzik M., Varga E., Stropova D., Roeske W.R., Yamamura H.I. (2001). Expression of alpha-transducin in Chinese hamster ovary cells stably transfected with the human delta-opioid receptor attenuates chronic opioid agonist-induced adenylyl cyclase superactivation. Mol. Pharmacol. 60(5): 1076-82.

Sadana R. and Dessauer C.W. (2009). Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. Neurosignals 17(1): 5-22.

Saitoh O., Kubo Y., Miyatani Y., Asano T., Nakata H. (1997). RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of  $K^+$  currents. Nature 390: 525-9.

Salim S., Sinnarajah S., Kehrl J.H., Dessauer C.W. (2003). Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. J. Biol. Chem. 278(18): 15842-9.

Sanders R.D., Brian D., Maze M. (2008). G-protein-coupled receptors. Handb. Exp. Pharmacol. (182):93-117.

Sarrouilhe D., di Tommaso A., Métayé T., Ladeveze V. (2006). Spinophilin: from partners to functions. Biochimie. 88(9): 1099-113.

Sato M., Cismowski M.J., Toyota E., Smrcka A.V., Lucchesi P.A., Chilian W.M., Lanier S.M. (2006). Identification of a receptor-independent activator of G protein signaling (AGS8) in ischemic heart and its interaction with Gbetagamma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(3): 797-802.

Saugstad J.A., Marino M.J., Folk J.A., Hepler J.R., Conn P.J. (1998). RGS4 inhibits signaling by group I metabotropic glutamate receptors. J. Neurosci. 18(3): 905-13.

Schiff M.L., Siderovski D.P., Jordan J.D., Brothers G., Snow B., De Vries L., Ortiz D.F., Diversé-Pierluissi M. (2000). Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. Nature 408(6813): 723-7.

Schwendt M. and McGinty J.F. (2007). Regulator of G-protein signaling 4 interacts with metabotropic glutamate receptor subtype 5 in rat striatum: relevance to amphetamine behavioral sensitization. J. Pharmacol. Exp. Ther. 323(2): 650-7.

Sharma S.K., Nirenberg M., Klee W.A. (1975). Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72(2): 590-4.

Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB J. 16(8): 869-71.

Shi C.S., Lee S.B., Sinnarajah S., Dessauer C.W., Rhee S.G., Kehrl J.H. (2001). Regulator of G-protein signaling 3 (RGS3) inhibits Gbeta1gamma2-induced inositol phosphate production, mitogen-activated protein kinase activation, and Akt activation. J. Biol. Chem. 276(26): 24293-300.

Siderovski D.P., Hessel A., Chung S., Mak T.W., Tyers M. (1996). A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? Curr. Biol. 6: 211-2.

Siderovski D.P., Strockbine B., Behe C.I. (1999). Whither goest the RGS proteins? Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 34(4): 215-51.

Siderovski D.P. and Willard F.S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. Int. J. Biol. Sci. 1(2): 51-66.

Sierra D.A., Popov S. Wilkie T.M. (2000). Regulators of G-protein signaling in receptor complexes. Trends Cardiovasc. Med. 10: 263-8.

Sinnarajah S., Dessauer C.W., Srikumar D., Chen J., Yuen J., Yilma S., Dennis J.C., Morrison E.E., Vodyanoy V., Kehrl J.H. (2001). RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. Nature 409(6823): 1051-5.

Sjögren B., Blazer L.L., Neubig R.R. (2010). Regulators of G protein signaling proteins as targets for drug discovery. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 91: 81-119.

Smrcka A.V. (2008). G protein betagamma subunits: central mediators of G proteincoupled receptor signaling. Cell. Mol. Life Sci. 65(14): 2191-214.

Snow B.E., Antonio L., Suggs S., Gutstein H.B., Siderovski D.P. (1997). Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14. Biochem. Biophys. Res. Commun. 233(3): 770-7.

Snow B.E., Hall R.A., Krumins A.M., Brothers G.M., Bouchard D., Brothers C.A., Chung S., Mangion J., Gilman A.G., Lefkowitz R.J., Siderovski D.P. (1998). GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain. J. Biol. Chem. 273: 17749-55.

Snyder J.T., Worthylake D.K., Rossman K.L., Betts L., Pruitt W.M., Siderovski D.P., Der C.J., Sondek J. (2002). Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. Nat. Struct. Biol. 9(6): 468-75.

Sondek J., Lambright D.G., Noel J.P., Hamm H.E., Sigler P.B. (1994). GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Nature 372(6503): 276-9.

Spiegelberg B.D. and Hamm H.E. (2005). G betagamma binds histone deacetylase 5 (HDAC5) and inhibits its transcriptional co-repression activity. J. Biol. Chem. 280(50): 41769-76.

Srinivasa S.P., Bernstein L.S., Blumer K.J., Linder M.E. (1998). Plasma membrane localization is required for RGS4 function in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5584-9.

Standifer K.M. and Pasternak G.W. (1997). G proteins and opioid receptor-mediated signaling. Cell. Signal. 9: 237-48.

Strada S.J., Duman R.S., Enna S.J. (1990). Analysis of Neurotransmitter Receptor-Coupled Cyclic Nucleotide Systems: Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate and Adenylate Cyclase, in: Yamamura H.I., Enna S.J., Kuhar M.J. (Eds.), "Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis". Raven Press Ltd., pp. 89-110.

Sunahara R.K. and Taussig R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. Mol. Interv. 2(3): 168-84.

Tang T., Kiang J.G., Côté T.E., Cox B.M. (1995). Antisense oligodeoxynucleotide to the Gi2 protein alpha subunit sequence inhibits an opioid-induced increase in the intracellular free calcium concentration in ND8-47 neuroblastoma x dorsal root ganglion hybrid cells. Mol. Pharmacol. 48(2): 189-93.

Tang W.X., Fasulo W.H., Mash D.C., Hemby S.E. (2003). Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. J. Neurochem. 85(4): 911-24.

Taylor J., Jacob-Mosier G., Lawton R.G., Remmers A., Neubig R. (1994). Binding of an alpha2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. J. Biol. Chem. 269: 27618-24.

Tempel A. and Zukin R.S. (1987). Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(12): 4308-12.

Tesmer J.J., Berman D.M., Gilman A.G., Sprang S.R. (1997). Structure of RGS4 bound to  $AlF_4^-$ -activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. Cell 89: 251-61.

Thompson D., Pusch M., Whistler J.L. (2007). Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. J. Biol. Chem. 282(40): 29178-85.

Torregrossa M.M., Jutkiewicz E.M., Mosberg H.I., Balboni G., Watson S.J., Woods J.H. (2006). Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. Brain Res. 1069(1): 172-81.

Tseng C.C. and Zhang X.Y. (1998). Role of regulator of G protein signaling in desensitization of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor. Endocrinology 139(11): 4470-5.

Tsu R.C., Chan J.S., Wong Y.H. (1995). Regulation of multiple effectors by the cloned delta-opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase. J. Neurochem. 64(6): 2700-7.

Tu Y., Woodson J., Ross E.M. (2001). Binding of regulator of G protein signaling (RGS) proteins to phospholipid bilayers. Contribution of location and/or orientation to GTPase-activating protein activity. J. Biol. Chem. 276(23): 20160-6.

Ulens C., Daenens P., Tytgat J. (2000). Changes in GIRK1/GIRK2 deactivation kinetics and basal activity in the presence and absence of RGS4. Life Sci. 67(19):2305-17.

Urban J.D., Clarke W.P., von Zastrow M., Nichols D.E., Kobilka B., Weinstein H., Javitch J.A., Roth B.L., Christopoulos A., Sexton P.M., Miller K.J., Spedding M.,

Mailman R.B. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. J. Pharmacol. Exp. Ther. 320(1): 1-13.

van Rijn R.M., Whistler J.L, Waldhoer M. (2010). Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. Curr. Opin. Pharmacol. 10(1): 73-9.

Varga E.V., Navratilova E., Stropova D., Jambrosic J., Roeske W.R., Yamamura H.I. (2004). Agonist-specific regulation of the delta-opioid receptor. Life Sci. 76(6):599-612.

Vilardaga J.P., Nikolaev V.O., Lorenz K., Ferrandon S., Zhuang Z., Lohse M.J. (2008). Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. Nat. Chem. Biol. 4(2): 126-31.

Waldhoer M., Bartlett S.E., Whistler J.L. (2004). Opioid receptors. Ann. Rev. Biochem. 73: 953-90.

Wang D., Sadee W., Quillan J.M. (1999). Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors. J. Biol. Chem. 274(31): 22081-8.

Wang D., Tolbert L.M., Carlson K.W., Sadée W. (2000). Nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin translocation activated by mu-opioid (OP3) receptor. J. Neurochem. 74(4): 1418-25.

Wang J., Ducret A., Tu Y., Kozasa T., Aebersold R., Ross, E.M. (1998). RGSZ1, a Gzselective RGS protein in brain. Structure, membrane association, regulation by Galphaz phosphorylation, and relationship to a Gz GTPase-activating protein subfamily. J. Biol. Chem. 273: 26014-25.

Wang J., Tu Y., Woodson J., Song X., Ross E.M. (1997). A GTPase-activating protein for the G protein Galphaz. Identification, purification and mechanism of action. J. Biol. Chem. 272(9): 5732-40.

Wang L., Sunahara R.K., Krumins A., Perkins G., Crochiere M.L., Mackey M., Bell S., Ellisman M.H., Taylor S.S. (2001). Cloning and mitochondrial localization of full-length D-AKAP2, a protein kinase A anchoring protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(6): 3220-5.

Wang Q., Liu M., Kozasa T., Rothstein J.D., Sternweis P.C., Neubig R.R. (2004,  $\alpha$ ). Thrombin and lysophosphatidic acid receptors utilize distinct rhoGEFs in prostate cancer cells. J. Biol. Chem. 279(28): 28831-4.

Wang Q., Liu M., Mullah B., Siderovski D.P., Neubig R.R. (2002). Receptor-selective effects of endogenous RGS3 and RGS5 to regulate mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 277(28): 24949-58.

Wang Q., Zhao J., Brady A.E., Feng J., Allen P.B., Lefkowitz R.J., Greengard P., Limbird L.E. (2004,  $\beta$ ). Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. Science 304(5679): 1940-4.

Wang X., Zeng W., Soyombo A.A., Tang W., Ross E.M., Barnes A.P., Milgram S.L., Penninger J.M., Allen P.B., Greengard P., Muallem S. (2005). Spinophilin regulates  $Ca^{2+}$  signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. Nat. Cell Biol. 7: 405-11.

Watson N., Linder M.E., Druey K.M., Kehrl J.H. Blumer K.J. (1996). RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. Nature 383: 172-5.

Wess J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. Pharmacol. Ther. 80: 231-64.

Whistler J.L., Enquist J., Marley A., Fong J., Gladher F., Tsuruda P., Murray S.R., Von Zastrow M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. Science 297(5581): 615-20.

Wilkie T.M. (2000). G-protein signalling: satisfying the basic necessities of life. Curr. Biol. 10: R853-856.

Williams J.T., Christie M.J., Manzoni O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. Physiol. Rev. 81(1): 299-343.

Wittig I. and Schägger H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. Proteomics 5(17): 4338-46.

Wong Y.H. (1994). Gi assays in transfected cells. Methods Enzymol. 238: 81-94.

Wu G., Benovic J.L., Hildebrandt J.D., Lanier S.M. (1998). Receptor docking sites for Gprotein betagamma subunits. Implications for signal regulation. J. Biol. Chem. 273: 7197-200.

Wu G., Bogatkevich S., Mukhin Y.V., Benovic J.L., Hildebrandt J.D., Lanier S.M. (2000). Identification of  $G\beta\gamma$  binding sites in the third intracellular loop of the M3-muscarinic receptor and their role in receptor regulation. J. Biol. Chem. 275(12): 9026-34.

Wu H.K., Heng H.H., Shi X.M., Forsdyke D.R., Tsui L.C., Mak T.W., Minden M.D., Siderovski D.P. (1995). Differential expression of a basic helix-loop-helix phosphoprotein gene, G0S8, in acute leukemia and localization to human chromosome 1q31. Leukemia 9(8): 1291-8.

Xie G.X. and Palmer P.P. (2005). RGS proteins: new players in the field of opioid signaling and tolerance mechanisms. Anesth. Analg. 100: 1034-42.

Xie Z., Li Z., Guo L., Ye C., Li J., Yu X., Yang H., Wang Y., Chen C., Zhang D., Liu-Chen L.Y. (2007). Regulator of G protein signaling proteins differentially modulate signaling of mu and delta opioid receptors. Eur. J. Pharmacol. 565(1-3): 45-53.

Xu W., Campillo M., Pardo L., Kim de Riel J., Liu-Chen L.Y. (2005). The seventh transmembrane domains of the delta and kappa opioid receptors have different accessibility patterns and interhelical interactions. Biochemistry 44(49): 16014-25.

Xu H., Wang X., Wang J., Rothman R.B. (2004). Opioid peptide receptor studies. 17. Attenuation of chronic morphine effects after antisense oligodeoxynucleotide knock-down of RGS9 protein in cells expressing the cloned Mu opioid receptor. Synapse 52(3): 209-17.

Xu X., Zeng W., Popov S., Berman D.M., Davignon I., Yu K., Yowe D., Offermanns S., Muallem S., Wilkie T.M. (1999). RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. J. Biol. Chem. 274: 3549-56.

Yan Y., Chi P.P. Bourne H.R. (1997). RGS4 inhibits Gq-mediated activation of mitogenactivated protein kinase and phosphoinositide synthesis. J. Biol. Chem. 272: 11924-7.

Yowe D., Yu K., Wilkie T.M., Popov S. (2002). RGS domain: Production and uses of recombinant protein. Methods Enzymol. 344: 647-57.

Zachariou V., Georgescu D., Sanchez N., Rahman Z., DiLeone R., Berton O., Neve R.L., Sim-Selley L.J., Selley D.E., Gold S.J., Nestler E.J. (2003). Essential role for RGS9 in opiate action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(23): 13656-61.

Zeng W., Xu X., Popov S., Mukhopadhay S., Chidiac P., Swistok J., Danho W., Yagaloff K. A., Fisher S., Ross E., Muallem S., Wilkie T. (1998). The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling. J. Biol. Chem. 273: 34687-90.

Zhang H., Torregrossa M.M., Jutkiewicz E.M., Shi Y.G., Rice K.C., Woods J.H., Watson S.J., Ko M.C. (2006). Endogenous opioids upregulate brain-derived neurotrophic factor mRNA through delta- and micro-opioid receptors independent of antidepressant-like effects. Eur. J. Neurosci. 23(4): 984-94.

Zhang X., Wang F., Chen X., Chen Y., Ma L. (2008). Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. J. Neurochem. 106(2): 781-92.

Zhang X., Wang F., Chen X., Li J., Xiang B., Zhang Y.Q., Li B.M., Ma L. (2005). Betaarrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. J. Neurochem. 95(1): 169-78.

Zheng B., Ma Y.C., Ostrom R.S., Lavoie C., Gill G.N., Insel P.A., Huang X.Y., Farquhar M.G. (2001). RGS-PX1, a GAP for GalphaS and sorting nexin in vesicular trafficking. Science 294(5548): 1939-42.

## 7. Παράρτημα



Σχήμα 49. Συνοπτικός χάρτης και πολυ-κλωνική περιοχή του φορέα pMAL c2E.



Σχήμα 50. Συνοπτικός χάρτης και πολυ-κλωνική περιοχή του φορέα pGEX 5x3.



Σχήμα 51. Χάρτης του φορέα pcDNA3-HA. Στον πίνακα φαίνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία της πολυκλωνικής περιοχής του φορέα που περιλαμβάνει επίσης τον επίτοπο της αιματογλουτινίνης (HA, κόκκινο χρώμα). Με διαφορετικά χρώματα δεικνύονται επίσης οι περιοχές των εκκινητών T7 και Sp6, καθώς και οι περιοχές αναγνώρισης γνωστών περιοριστικών ενζύμων.



**Σχήμα 52.** Συνοπτικός χάρτης και πολυ-κλωνική περιοχή του φορέα pEGFP-N1. Δεικνύονται μοναδικές θέσεις περιοριστικών ενζύμων

10	20	30	40	50	60
MCKGLAGLPA	SCLRSAKDMK	HRLGFLLQKS	DSCEHNSSHN	KKDKVVICQR	VSQEEVKKWA
70	80	90	100	110	120
E <mark>slenlishe</mark>	CGLAAFKAFL	KSEYSEENID	FWISCEEYKK	IKSPSKLSPK	<b>AKKIYNEFIS</b>
130	140	150	160	170	180
<b>VQATKEVNLD</b>	SCTREETSRN	MLEPTITCFD	EAQKKIFNLM	EKDSYRRFLK	<b>SRFYLDLV</b> NP
190	200				
SSCGAEKQKG	AKSSADCASL	VPQCA			

1	atgtgcaaag	ggcttgcagg	tctgccggct	tcttgcttga	ggagtgcaaa	agatatgaaa
61	catcggctag	gtttcctgct	gcaaaaatct	gattcctgtg	aacacaattc	ttcccacaac
121	aagaaggaca	aagtggttat	ttgccagaga	gtgagccaag	aggaagtcaa	gaaatgggct
181	gaatcactgg	aaaacctgat	tagtcatgaa	tgtgggctgg	cagctttcaa	agctttcttg
241	aagtctgaat	atagtgagga	gaatattgac	ttctggatca	gctgtgaaga	gtacaagaaa
301	atcaaatcac	catctaaact	aagtcccaag	gccaaaaaga	tctataatga	attcatctca
361	gtccaggcaa	ccaaagaggt	gaacctggat	tcttgcacca	gggaagagac	aagccggaac
421	atgctagagc	ctacaataac	ctgctttgat	gaggcccaga	agaagatttt	caacctgatg
481	gagaaggatt	cctaccgccg	cttcctcaag	tctcgattct	atcttgattt	ggtcaacccg
541	tccagctgtg	gggcagaaaa	gcagaaagga	gccaagagtt	cagcagactg	tgcttccctg
601	gtccctcagt	gtgccta				

Σχήμα 53. Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της RGS4 πρωτεΐνης ανθρώπου. Με κίτρινο χρώμα δεικνύεται η αμινοξική αλληλουχία της RGS περιοχής.
# 8. Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

Cellular Signalling 21 (2009) 1218-1228



Contents lists available at ScienceDirect

# Cellular Signalling



journal homepage: www.elsevier.com/locate/cellsig

# Regulator of G protein signaling 4 confers selectivity to specific G proteins to modulate $\mu$ - and $\delta$ -opioid receptor signaling

### Leonidas J. Leontiadis, Maria P. Papakonstantinou, Zafiroula Georgoussi\*

Laboratory of Cellular Signaling and Molecular Pharmacology, Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

### A R T I C L E I N F O

Article history: Received 7 January 2009 Received in revised form 12 March 2009 Accepted 15 March 2009 Available online 24 March 2009

Keywords: μ, δ-opioid receptors Regulators of G protein signaling G proteins Internalization Extracellular signal-regulated kinases Signaling complex Protein-protein interactions

### 1. Introduction

Functional analysis of a considerable number of G protein coupled receptors (GPCRs) has shown that a given receptor subtype although displaying a high degree of promiscuity interacts with high affinity with a distinct subset of G proteins. Opioid receptors are classically described to couple to members of the Gi $\alpha$ /Go $\alpha$  family and agonist occupancy of these receptors has been reported to result in the inhibition of adenylyl cyclase and in the regulation of diverse second messenger systems ranging from phospholipase C $\beta$ , mitogen-activated protein kinase (MAPK), ion channels, as well as other signaling intermediates [1,2]. Such diverse signaling events are mediated by

\* Corresponding author. Laboratory of Cellular Signaling and Molecular Pharmacology, Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos", 15310 Ag. Paraskevi-Attikis, Athens, Greece. Tel.: +30 210 6503564; fax: +30 210 6511767.

E-mail address: iro@bio.demokritos.gr (Z. Georgoussi).

0898-6568/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.cellsig.2009.03.013

### ABSTRACT

*In vitro* studies have shown that the Regulator of G protein Signaling 4 (RGS4) interacts with the C-termini of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors ( $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR) (Georgoussi et al., 2006, Cell. Signal.18, 771–782). Herein we demonstrate that RGS4 associates with these receptors in living cells and forms selective complexes with Gi/ Go proteins in a receptor dependent manner. This interaction occurs within the predicted fourth intracellular loop of  $\mu$ ,  $\delta$ -ORs as part of a signaling complex consisting of the opioid receptor, activated G $\alpha$  and RGS4. RGS4 is recruited to the plasma membrane upon opioid receptor simulation. Expression of RGS4 in HEK293 cells attenuated agonist-mediated extracellular signal regulated kinase (ERK1,2) phosphorylation for both receptors and accelerated agonist-induced internalization of the  $\delta$ -OR. RGS4 lacking its N-terminal domain failed to interact with both opioid receptors and to modulate opioid receptor signaling. Our findings demonstrate that RGS4 plays a key role in G protein coupling selectivity and signaling of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs.

various G protein subtypes in a pertussis toxin (PTX) sensitive or insensitive manner depending on the system studied and the opioid agonists employed [1,3–5].

A number of hypotheses are raised regarding the mechanisms that allow activated GPCRs to couple to more than one G protein(s) and subsequently regulate different effectors. Substantial evidence suggests that GPCRs either alone or in coordination with G proteins can selectively recruit certain other proteins to the plasma membrane to determine the fate of the signaling function of these receptors [6]. Recent studies have shown that the Regulators of G protein signaling (RGS) proteins which comprise a large and diverse family of proteins (>30 family members) can bind directly to  $G\alpha$  subunits to attenuate their signaling [7-9]. Although the molecular basis of RGS-G $\alpha$  interactions has been extensively studied, little is known on how RGS selectivity for G protein signaling pathways is determined in living cells [8,9]. Growing evidence indicates that RGS proteins, by their ability to shorten the lifetime of activated  $G\alpha$ , confer selectivity for signaling pathways [10]. However, it is still unclear to what degree G protein activation influences RGS binding, how stable RGS-G protein association is and how GPCRs might influence RGS-G protein association [10,11]. Indeed, it was found that RGS proteins can directly interact with preferred receptors to regulate their function, whereas localization studies have provided evidence that RGS proteins are recruited to the membrane in a receptor-specific manner [11]. Direct interaction of RGS2 to the third loop of the M1 muscarinic acetylcholine receptor [12], and the  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor has also been reported [13], whereas RGS4 has been shown to bind to metabotropic glutamate receptor subtype 5 in rat striatum [14]. Recent observations

Abbreviations: GPCR, G protein-coupled receptors; RGS, Regulators of G protein Signaling; 4Box, RGS domain of RGS4;  $\Delta$ NRGS4, RGS4 lacking its N-terminal domain; 6xHis, hexahistidine; aa, amino acids; AC, adenylyl cyclase; AMF, 100µM AlCl<sub>3</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaF, 1 mM GDP; BSA, bovine serum albumin; DAMGO, [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]-enkephalin;  $\delta$ -CT,  $\delta$ -opioid receptor carboxyl-terminal tail;  $\delta$ -OR,  $\delta$ opioid receptor; µ-CR, µ-opioid receptor; µ-CT, µ-opioid receptor; DPDPE, [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-enkephalin; DSLET, [D-Ser<sup>2</sup>]-Leucine enkephalin-Thr; EGF, epidermal growth factor; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; GST, glutathione-S-transferase; HA, hemaglutini; MAPK, mitogen activated protein kinase; NMS, normal mouse serum; NRS, normal rabbit serum; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF membrane, polyvinylidene difluoride membrane; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

employing pull down assays utilizing the C-terminal domain of the  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR ( $\mu$ -CT and  $\delta$ -CT) expressed as a glutathione-S-transferase (GST) fusion peptides demonstrated the ability of purified RGS4 to interact directly with these receptors and modulate [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-enkephalin (DAMGO)-mediated adenylyl cyclase inhibition in HEK293 cells. This interaction was part of a signaling complex consisting of the receptor, G $\alpha$ , G $\beta\gamma$  and RGS4 [15].

Based on these observations in the present study we investigate the nature of RGS4 interaction with  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR in living cells and provide for the first time evidence for the selectivity of RGS-G $\alpha$  pairs formed upon opioid receptor stimulation. The structural determinant responsible for RGS4 and RGS4-G $\alpha$  complex association relies within the proximal conserved region of the  $\mu$ - and  $\delta$ -CTs. We further explore the effectiveness of the N-terminal region of RGS4 in  $\mu$ - and  $\delta$ -OR binding and signaling modulation in HEK293 cells and demonstrate for the first time that [D-Ser<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Thr<sup>6</sup>]-enkephalin (DSLET)mediated internalization of the  $\delta$ -OR is accelerated by the presence of RGS4. Finally we indicate that activation of  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs by selective opioid ligands leads to recruitment of RGS4 to the plasma membrane. Collectively, our data demonstrate that RGS4 by interacting with the µand  $\delta$ -ORs confers selectivity to the activated receptors to couple with a specific subset of G proteins and subsequently to alter their signaling pathways.

### 2. Material and methods

### 2.1. Constructs and reagents

The rat myc-tagged  $\mu$ -OR (in the pcDNA3 vector) was generously provided by Dr S. George, University of Toronto, Toronto, Canada. Gt $\alpha$ GDP purified from bovine retina was kindly provided by Dr H. Hamm, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA. Hemagglutinin (HA)tagged human RGS4 (HA-RGS4), anti-Go $\alpha$  (OCI) and anti-Gi $\alpha_2$  (SG3) antibodies were kindly provided by Dr G. Milligan University of Glasgow, Glasgow, Scotland. Hexahistidine (6xHis)-tagged RGS4 (His-RGS4) and 6xHis-RGS domain of RGS4 (His-4Box) in pQE60 vector were kindly provided by Dr T.M. Wilkie, University of Texas, TX, USA. [<sup>3</sup>H]-adenine (23Ci/mmol) was from Amersham Pharmacia (Vienna, Austria). Opioid ligand DAMGO, protease inhibitors, monoclonal anti-flag antibody and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lipofectamin 2000 and anti-mouse Alexa Fluor 568 secondary antibody were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Protein A and A/G plus sepharose beads and antibodies against RGS4, Gi $\alpha_{1,3}$ , p-ERK1,2 and ERK1,2 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal anti-c-myc was from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA) and polyclonal anti-EE was from QED Bioscience Inc. (San Diego, CA, USA). Anti-rabbit fluorescein isothiocyantate (FITC) conjugated secondary antibody was purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories (Suffolk, UK).

### 2.2. Generation of the N-terminal deletion constructs of RGS4

### 2.2.1. ANRGS4 for E. coli expression

For the generation of the truncated N terminus of RGS4 for *E. coli* expression two oligonucleotides partially complementary to the 5' and 3' ends of rat RGS4 lacking the N-terminal 57 aminoacids, were engineered so that the 5' end primer contained an Ncol site and a methionine (ATG) for translation initiation and the 3' end primer an Xhol site: 5'-ATGTCCATGGAGAAATGGGCTGAAT-CGCTGG-3' (forward) and 5'-ATACCTCGAGGGCACACTGAG GGACTAG-3' (reverse). The PCR product was digested and cloned into the pET28b vector (Novagen, EMD Biosciences) using T4 ligase. Positive clones were selected and the presence of the insert was verified by nucleotide sequence analysis. For protein expression, 0.5 L of LB medium was inoculated and isolation of the recombinant truncated 6xHistidine-tagged ΔNRGS4 protein was carried out as described by [16].

### 2.2.2. HA-ΔNRGS4 for mammalian expression

For the generation of the human HA-ΔNRGS4 the following primers were designed: forward 5'-CGGCGGAT-CCGAAATGGGCTGA-ATCACTGGAAAAC-3' containing a BamHI site and reverse 5'-ATATG-CGGCCGCTTAGGCACACTGAGGGACCA-3' containing a NotI site. The digested PCR product was ligated to a hemaglutinin (HA)-tagging pcDNA3 vector (kindly provided by Dr G. Mosialos, University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece). Positive clones were verified by sequence analysis.

#### 2.3. Preparation of the GST fusion constructs

GST fusion peptides encompassing the C termini of the  $\mu$ - and  $\delta$ -OR were generated from cDNA clones of the rat  $\mu\text{-}OR$  and mouse  $\delta\text{-}OR$ as described by [15]. For the production of the truncated C termini of  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs, the following primers were designed for PCR: a)  $\Delta$ C43µ-CT, 5'-ACTGGGATCCACAGCTGCCTGAATCCAGTTC-3' (forward) and 5'-ACGCGAATTCTCACGAGGTTGGGATGCAGAACT-3' (reverse) b) ΔN27µ-CT, 5'-ACTAGGATCCCGTCCACGATCGAACAGCAA-3' (forward) and 5'-ACGCGAATTCTTAGGGCAATGGAGCAGTTTC-3' c) ΔC36-δ-CT, 5'-ACTGG-GATCCACAGCAGCCTCAACCCGGTTC-3' (forward) and 5'-ACGC-GAA-TTCTCAGGGCGTGCGACAGAGCTG-3' (reverse) d)  $\Delta N26-\delta$ -CT, 5'-ATTGGGA-TCCCCTGCGGCCGCCAAGAACC-3' (forward) and 5'-ACGCGAATTCT-CAGGCGGCAGCCCACCG-3'. The PCR products were engineered into the pGEX-5×3 vector (GE Healthcare). Positive clones were transformed in E. coli (BL21) and the production of the proteins was carried out after induction with 0.5 mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as described by [2]. All positive constructs were verified by nucleotide sequence analysis.

#### 2.4. GST pull down assays

Approximately 1  $\mu$ M of the GST-fusion proteins of  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR in phosphate-buffered saline (PBS) containing protease inhibitor cocktail, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20  $\mu$ g/ml leupeptin and 20  $\mu$ g/ml antipain, were immobilized on glutathione-sepharose 4B beads in PBS following the procedure as described by [15].

### 2.5. Cell cultures and transient transfections

HEK293 cells stably expressing either a EYMPME (EE)-tagged or a myc-tagged version of the  $\mu$ -OR or the flag-tagged  $\delta$ -OR, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum under 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Transient transfections were performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions.

### 2.6. Co-immunoprecipitation assays

HEK293 cells stably expressing the myc-tagged  $\mu$ -OR or the flag- $\delta$ -OR were transiently transfected with empty vector or the HA-RGS4. 48 h post transfection, the cells were stimulated or not with opioid agonists for the indicated times and rinsed in PBS buffer containing 1 mM PMSF and 1 mM sodium orthovanadate. Cells were lysed in lysis buffer A containing 1% Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7.6), 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 30 mM Na<sub>4</sub> $P_2O_7$ , supplemented with 1  $\mu$ g/ml antipain, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/mL benzamidine, complete EDTA-free inhibitors, 1 mM PMSF and 1 mM sodium orthovanadate. Approximately 0.5–1 mg of the clarified cell lysates were incubated overnight at 4 °C with polyclonal antibodies against HA, RGS4, Go $\alpha$ , Gi $\alpha_3$ , Gi $\alpha_2$  or monoclonal antibodies against the myc or the flag depending on the receptor studied. Normal mouse serum (NMS) or normal rabbit serum (NRS) was used as control. Immune complexes were recovered on protein A or protein A/G plus sepharose beads and washed extensively. Protein samples were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS-PAGE) and transferred onto polyvinylidene (PVDF) membranes. Immunoprecipitation of cell lysate proteins was verified by immunoblotting using the appropriate antibodies as described previously [17].

### 2.7. Measurements of cAMP accumulation

Measurements of adenylyl cyclase activity were performed as described by [18]. Briefly, HEK293 cells stably expressing the EE-tagged  $\mu$ -OR were transiently transfected with the RGS4,  $\Delta$ NRGS4 or empty vector and incubated in a medium containing [<sup>3</sup>H]adenine (1.5  $\mu$ Ci/well) for 24 h. The generation of [<sup>3</sup>H] cAMP in response to treatment of the cells with various concentrations of opioid agonist was then assessed. Results are calculated as the ratio of levels of [<sup>3</sup>H] cyclic AMP to total [<sup>3</sup>H] adenine nucleotides (×1000) and the data are presented as percentage in comparison to 100% of the forskolin-stimulated cells.

### 2.8. Detection of MAPK phosphorylation

HEK293 cells expressing stably the  $\mu$ ,  $\delta$ -ORs ( $\mu$ -HEK293,  $\delta$ -HEK293), were transiently transfected with empty pcDNA3 vector, RGS4 or the truncated  $\Delta$ NRGS4 and cultured in 6 well plates for 48 h. Sixteen hours before the addition of drugs, the culture medium was removed and replaced by fresh serum-free medium. Agonists were added to the cells and allowed to incubate at 37 °C. Measurement of MAPK phosphorylation was performed as described by [17].

### 2.9. Fluorescent-activated Cell Sorting (FACS) analysis

HEK293 cells stably expressing the flag- $\delta$ -OR were transfected with RGS4 (4 µg), the truncated  $\Delta$ NRGS4 (4 µg) or pcDNA3. Cells were

treated for 15 min and 1 h with 1  $\mu$ M DSLET. Samples of 500,000 cells were acquired and incubated overnight with a polyclonal anti-flag serum (1:300) (Sigma F7425) at 4 °C under rotation. Cells were subsequently washed with PBS containing 2% Foetal Bovine Serum prior to 1 h incubation with an anti-rabbit FITC conjugated secondary antibody (1:200). Cells were extensively washed and fixed with PBS in the presence of 2% formaldehyde before analysis on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Inc). Mean fluorescence intensity of 10,000 cells was collected for each sample. Internalized receptors were calculated according to the following equation: internalized receptors (% of surface receptors) = 100% – [(the mean fluorescence of 10,000 live cells with drug treatment)/the mean fluorescence of 10,000 live cells without drug)]× 100% as described by [19].

### 2.10. Confocal microscopy

HEK293 cells stably expressing the myc-tagged  $\mu$ -OR or the flagtagged  $\delta$ -OR were transiently transfected with HA-RGS4 protein. Cells were treated with 1  $\mu$ M of DAMGO or DSLET for 15 min, fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. After blocking for 1 h at room temperature with PBS containing 3% BSA the cells were incubated overnight with anti-HA (1:500), anti-myc (1:1250) or monoclonal anti-flag (1:150) sera, using as secondary antibodies the anti-mouse Alexa 568 (1:1000) and antirabbit FITC (1:250). The cells were finally mounted on slides with Vectashield mounting media (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and visualized using a Nikon Eclipse E600 microscope coupled to an MRC-1024 laser scanning confocal microscope (Bio-Rad). Images represent single equatorial planes obtained with a 60× oil objective lens.



# **Fig. 1.** RGS4 interacts with the $\mu$ -OR and $\delta$ -OR in HEK293 cells. (A) HEK293 cells stably expressing the myc-tagged $\mu$ -OR, were transfected with HA-RGS4 (5 µg). The cells were stimulated for 5 min or not with 1 µM DAMGO and cell lysates, treated or not with AMF, were immunoprecipitated with a myc antibody. The presence of HA-RGS4 was verified in crude lysate and in the immunoprecipitates using anti-HA or RGS4 sera. Control samples of immunoprecipitated mock transfected cells or NMS-immunoprecipitated cell lysates are presented. Quantification of the immunoprecipitated RGS4 was performed by densitometric analyses. The data of the non treated cells were taken as 1; data represent mean $\pm$ SEM of three experiments, \*p<0.0001. (B) The presence of $\mu$ -OR was also visualized after immunoprecipitation with 4 µg of either HA or RGS4 antibodies respectively. Samples of NMS-immunoprecipitated lysates were used as control. C) HEK293 cells stably expressing the flag- $\delta$ -OR were transfected with HA-RGS4 (5 µg). The cells were challenged for 5 min or not with $\lambda$ MF was performed with a mati-flag antibody following the procedure described in panel (A). Mock transfected cells were used as control (lane 4). All co-immunoprecipitation experiments have been repeated at least three times. (D) Cell lysates were immunoprecipitated with a flag antibody.

### 3. Results

#### 3.1. RGS4 forms tight complexes with the $\mu$ -OR and $\delta$ -OR in HEK293 cells

Employing pull down assays utilizing the C termini of  $\mu$ ,  $\delta$ -ORs and the i3L expressed as GST-fusion protein, we have demonstrated that RGS4 interacts directly with both ORs [15]. To further explore whether RGS4 interaction is influenced by the activated state of the receptor and/or the G protein(s) in a cellular context, HEK293 cells stably expressing the myc-µ-OR, or the flag-δ-OR were transiently transfected with HA-RGS4. 48 h post-transfection, cells were stimulated with opioid agonists, and lysates from these cells were immunoprecipitated with the appropriate antibodies and immunoblotted with an anti-HA antibody. As demonstrated in Fig. 1A, the anti-myc antibody co-immunoprecipitated RGS4, as identified by a same molecular weight band in cell lysates (compare lanes 1 with 3-5). The amount of RGS4 co-precipitated with  $\mu$ -OR was similar in untreated cells compared with DAMGO-treated cells (compare lanes 3, 5). However, AMF (100 µM AlCl<sub>3</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaF, 1 mM GDP)-treated cell lysates showed an increase in the immunoprecipitated RGS4 protein. No bands were detected in similarly treated samples of either mock-transfected HEK293 cells or in cells that were immunoprecipitated with normal mouse serum (lanes 2 and 6). These results demonstrate the interaction of RGS4 with the µ-OR in HEK293 cells. Similarly, immunoprecipitation of the same cell lysates with anti-HA, or anti-RGS4 antibodies revealed a band corresponding to the µ-OR (Fig. 1B, lanes 3, 4), after immunoblotting with the anti-myc antibody. In parallel, when HEK293 cells stably expressing the flag-ô-OR were transiently transfected with HA-RGS4 and lysates were immunoprecipitated with an anti-flag antibody, a polypeptide corresponding to RGS4 was revealed (Fig. 1B, compare lanes 1-3 with 7). This band was absent in mock transfected cells (lane 4), thus demonstrating the direct interaction of RGS4 with the  $\delta$ -OR in HEK293 cells. Activation of the  $\delta$ -OR with DSLET or treatment with AMF did not alter the levels of immunoprecipitated RGS4, as compared with immunoprecipitated RGS4 under unstimulated conditions (lanes 1-3), suggesting that RGS4 associates with  $\delta$ -OR in an agonist independent manner. The interaction of RGS4 with the  $\delta$ -OR was also confirmed when HEK293 cell lysates were immunoprecipitated with either anti-HA or anti-RGS4 antibodies (Fig. 1D, lanes 3, 4). Collectively, these observations suggest that  $\mu$ - and  $\delta$ -OR physically interact



**Fig. 2.** *In vitro* binding of RGS4 in specific regions of the  $\mu$ - and  $\delta$ -CTs. (A) Generation of opioid receptor subdomain GST fusion proteins. Alignment and amino acid composition of the C-terminal tails of the  $\mu$ ,  $\delta$ -ORs and their truncated forms: peptide  $\Delta$ N27- $\mu$ -CT (amino acids 356–398) of the rat  $\mu$ -OR in which the 27 amino acids fragment that contain the conserved 19 amino-acid residues next to the seventh transmembrane domain are eliminated; peptide  $\Delta$ C43- $\mu$ -CT (amino acids 329–355) consisting of the 43 amino-acids of the final part of the C-terminal domain of the  $\mu$ -CT; peptide  $\Delta$ N26- $\delta$ -CT (amino acids 37–372), which consists of the final 36 amino acids of the C-terminal tail of the mouse  $\delta$ -OR; fragment peptide  $\Delta$ C36- $\delta$ -CT, which contains the 26 first amino acids next to the seventh transmembrane domain (amino acids 311–336). The identical amino acids between the two opioid receptor subtypes are underlined. (B) RGS4 interacts with  $\Delta$ C43- $\mu$ -CT. *Upper panel*: A fixed amount of 6xHis-RGS4 (0.3  $\mu$ M) was incubated with  $\mu$ -CT (1  $\mu$ M) and the truncated peptides as described in (A), and pull down experiments were performed as described in Materials and methods. (C) RGS4 interacts with  $\Delta$ C36- $\delta$ -CT. *Upper panel*: Pall down experiments were performed as described in panel (A). *Lower panels of B and C*: The amount of GST fusions loaded was verified after stripping and reprobing with an anti-GST antibody (1:5000). (D) RGS4 forms complexes with G $\alpha$  within specific subdomains of the  $\mu$ -CT. Purified Gt $\alpha$ GDP (0.3  $\mu$ M) and 6xHis-RGS4 (0.5  $\mu$ M) were incubated in PBS with protease inhibitors and 1 mM GDP in the presence or absence of AMF for 10 min at room temperature and 20 min at 4 °C. The  $\mu$ -CT and the truncated peptides bound to glutathione-sepharose beads were added to the above samples and incubated for 25 min at 4 °C under rotation. Bound proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF and detected using an anti-G $\alpha$  or anti-His antibody. (E) RGS4 forms complexes with G $\alpha$ 

derived peptides that the proximal element of the C terminus close to

the juxtamembrane segment of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs reduces high affinity opioid agonist binding and probably interferes in receptor G protein

coupling [20,21]. In an attempt to map the sites of interaction of RGS4

within the C termini of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs, four truncated GST fusion proteins were generated (Fig. 2A). In vitro pull down experiments

using the fusion peptide that lacks the first 27 amino acids ( $\Delta N27$ - $\mu$ -

CT), failed to retain RGS4 binding, as compared with the amount of

RGS4 detected in full length µ-CT (Fig. 2B, lanes 2, 4). In contrast, the

with RGS4 in living cells and that activation of these receptors is

### 3.2. A conserved region within the C termini of the $\mu$ - and $\delta$ -ORs is critical for RGS4 and RGS4-G $\alpha$ complex interaction

The  $\mu$ - and  $\delta$ -CTs are 70 and 62 amino acids long respectively and share a conserved domain consisting of the first 18 amino acids region (LNPVLYAFLDENFKRCFR) close to the seventh transmembrane domain (Fig. 2A). We have previously demonstrated using receptor

GST-peptide fragment,  $\Delta$ C43- $\mu$ -CT, that contains only the first portion µ-OR D δ-OR WB: anti-Gia<sub>1,3</sub> NRS Gia, input 2 3 6 Gia13 WB: anti-Gia, HA AMF input DAMGO 3 5 Gia2 WB: anti-HA AMF RGS4 DSLET 2.5 2 Fion a levels 1.5 E DAMGO WB: anti-Gia<sub>1,3</sub> AME No treatment HA input 1 2 3 4 5 6 7 Gia<sub>1,3</sub> WB: anti-HA AMF HA input DSLET 2 6 7 3 4 5 RGS4-AMF DAMGO F WB: anti-HA WB: anti-HA Gog Goa HA input input 2 3 4 5 2 3 4 5 6 7 1 1 RGS4 RGS4 AMF AMF + DAMGO DSLET +

Fig. 3. RGS4 interacts with different Gα subunits in HEK293 cells stably expressing the μ- and δ-ORs. μ-and δ-HEK293 cells were transiently transfected with HA-RGS4 (5 μg) or vector alone. (A) RGS4 interacts with Gai1.3 upon receptor or G protein stimulation. µ-HEK293 cells were stimulated or not with 1 µM DAMGO for 5 min and cell lysates were pretreated or not with AMF, following immunoprecipitation with an anti-HA antibody (4 µg). Immune complexes were electrophoresed and transferred to PVDF membranes as described in Materials and methods. Gai<sub>13</sub> subtype was visualized by immunoblotting with an anti-Gai<sub>13</sub> antibody (1:1000). Lane 1 represents the presence of Gia<sub>13</sub> in cell lysates and lane 7 represents the same protein immunoprecipitated with anti-Gai1-3 antibody. Immunoprecipitated lysates with NRS or mock transfected cells were used as control. RGS4 protein levels were verified by sripping and reprobing the membranes with an anti-HA antibody (middle panel). Quantification of Ga1,3 was performed after normalization with immunoprecipitated RGS4 (lower panel). Data represent mean ± SEM of three independent experiments, \*p<0.001, \*\*p<0.001 as compared with the untreated samples. (B) RGS4 interacts with Goi2 upon receptor stimulation. µ-HEK293 lysates treated with 1 µM DAMGO or treated with AMF were immunoprecipitated with the indicated antibodies. RGS4 was not co-immunoprecipitated in unstimulated cells (lane 4). Lanes 4–6, represent RGS4 after immunoprecipitation with an anti-Gi $\alpha_2$  antibody, under both stimulated and unstimulated conditions. Lanes 1 and 8 represent the presence of RGS4 in cell lysates and immunoprecipitated samples. Mock transfected cells were used as control. (C) RGS4 interacts with Goa upon receptor or G protein stimulation. Co-immunoprecipitation of RGS4 with an anti-Goa antibody was detected as described in panel B. (D) RGS4 interacts with Gai2 in δ-HEK293 cells. Cell lysates stimulated with 1 µM DSLET for 5 min or treated with AMF were immunoprecipitated with anti-HA antibody as described above. The presence of Gai2 protein subtype was visualized by immunoblotting with an anti-Gai2 (SG3) antibody (1:1000). Lanes 1 and 2, represent the presence of Gai2 in brain extracts and  $\delta$ -HEK293 cell lysates respectively. Lane 3, represents immunoprecipitated mock transfected cells with an anti-HA antibody. Lanes 5 and 6, represent the presence of Gia2 immunoprecipitated with the HA epitope of RGS4. (E) Interaction of RGS4 with Gai13 in ô-HEK293 cells. ô-HEK293 cell lysates, pretreated with DSLET or with AMF, were immunoprecipitated with an anti-HA antibody. The presence of Gai1.3 in cell lysates was confirmed by immunoprecipitation with an anti-Gai1.3 antibody (lanes 7, 8). Gia1.3 associates with RGS4 in absence of agonist (lane 4). This interaction increases upon AMF stimulation of the cell lysates (lane 6), whereas it is attenuated in the presence of DSLET stimulation of  $\delta$ -OR (lane 5). Lanes 1 and 2, represent the presence of Giα<sub>1.3</sub> in δ-HEK293 cell lysates and brain extracts respectively. (F) RGS4 interacts with Goα independently of receptor activation in δ-HEK293 cells. Cell lysates, pretreated with DSLET or with AMF, were immunoprecipitated with anti-Goa (4 µg) antibody and immunoblotted with an anti-HA antibody. Lane 1, represents HA-RGS4 expression in crude lysate extract. Immunoprecipitation of cell lysates from mock transfected cells with Goα antibody was used as control (lane 2). Lanes 3–5, represent amount of RGS4 immunoprecipitated with the anti-Go $\alpha$ . The results are representative of one experiment repeated at least four times.

not a prerequisite for RGS4 association.

1222

A

B

C

8

of the  $\mu$ -CT, bound RGS4 (compare lanes 2, 3). These results demonstrate the importance of the juxtamembrane region of the  $\mu$ -CT in RGS4 recognition and binding. Similarly, in the case of  $\delta$ -OR, the peptide fragment  $\Delta$ N26- $\delta$ -CT in which the first 26 amino acids are deleted, failed to interact with RGS4. In contrast, the remaining portion of the  $\delta$ -CT encompassing the peptide  $\Delta$ C36- $\delta$ -CT bound RGS4 in a similar manner as the entire  $\delta$ -CT (Fig. 2C, lanes 2, 3). These data delimited the interaction of RGS4 within the amino acid regions 329–355 for the  $\mu$ -OR and 311–336 for the  $\delta$ -OR and therefore suggest that the conserved region shared between the two ORs is a critical structural determinant for RGS4 recognition and binding.

It is already known that  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs exhibit differential binding profiles for G $\alpha$  subunits and that RGS4 complexed with activated G $\alpha$ promotes binding of the latter to the  $\mu$ -CT [15]. A possible question therefore that arises is whether RGS4 by interacting with  $G\alpha$  displays the same or different interactive domains within the  $\mu$ - and  $\delta$ -CTs. To test this possibility, we performed pull down experiments using purified RGS4, inactive  $Gt\alpha GDP$  and the truncated fusion peptides. As shown in Fig. 2D,  $G\alpha$  alone or together with RGS4 did not associate with the  $\Delta C43-\mu$ -CT peptide (Fig. 2D, upper panel, lanes 2,3) despite the fact of RGS4 association under these conditions. However, when RGS4 and  $Gt\alpha GDP$  were preincubated together in the presence of AMF, and the same pull down was performed, we observed that  $G\alpha t$ interacts with the  $\Delta C43-\mu$ -CT (compare lanes 4 with 8). In contrast, when the  $\Delta N27-\mu$ -CT was incubated with RGS4 and Gt $\alpha$ , either in the absence or the presence of AMF, no heterotrimeric complex between them was detected (compare lanes 6, 7 with 8). These observations suggest that RGS4-G $\alpha$  complexes use the juxtamembrane region of  $\mu$ -CT for binding.

In the case of  $\delta$ -OR, when RGS4 was pre-incubated with Gt $\alpha$ GDP, peptide  $\Delta$ N26- $\delta$ -CT failed to bind any of these proteins (Fig. 2E, lanes 3 upper and middle panel). However, both Gt $\alpha$  and RGS4 associate with the  $\Delta$ N26- $\delta$ -CT when the cell lysates are stimulated with AMF (lane 4). These results suggest that RGS4 complexed with active G $\alpha$  uses an additional interactive domain within  $\delta$ -CT, as compared with the corresponding region of the  $\mu$ -CT. It also suggests that RGS4 and G $\alpha$  form a heterotrimeric complex within the region (amino-acids 337–372) of the  $\delta$ -CT.

3.3. RGS4 forms selective complexes with specific Ga subunits in HEK293 cells expressing the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs

Taking into account that RGS4 and  $G\alpha$  subunits form in vitro a heterotrimeric complex with the C termini of  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR and that RGS4 interacts directly with the opioid receptors in HEK293 cells, we sought to determine, whether RGS4 confers selectivity to the activated  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs for coupling with a particular subset of G $\alpha$  proteins. To answer this question, the ability of specific  $G\alpha$  subunits of G proteins to interact with RGS4 upon agonist stimulation of the  $\mu$ ,  $\delta$ -ORs in HEK293 cells was tested. As shown in Fig. 3A, µ-HEK293 cell lysates immunoprecipitated with an anti-HA and immunoblotted with an anti-Gi $\alpha_{1,3}$ antibody revealed the presence of a weak band corresponding to  $Gi\alpha_{1,3}$ in untreated samples (lane 3). This band is significantly increased in cell lysates that were treated with DAMGO or AMF (lanes 4, 5). No band was detected in untransfected cell lysates (lane 2). These results suggest that association of Gi $\alpha_{1,3}$  with RGS4 in  $\mu$ -HEK293 cells is enhanced upon activation of the  $\mu$ -OR. In a similar manner, RGS4 interacted with Gi $\alpha_2$ and  $Go\alpha$  in cell lysates that were either treated with DAMGO or AMF (Fig. 3B, C, lanes 5, 6 respectively) and not under basal conditions. These results suggest that RGS4 forms tight heterotrimeric complexes with selective G proteins upon µ-OR stimulation in HEK293 cells.

To identify whether similar interactions between RGS4 and  $G\alpha$ subunits are also detected in  $\delta$ -HEK293 cells, the ability of Gi $\alpha_2$ , Gi $\alpha_{1,3}$ and  $Go\alpha$  to immunoprecipitate with transiently expressing HA-RGS4 upon stimulation of the  $\delta$ -OR in HEK293 cells was tested. As demonstrated in Fig. 3D, the anti-HA antibody co-immunoprecipitated  $Gi\alpha_2$  only when cells were stimulated with DSLET or treated with AMF (lanes 5 and 6). No bands were detected in samples of either untransfected or unstimulated cell lysates (lanes 3, 4). These results suggest that RGS4 forms an active heterotrimeric complex with Gi $\alpha_2$ upon  $\delta$ -OR stimulation. In addition, to test whether Gi $\alpha_{1,3}$  follows the same pattern of interaction with RGS4 as that detected for  $Gi\alpha_2$ , the ability of  $Gi\alpha_{1,3}$  to co-immunoprecipitate with RGS4 before and after stimulation in  $\delta$ -HEK293 cells was detected. As shown in Fig. 3E, Gi $\alpha_{1,3}$ interacted with RGS4 either in unstimulated conditions or after AMF treatment of cell lysates (lanes 4, 6). However, upon stimulation of cells with 1 µM DSLET (or [D-Pen<sup>2</sup>,D-Pen<sup>5</sup>] enkephalin-DPDPE, data



**Fig. 4.** Effect of opioid receptor stimulation on the intracellular localization of RGS4. (A) HEK293 cells stably expressing the myc-tagged µ-OR were transiently transfected with HA-RGS4. 48 h post-transfection, cells were treated with 1 µM DAMGO for 15 min, fixed, permeabilized and immuno-labeled with monoclonal anti-myc (secondary antibody anti-mouse alexa-fluor 568 under 605/32 emission filter) and anti-HA (secondary antibody anti-rabbit FITC under 522/35 emission filter). Shown are immunostaining images of the nuclear equatorial plane of the cell, as determined by a *z* axis series. Red represents the myc-µ-OR, green represents HA-RGS4 and yellow (in the overlay image) represents overlapping green and red fluorescence. (B) HEK293 cells stably expressing the flag-tagged δ-OR and transiently expressing HA-RGS4 were immunolabeled with a monoclonal anti-flag antibidoy, following the procedure as above. Stimulation of cells was employed using 1 µM DSLET. Red represents the flag-δ-OR, green represents HA-RGS4 and yellow (in the overlay image) represents overlapping green and red fluorescence. Images show cells with how to intermediate fluorescence intensity and are represents HA-RGS4 and yellow (in the overlay image) same constructs. The experiment was repeated three times in duplicate sets.

not shown) the interaction of RGS4 with Gia<sub>1,3</sub> was dramatically decreased (lane 5). This result suggests that the agonist activated  $\delta$ -OR does not promote the formation of a complex between RGS4 and Gia<sub>1,3</sub>. On the other hand, RGS4 was able to interact with Goa equally well under both stimulated and unstimulated conditions in the same cell lysates (Fig. 4F, lanes 3–5). Collectively, these observations suggest that the RGS4 has the capacity to select a particular subset of G proteins depending on the conformation of the G protein and the presence and activation state of the receptor.

### 3.4. Subcellular localization of RGS4

It has been previously shown that intracellular distribution of RGS proteins can be affected by G protein and GPCR expression [22]. We therefore detected whether subcellular distribution of transiently transfected HA-RGS4 in HEK293 cells stably expressing the myc-µ-OR and flag- $\delta$ -OR, was altered before and after opioid agonist administration. As shown in Fig. 4A (upper panel), under basal conditions the receptor was localized in the plasma membrane and RGS4 was found to the cytosol, the nucleus and diffusively distributed to the plasma membrane of HEK293 cells. No detectable co-localization between the μ-OR and the HA-RGS4 was observed (right merge, upper panel). However, DAMGO stimulation of cells for 15 min led to redistribution of RGS4 to the plasma membrane where it co-localizes with the µ-OR (Fig. 4A, right merge, lower panel). Similarly, in  $\delta$ -HEK293 cells, the expressed HA-RGS4 localizes in the resting state of the receptor mainly in the cytoplasm and the nucleus and to a lesser extent in the plasma membrane (Fig. 4B, upper middle panel). A small fraction of RGS4 can also be found together with the receptor. DSLET stimulation of cells resulted in the movement of RGS4 to the plasma membrane, where it co-localizes with the  $\delta$ -OR. RGS4 is also found to co-localize with the internalized  $\delta$ -OR (Fig. 4B, right merge, lower panel). These results suggest that agonist activation of  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR affects the intracellular localization of RGS4.

# 3.5. The N-terminus of RGS4 is responsible for $\mu\text{-}$ and $\delta\text{-}opioid$ receptor association

Previous observations have demonstrated that the N-terminus of RGS proteins is important for the interaction with GPCRs [12,23]. In an attempt to examine the significance of the N-terminus of RGS4 for the  $\mu$ - and  $\delta$ -OR interaction, pull down experiments were performed using an N-terminal truncated mutant of 6xHis-tagged RGS4, in which the first 57 amino acids of the protein were deleted ( $\Delta$ NRGS4). As previously shown [15], wild type RGS4 binds equally well to all subdomains of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs tested (Fig. 5A, lanes 2–4). However, no detectable band was observed when similar pull downs were performed utilizing the  $\mu$ ,  $\delta$ -CTs and the i3L together with the mutant  $\Delta$ NRGS4, thus suggesting that the N-terminal region of RGS4 is responsible for  $\mu$ - and  $\delta$ -OR association (lanes 6–8). In order to provide additional evidence concerning the role of the N-terminal domain of RGS4 in  $\mu$ -CT and  $\delta$ -CT association we tested the association of the  $\Delta$ NRGS4 mutant in a cellular context. For that reason  $\mu$ -HEK293 or  $\delta$ -HEK293 cells were transiently transfected with the cDNA expressing the HA tagged  $\triangle$ NRGS4. Lysates from these cells were examined in pull down assays using the immobilized CTs after stimulation with DAMGO or DSLET. As shown in Fig. 5B, although wild type RGS4 interacts with both C-termini of the opioid receptors (lanes 4, 6), no detectable band



**Fig. 5.** RGS4 domains responsible for  $\mu$ - or  $\delta$ -ORs interaction. (A) Wild type recombinant RGS4 (0.3  $\mu$ M) and  $\Delta$ NRGS4 (0.3  $\mu$ M) isolated from *E. coli* as described in Materials and methods, were incubated with the GST fusion peptides encompassing the  $\delta$ -i3L,  $\delta$ -CT and  $\mu$ -CT in the presence of PBS containing protease inhibitors for 25 min at room temperature. Bound proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF and detected using an anti-His antibody. (B) N-terminal truncated RGS4 ( $\Delta$ NRGS4) does not interact with the opioid receptor CTs. HEK293 cells stably expressing the  $\mu$ -OR or the  $\delta$ -OR were transiently transfected with the cDNA expressing the HA-RGS4, HA- $\Delta$ NRGS4, or vector alone (5 µg each). 48 h post-transfection cells were stimulated with DAMGO or DSLET for 5 min. Cell lysates (700 µg) were incubated with 1 µM of the GST fusions encompassing the  $\mu$ -CT the  $\delta$ -CT or GST alone. Protein complexes were washed, separated on 10% SDS and detected for RGS4 bound with an anti-HA antibody. Lane 1 and lane 2 represent transfected cell lysates with wild type RGS4 and  $\Delta$ NRGS4 respectively.  $\Delta$ NRGS4 expressing cell lysates did not interact with the  $\mu$ -CT in the presence of AMF for 10 min at room temperature and 20 min at 4 °C. The  $\mu$ -CT bound to glutathione-sepharose beads was added to the reactions and incubated for 25 min at 4 °C under rotation. Bound proteins were detected using an anti-GG or anti-His antibody. Lower panels: equal amounts of the fusions were verified after stripping and reprobing with an anti-GST antibody.



**Fig. 6.** Effect of  $\triangle$ NRGS4 on  $\mu$ -OR-mediated adenylyl cyclase inhibition. HEK293 cells stably expressing the  $\mu$ -OR were transfected with HA-RGS4 (5 µg) or HA- $\triangle$ NRGS4 (5 µg). 24 h post-transfection, cells were incubated with [<sup>3</sup>H] adenine (1.5  $\mu$ Ci/mL) as described in Materials and methods. Generation of [<sup>3</sup>H] cAMP was measured in response to treatment with forskolin (50  $\mu$ M) and increasing concentrations of DAMGO in cells expressing HA-RGS4, HA- $\triangle$ NRGS4 or vector alone. Data are presented as the percentage of cAMP accumulation (100% corresponds to the forskolin stimulated sample) and represent the mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations of five independent experiments. \*p <0.005 as compared to the corresponding values of mock transfected cells.

corresponding to the truncated  $\Delta$ NRGS4 was detected (lanes 5, 7). Similar pull down employing either mock transfected cell lysates or GST alone did not display any binding (lanes 3 and 8). To further explore whether other sites beyond the N terminus of RGS4 are responsible for opioid receptor and G $\alpha$ -RGS4 complex interaction, we tested the ability of the RGS domain of RGS4 (4Box), in which both the N- and C-termini are truncated to interact with the  $\mu$ -CT. Pull down experiments utilizing the  $\mu$ -CT have shown that 4Box weakly interacted with this domain (Fig. 5C middle panel, lane 4). However, when equal amounts of 4Box and G $\alpha$ t were preincubated in the presence of AMF, not only binding of 4Box was significantly enhanced but binding of G $\alpha$ t to the  $\mu$ -CT was also detected (Fig. 5C, lane 3 middle and upper panels respectively). No detectable band corresponding to G $\alpha$ t was observed when the same experiment was performed in the absence of AMF. These results suggest that sites within the GTPase Activating Protein (GAP) domain of RGS4 are not only necessary for binding to active  $G\alpha$ , but also for promoting complexes, thus facilitating association of these interacting proteins to the receptor.

# 3.6. The N-terminal domain of RGS4 is implicated in $\mu$ -OR-mediated adenylyl cyclase inhibition

In an attempt to examine in greater detail the functional significance of the N-terminal region of RGS4 in opioid receptor signaling, we analyzed the ability of an N-terminal deletion mutant of RGS4 ( $\Delta$ NRGS4) in DAMGO-mediated adenylyl cyclase inhibition in  $\mu$ -HEK293 cells. As shown in Fig. 6, 500 nM DAMGO treatment of cells resulted in 55 $\pm$ 2% inhibition of cyclic AMP accumulation. This inhibition was altered to 34 $\pm$ 3% by the presence of the wild type RGS4. Expression of the truncated  $\Delta$ NRGS4 reversed cyclic AMP accumulation to similar levels as those detected in cells expressing vector alone, hence, the N terminus of RGS4 is essential for Gi-mediated adenylyl cyclase inhibition.

### 3.7. Effect of RGS4 on ERK activation by the $\mu$ - and $\delta$ -opioid receptors

Others and we have previously demonstrated that  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs expressed in HEK293 cells stimulate ERK1,2 activity via pertussis toxin-sensitive G protein signaling mechanisms [17,24]. To examine whether expression of RGS4 alters ERK1,2 activation in response to µand  $\delta$ -opioid agonist stimulation, HEK293 cells were challenged with opioid selective agonists. As shown in Fig. 7A and B respectively, both DAMGO and DSLET enhanced ERK1,2 phosphorylation after 2 and 5 min stimulation of these receptors. This phosphorylation was attenuated when RGS4 was co-expressed in HEK293 cells, suggesting that RGS4 interferes in the  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR-mediated signaling of ERK1,2. When similar phosphorylations were detected in DAMGOstimulated HEK293 cells co-expressing the ΔNRGS4 mutant, no alteration in the levels of ERK1,2 were detected (Fig. 7C). These observations suggest that the N-terminal region of RGS4 is the functional domain that plays a significant role in modulating opioid receptor signaling. To detect the significance of the RGS4 effect on ERK phosphorylation mediated by the opioid receptors, we also administered the receptor tyrosine kinase ligand Epidermal Growth Factor (EGF) in HEK293 cells, a treatment known to cause rapid activation of ERKs. EGF-mediated phosphorylation of ERK was indeed observed; in



**Fig. 7.** RGS4 modulates opioid receptor-mediated ERK1,2 phosphorylation. (A, B) Expression of RGS4 attenuates ERK phosphorylation mediated by the  $\delta$ ,  $\mu$ -ORs. Upper panels: stably transformed HEK293 cells expressing the myc- $\mu$ -OR (A) or the flag- $\delta$ -OR (B) were transiently transfected with HA-RGS4 or empty vector. 48 h post-transfection, the cells were stimulated with the appropriate receptor agonists for 2 and 5 min and cell lysates were resolved in SDS-PACE (12%). The phosphorylated ERK was visualized by immunoblotting with a phospho-ERK antibody. (C)  $\Delta$ NRGS4 has no effect on ERK phosphorylation. Upper panel: HEK293 cells expressing the  $\mu$ -OR were transfected with  $\Delta$ NRGS4 or empty vector as described above. (D) ERK phosphorylation mediated by EGFR stimulation is not influenced by the expression of RGS4. HEK293 cells were stimulated with 10 nM EGF for 2 and 30 min following the procedure as described above. Lower panels: equal loading was verified by stripping and reprobing the PVDF membranes with a specific anti-ERK antibody (bottom). Results shown are representative of four independent experiments.



**Fig. 8.** Effect of RGS4 expression on the internalization rate of  $\delta$ -OR. RGS4 increases the rate of  $\delta$ -OR internalization. Flag-tagged  $\delta$ -HEK293 cells were transfected with the HA-RGS4, the HA-ANRGS4 or vector alone. Cells were treated with 1  $\mu$ M DSLET for 15 min or 1 h. Cells were processed for surface immunofluorescence staining and analyzed by fluorescence flow cytometry. Internalized receptors were determined as described in Materials and methods. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of four experiments performed in triplicate. \*p<0.05 as compared to the corresponding values of mock transfected cells.

contrast to the situation with opioid agonists, however, ERK phosphorylation was not affected by the presence of RGS4, suggesting that RGS4 expression cannot influence ERK1,2 activation by a receptor that signals through mediators other than G proteins (Fig. 7D).

#### 3.8. Effect of RGS4 in the internalization of the $\delta$ -opioid receptor

As opioid receptor internalization is an important parameter of opioid receptor signaling and RGS proteins have been suggested to be implicated in the internalization of GPCRs [25,26], we sought to determine whether expression of RGS4 alters the rate of internalization of the  $\delta$ -OR in HEK293 cells by flow cytometry. As shown in Fig. 8\ DSLET administration for 15 min led to the internalization of the surface  $\delta$ -OR in mock transfected HEK293 cells by 32  $\pm$  5. However, when HEK293 cells expressing the RGS4 were treated with DSLET for 15 min, the levels of the internalized receptors increased to  $62\pm6\%$ , as the levels of cell surface  $\delta$ -OR (62  $\pm$  5%) in mock transfected cells after 1 h exposure. No further increase at the levels of internalized  $\delta$ -receptor  $(66 \pm 3\%)$  was detected when cells expressing RGS4 were exposed to DSLET for 1 h. These results suggest that RGS4 accelerates the rate of internalization of the  $\delta$ -OR. In contrast, expression of the deletion mutant of RGS4 (ANRGS4) in HEK293 cells resulted in an identical internalization rate of  $\delta$ -OR (34  $\pm$  4 at 15 min and 62  $\pm$  2% after 1 h DSLET exposure) as that observed for the mock transfected cells. These observations suggest that the N-terminal domain of RGS4 is a key functional determinant required to facilitate  $\delta$ -OR internalization.

### 4. Discussion

Opioid receptors signal predominately via members of the Gi/Go family. Recent observations have shown that these receptors can also effectively associate with various other partners that play distinct roles in the signaling, trafficking intracellular sorting and fine tuning of each of these receptors [26,27]. Employing pull down assays that utilize the C-termini of the  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR and the third intracellular loop expressed as GST fusion proteins, we have recently demonstrated the ability of RGS4 to interact directly with these receptors and provided evidence for the potency of RGS4 to form a heterotrimeric complex with activated G $\alpha$ within the  $\mu$ -CT [15]. In line of these observations, we further explored whether similar effects can also be detected in living cells and observed the effects RGS4 exerts in G protein selectivity and opioid receptormediated signaling. For that reason, we initially examined whether RGS4 interaction with the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs in HEK293 cells is influenced by opioid administration. Our results have shown that activation of the µand  $\delta$ -ORs did not significantly enhance the levels of interacting RGS4 with them, thus suggesting that RGS4 can associate with both stably expressed  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR in HEK293 cells even in the resting state of these receptors. Activation of the G proteins with AMF, that promotes a high affinity complex with  $G\alpha$ , resulted in a stronger interaction of RGS4 with the  $\mu$ -OR, demonstrating that active G $\alpha$  subunits can promote stronger RGS4-µ-OR associations, an observation which is also confirmed with our *in vitro* studies [15]. However, in the case of  $\delta$ -OR, the presence of AMF did not confer any stronger interaction of RGS4 than that detected upon DSLET activation of the receptor. The observed lack of enhanced interaction of RGS4 with  $\delta$ -OR in the presence of AMF might be due to the ability of  $G\alpha$  to associate with the  $\delta$ -CT equally well at any conformation (active or inactive) compared with the µ-CT as previously reported [15]. The fact that in our cell system RGS4 coimmunoprecipitates with both opioid receptors in the absence of agonist, suggests that RGS4 can physically associate with these receptors. Up to date, there is no clear indication on the way RGS proteins pair with GPCRs. Previous observations have reported that RGS2 and RGS4 are recruited to the plasma membrane by G protein and or expressed receptors in an agonist-independent manner [22]. On the other hand, GAIP was found to be recruited to the plasma membrane upon activation of the dopamine D2 receptor [28]. A possible explanation regarding the association of RGS proteins with various receptors could be that RGS-GPCR pairs may be influenced by different factors such as a) the levels of expression of the receptors, b) the nature and abundance of the G and RGS proteins present in a certain cellular milieu, c) the pairs formed between all these three interactive partners and finally d) the activation state of the receptor. Further experimentation is required to clarify to which degree G protein expression and activation influences RGS4 association with GPCRs.

Our next challenge was to understand the temporal characteristics, spatial organization and sites of interaction between opioid receptors, G proteins and RGS4. We know that the predicted fourth intracellular loop, forming helix VIII of rhodopsin, which is composed by thioacylated cysteine residues, provides contact sites and plays a critical role in G protein activation [29]. Using opioid receptor derived peptides we have previously found that part of the conserved stretch (LNPVLYAFLDENFKRCFR) derived from the C-termini of the  $\delta$ - and  $\mu$ -ORs proximal to the seventh transmembrane domain is responsible for receptor-G protein coupling and G protein activation [20,21,30]. A critical question therefore that arises is whether RGS4 can also use this opioid receptor domain for association. Mapping the sites of interaction within the µ-CT, demonstrated that lack of the juxtamembrane domain encompassing the conserved 18 amino-acid stretch, abolished binding of RGS4 and failed to form a heterotrimeric complex with RGS4 and activated G $\alpha$ . However, association of RGS4-G $\alpha$  complexes can be found in more regions within the  $\delta$ -CT, as that detected within the  $\mu$ -OR. Indeed, pull down experiments revealed that the  $\Delta$ N26- $\delta$ -CT region can serve to position RGS4-G $\alpha$  complex, providing the  $\delta$ -OR with an additional interacting domain for RGS4-G $\alpha$  association. We can thus conclude that RGS4-G $\alpha$  complexes act as new entities with new interactive attributes than each of these proteins separately. Therefore someone can assume that the  $\mu$ - and  $\delta$ -CTs serve as platforms to recruit pairs of RGS4-G $\alpha$  depending on the agonist-activated receptor or the receptor-G protein complexes formed.

Knowing that opioid receptors couple to several G $\alpha$  subunits irrespective of receptor density and/or agonist potency [31,32] and that RGS proteins exert their GAP activity by interacting with members of the G $\alpha$  subunits, we sought to address whether RGS4 promotes selectivity to specific G proteins upon  $\mu$ - and  $\delta$ -OR activation. Our results have shown that in cells expressing the  $\mu$ -OR, RGS4 preferentially interacted with all G $\alpha$  subunits tested, i.e. Gi $\alpha$ <sub>1,3</sub>, Gi $\alpha$ <sub>2</sub> and G $\alpha$  and that this interaction was enhanced upon AMF treatment or

receptor activation. We can thus conclude that RGS4 pairs with any of the endogenous G proteins tested in HEK293 cells upon µ-OR stimulation. In contrast, the  $\delta$ -OR exhibits a differential selectivity profile for RGS4-G $\alpha$  complex formation in  $\delta$ -HEK293 cells. In the absence of agonist, RGS4 interacts with Gi $\alpha_{1,3}$  and Go $\alpha$  but not with Gi $\alpha_{2}$ . Agonist activation of the  $\delta$ -OR enhances coupling between RGS4 with Gi $\alpha_2$ , whereas it attenuates RGS4-Gi $\alpha_{1,3}$  association. In contrast to agonist stimulation, AMF treatment forces RGS4 to couple with all G $\alpha$  subunits tested. These results suggest that a) the  $\delta$ -OR by being constitutive active may allow a specific subset of  $G\alpha$  subunits to interact with RGS4 in the absence of agonist; b) the agonist-activated  $\delta$ -OR promotes selective RGS4-G $\alpha$  interactions different than those produced by the presence of AMF, which is a more generic G protein activator. These data demonstrate that RGS4 can dynamically regulate  $\delta$ -OR selectivity for specific  $G\alpha$  subunits even in the absence of agonist. They also suggest that the potency of selectivity with which RGS4 interacts with Gi $\alpha_2$  can change in response to agonist-stimulation of the  $\delta$ -OR. To our knowledge this is the first indication for an RGS-driven selection coupling with a specific G protein population depending on the presence or the activation state of a given receptor in living cells. Previous results have demonstrated using two-hybrid approaches that GAIP shows strong interaction with Gi<sub>1</sub>, Gi<sub>3</sub>, Go<sub>1</sub> and weak interaction with Gi<sub>2</sub> [33], whereas using  $\alpha$ 2A-adrenoreceptor-G protein fusions it was shown that RGS4 selectively enhances the GTPase activity of  $Go\alpha_1$ and  $Gi\alpha_2$  upon receptor stimulation [34]. However, these studies do not address whether selectivity of these interactions can be achieved by the activation state of the receptors.

Intracellular localization of RGS proteins is critical for their functional properties [11,22,35,36]. Most of the B/R4 family members of RGS proteins are localized to subcellular compartments distinct from the plasma membrane. Our immunofluorescence studies in HEK293 cells indicate that the majority of RGS4 was localized to the cytosol and the nucleus and diffusely associated to the plasma membrane, thus confirming previous studies [22,37-39]. Agonist stimulation of both opioid receptors led to the translocation of RGS4 to the plasma membrane where it co-localized with both surface receptors. No colocalization was detected in the resting state of the µ-OR; however, in the case of  $\delta\text{-OR}$  , a fraction of RGS4 can be found to co-localize with the  $\delta\text{-OR}$ in the cytosol. A possible explanation for this result could be that the amount of constitutive active  $\delta$ -ORs present in HEK293 cells are beginning to internalize earlier due to the presence of RGS4 as demonstrated in our flow cytometry measurements. Co-localization of RGS4 with the accelerated internalized  $\delta$ -OR was detected in the cytoplasm after 15 min DSLET stimulation. We can thus conclude that RGS4 distribution is not influenced by the expressed opioid receptor but mainly by the activation state of these receptors. Our findings are in accordance with previous observations indicating that RGS4 is indirectly recruited to the plasma membrane by G protein activation and only a relatively small proportion of cellular RGS4 is membrane-bound at any given time [37]. Other findings have shown that co-expression of RGS4 with the M2 muscarinic receptor led to recruitment of RGS4 to the plasma membrane independent of agonist or  $G\alpha$  protein activation [22]. Thus distribution of RGS4 to the plasma membrane and the cytosol is a regulatory mechanism that can be modulated not only by GPCRs but also by other signaling components that merit further investigation.

The N-terminal domain of RGS4, which contains an amphipathic  $\alpha$ helix and two palmitoylation sites, has been demonstrated to play a significant role both in targeting the protein to the membrane, to participate in GPCR recognition and to be responsible for RGS inhibition of G protein activation and signaling [25,35,38–40]. Our *in vitro* experiments demonstrated that deletion of the N terminus of RGS4 resulted in complete loss of RGS4 association with both opioid receptor C termini. In accordance with our findings it was shown that the N terminus of RGS2 is responsible for association with the third intracellular loop of M1 muscarinic and  $\alpha_{1A}$  adrenergic receptors [12,13]. Additional studies have also shown that N-terminal mutants of RGS4 and RGS16 abrogate their interactions with the plasma membrane and alter their subcellular localization [23,38]. Knowing that the RGS domain alone is capable of binding G $\alpha$  subunits and accelerate GTP hydrolysis we hypothesized that the 4Box domain complexed with G $\alpha$ subunits might display additional interactive sites within the C-termini of the opioid receptors. Our results indicated that the GDP-AIF<sup>-4</sup>-G $\alpha$ promotes a high affinity complex with 4Box capable to bind to the  $\mu$ -CT and form a heterotrimeric complex. In support with these findings previous observations have shown that the 4Box inhibited Ca<sup>2+</sup> signaling by the muscarinic 3 and cholocystokinin receptors equivalently [23]. These results suggest that both N and C termini of RGS4 combine to yield the behaviour of the intact protein.

RGS4 protein was shown to accelerate the inactivation of  $G\alpha$  subunits and to have an antagonistic effect on effectors, we therefore examined whether RGS4 expression in HEK293 cells modulates  $\mu$ - and  $\delta$ opioid receptor signaling. Opioid receptors stimulate ERK1/2 activity via PTX-sensitive and insensitive G protein signaling mechanisms [17,24] and growing evidence indicates that RGS proteins, and among them RGS4, are implicated in MAPK signaling through GPCRs [41-44]. In the present study, we also demonstrate that RGS4 presence attenuates MAPK phosphorylation of both activated  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs. This inhibitory effect was fully reversed when the cells express the mutant  $\Delta$ NRGS4, suggesting that the NH2 domain plays a critical role in G protein inactivation cycle. The fact that N-terminal truncated RGS4 does not inhibit opioid agonist-induced MAPK activation can be explained by its inability to be recruited to the membrane. Similarly the N-terminal truncated mutant of RGS4 had no effect in modulating adenylyl cyclase inhibition induced by the activated µ-OR, thus reinforcing the functional significance of this domain for opioid receptor signaling. In accordance with our findings the N-terminus of RGS4 was required for high affinity and receptor selective inhibition [23], for modulating pheromone signaling in yeast [35] and for Kir3 channels deactivation [45].

Opioid analgesia and tolerance development involve complex cellular and molecular mechanisms as a result for the loss of membrane surface opioid receptors [46,47]. In view of these considerations someone would think that RGS proteins may be implicated in opioid receptor internalization. Indeed, recent studies have shown that GAIP facilitated  $\delta$ -OR internalization and recycling via clathrin-coated vesicles [48], whereas RGS14 prevented morphine-induced  $\mu$ -OR phosphorylation and internalization in mice neurons [49], and RGS9-2 expressed in PC12 cells delays agonist-mediated internalization fate indicated that the presence of RGS4 accelerated the early rate of the  $\delta$ -OR endocytosis, whereas, on the other hand,  $\Delta$ NRGS4 was unable to regulate the endocytotic pathway of the  $\delta$ -OR. Thus, demonstrating that indeed the RGS4-N-terminus possesses a significant functional key role in opioid receptor mediated signaling.

Collectively, we have provided evidence for the function and selectivity of RGS4 in regulating  $\mu$ - and  $\delta$ -OR signaling that lies in its ability to interact with Gi $\alpha$  and Go $\alpha$  subunits in addition to the opioid receptors. Differential RGS4-G $\alpha$  complex formation at the cytoplasmic face of  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs promoted by opioid-agonist stimulation seems to define signaling selectivity at a higher level than that of simple receptor-RGS4 protein interaction. Finally, it was demonstrated that RGS4 plays a critical role in  $\delta$ -OR internalization which can form the basis for the possible effects RGS4 may exert in opioid tolerance. We can therefore conclude that RGS4 can be an attractive target to selectivity and duration of action of opioids in order to prevent the adverse effects of tolerance and dependence.

### Acknowledgments

This work was supported by the EU grant «Normolife» (LSHC-CT2006-037733) and the General Secretariat of Research and Technology, Greek Ministry of Development.

### References

- [1] P.Y. Law, Y.H. Wong, H.H. Loh, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000) 389.
- [2] G. Mazarakou, Z. Georgoussi, J. Neurochem. 93 (2005) 918.
- [3] Z. Georgoussi, C. Carr, G. Milligan, Mol. Pharmacol. 41 (1993) 62.
- [4] Z. Georgoussi, G. Milligan, C. Zioudrou, Biochem. J. 306 (1995) 71.
- [5] J. Garzon, A. Garcia-Espana, P. Sanchez-Blazquez, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281 (1997) 549
- [6] A.E. Brady, L.E. Limbird, Cell. Signal. 14 (2002) 297.
- [7] L. De Vries, B. Zheng, T. Fischer, E. Elenko, M.G. Farquhar, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000) 235.
- [8] S. Hollinger, J. R Hepler, Pharmacol. Rev. 54 (2002) 527.
- [9] T.M. Wilkie, L. Kinch, Curr. Biol. 15 (2005) R843.
- [10] P. Chidiac, A.A. Roy, Recept. Channels 9 (2003) 135.
- [11] K.L. Neitzel, J.R. Hepler, Semin. Cell Dev. Biol. 17 (2006) 383.
- [12] L.S. Bernstein, S. Ramineni, C. Hague, W. Cladman, P. Chidiac, A.I. Levey, J.R. Hepler, J. Biol. Chem. 279 (2004) 21248.
- [13] C. Hague, L.S. Bernstein, S. Ramineni, Z. Chen, K.P. Minneman, J.R. Hepler, J. Biol. Chem. 280 (2005) 27289.
- [14] M. Schwendt, J.F. McGinty, J. Pharmacol. Exp. Ther. 323 (2007) 650.
- [15] Z. Georgoussi, L. Leontiadis, G. Mazarakou, M. Merkouris, K. Hyde, H. Hamm, Cell. Signal, 18 (2006) 771.
- S. Popov, K. Yu, T. Kozasa, T.M. Wilkie, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 7216. [16]
- [17] E. Morou, Z. Georgoussi, J. Pharmacol. Exp. Ther. 315 (2005) 1368.
   [18] M. Merkouris, I. Mullaney, Z. Georgoussi, G. Milligan, J. Neurochem. 69 (1997) 2115.
- [19] D.E. Keith, S.R. Murray, P.A. Zaki, P.C. Chu, D.V. Lissin, L. Kang, C.J. Evans, M. von Zastrow, J. Biol. Chem. 271 (1996) 19021.
- [20] M. Merkouris, I. Dragatsis, G. Megaritis, G. Konidakis, C. Zioudrou, G. Milligan, Z. Georgoussi, Mol. Pharmacol. 50 (1996) 985.
- [21] Z. Georgoussi, M. Merkouris, I. Mullaney, G. Megaritis, C. Carr, C. Zioudrou, G. Milligan, Biochim. Biophys. Acta 1359 (1997) 263.
- A.A. Roy, K.E. Lemberg, P. Chidiac, Mol. Pharmacol. 64 (2003) 587.
- W. Zeng, X. Xu, S. Popov, S. Mukhopadhyay, P. Chidiac, J. Swistok, W. Danho, K.A. Yagaloff, S.L. Fisher, E.M. Ross, S. Muallem, T.M. Wilkie, J. Biol. Chem. 273 (1998) [23] 34687
- [24] M.M. Belcheva, P.D. Haas, Y. Tan, V.M. Heaton, C.J. Coscia, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303 (2002) 909.
- [25] G.X. Xie, P.P. Palmer, Anesth. Analg. 100 (2005) 1034.

- [26] Z. Georgoussi, in: F. Ciruela, R. Lujan (Eds.), Molecular Aspects of G Protein-Coupled Receptors, Nova Science Publishers, Inc, 2008, p. 169.
- [27] G. Milligan, Neuromolecular Med. 7 (2005) 51.
- [28] F. Jeanneteau, O. Guillin, J. Diaz, N. Griffon, P. Sokoloff, Mol. Biol. Cell, 15 (2004) 4926
- [29] E.P. Marin, A.G. Krishna, T.A. Zvyaga, J. Isele, F. Siebert, T.P. Sakmar, J. Biol. Chem. 275 (2000) 1930.
- [30] G. Megaritis, M. Merkouris, Z. Georgoussi, Recept. Channels 7 (2000) 199.
- [31] P.H. Tso, Y.H. Wong, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 30 (2003) 307.
- [32] P.L. Prather, T.M. McGinn, L.J. Erickson, C.J. Evans, H.H. Loh, P.Y. Law, J. Biol. Chem. 269 (1994) 21293
- [33] L. De Vries, E. Elenko, L. Hubler, T.L. Jones, M.G. Farguhar, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 15203.
- [34] A. Cavalli, K.M. Druey, G. Milligan, J. Biol. Chem. 275 (2000) 23693. [35] S.P. Srinivasa, L.S. Bernstein, K.J. Blumer, Linder, Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.
- 95 (1998) 5584.
- [36] S.P. Heximer, H. Lim, J.L. Bernard, K.J. Blumer, J. Biol. Chem. 276 (2001) 14195.
- [37] K.M. Druey, B.M. Sullivan, D. Brown, E.R. Fischer, N. Watson, K.J. Blumer, C.R.
- Gerfen, A. Scheschonka, J.H. Kehrl, J. Biol. Chem. 273 (1998) 18405. [38] T.K. Chatterjee, R.A. Fisher, J. Biol. Chem. 275 (2000) 24013.
- [39] L.S. Bernstein, A.A. Grillo, S.S. Loranger, M.E. Linder, J. Biol. Chem. 275 (2000) 18520
- G. Bansal, K.M. Druey, Z. Xie, Pharmacol. Ther. 116 (2007) 473. [40]
- [41] K.M. Druey, K.J. Blumer, V.H. Kang, J.H. Kehrl, Nature 379 (1996) 742.
- [42] Y. Yan, P.P. Chi, H.R. Bourne, J. Biol. Chem. 272 (1997) 11924.
- [43] A.M. Leone, M. Errico, S.L. Lin, D.S. Cowen, J. Neurochem. 75 (2000) 934.
- [44] T. Anger, N. Klintworth, C. Stumpf, W.G. Daniel, U. Mende, C.D. Garlichs, J. Biochem. Mol. Biol. 40 (2007) 899.
- C. Jaen, C.A. Doupnik, J. Biol. Chem. 281 (2006) 34549. [45]
- [46] B.L. Kieffer, C.J. Evans, Cell 108 (2002) 587.
- [47] J.T. Williams, M. Christie, O. Manzoni, Physiol. Rev. 81 (2001) 299.
- E. Elenko, T. Fischer, I. Niesman, T. Harding, T. McQuistan, M. Von Zastrow, M.G. [48] Farquhar, Mol. Pharmacol. 64 (2003) 11.
- [49] M. Rodríguez-Munoz, E. de la Torre-Madrid, G. Gaitán, P. Sánchez-Blázquez, J. Garzón, Cell. Signal. 19 (2007) 2558.
- [50] K. Psifogeorgou, P. Papakosta, S.J. Russo, R.L. Neve, D. Kardassis, S.J. Gold, V. Zachariou, J. Neurochem. 103 (2007) 617.



Available online at www.sciencedirect.com





Cellular Signalling 18 (2006) 771 - 782

www.elsevier.com/locate/cellsig

# Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the $\mu$ - and $\delta$ -opioid receptors regulate opioid receptor signaling

Zafiroula Georgoussi<sup>a</sup>, Leonidas Leontiadis<sup>a</sup>, Georgia Mazarakou<sup>a</sup>, Manolis Merkouris<sup>a</sup>, Karren Hyde<sup>b</sup>, Heidi Hamm<sup>b,\*</sup>

> <sup>a</sup> Laboratory of Cellular Signaling and Molecular Pharmacology, Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos" Ag. Paraskevi 15310, Athens, Greece
>  <sup>b</sup> Department of Pharmacology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232-6600, USA

> > Received 23 June 2005; accepted 11 July 2005 Available online 24 August 2005

### Abstract

To define receptor subdomains important for protein interaction and identify components of novel signal transduction complexes for the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors ( $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR), we generated glutathione S-transferase fusion proteins of the carboxyl-termini of the  $\mu$ -opioid receptor ( $\mu$ -CT), the  $\delta$ - ( $\delta$ -CT), and the third intracellular loop of the  $\delta$ -opioid receptor ( $\delta$ -i3L) to search for interactive proteins. Results from pull down experiments have demonstrated for the first time that G $\beta\gamma$  complexes, derived from the heterotrimeric G $\alpha$ t $\beta$ 1 $\gamma$ 1, purified G $\beta$ 1 $\gamma$ 1, or G $\beta$  endogenously present in cell lysates and rat striatal extracts, interact with all  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor subdomains. On the other hand, the C-terminal peptides of the  $\delta$ - and the  $\mu$ -ORs exhibit differential profiles for G $\alpha$  subunit binding. Indeed, while  $\mu$ -CT was unable to bind any form of G $\alpha$ , both the  $\delta$ -i3L displayed interactive regions for heterotrimeric G $\alpha$ t $\beta$ 1 $\gamma$ 1, inactive G $\alpha$ <sub>GDP</sub> and active G $\alpha$ <sub>GTP $\gamma$ S</sub>. Regulators of G protein signaling (RGS) proteins are another class of proteins that can modulate G protein signaling events. We demonstrate for the first time that RGS4 directly interacts with the  $\mu$ -CT as well as  $\delta$ -i3L in a dose dependent manner. Moreover, RGS4 modulates  $\mu$ -ORs provide direct physical scaffolding in which G protein subunits and RGS4 protein can be bound. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: µ-, δ-opioid receptors; Ga, Gβγ subunits; RGS proteins; Signaling complex; GST fusion peptides

\* Corresponding author.

E-mail address: heidi.hamm@vanderbilt.edu (H. Hamm).

### 1. Introduction

All three opioid receptor subtypes ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) belong to the superfamily of G protein coupled receptors (GPCRs), and mediate the actions of endogenously produced opioid neuropeptides and exogenously administrated opiate drugs. Opioid receptors mediate their responses in the nervous system via coupling to members of the Gi/Go proteins [1] and their activation results in adenylyl cyclase inhibition and/or the regulation of various ion channels and other effector systems [2,3]. Extended observations in respect to opioid receptor signaling mechanisms have demonstrated that the cytoplasmic face of these receptors, and particularly

*Abbreviations:* GPCRs, G protein coupled receptors; GST, glutathione S-transferase; μ-CT, GST fusion of the C-terminal region of the μ-opioid receptor; δ-CT, GST fusion of the C-terminal region of the δ-opioid receptor; δ-i3L, GST fusion of the third intracellular loop of the δ-opioid receptor; μ-OR, μ-opioid receptor; δ-OR, δ-opioid receptor; GTPγS, guanosine 5' -3-O-(thio)triphosphate; GDP, guanosine diphosphate; RGS, regulators of G protein signaling; GAP, GTPase-activating protein; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecylsulfate; IPTG, isopropylthio-β-galactoside; DAMGO, [D-Ala<sup>2</sup>,MePhe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]enkephalin; DTT, dithiothreitol; HA, hemagglutinin; mAChR, muscarinic acetylcholine receptor; i3, intracellular third loop; PLC, phospholipase C; HEK293, human embryonic kidney.

<sup>0898-6568/\$ -</sup> see front matter  $\mathbbm{C}$  2005 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.cellsig.2005.07.003

the third intracellular loop and the COOH-tails, are critical in mediating the signal through the interaction with G proteins. Indeed, previous observations using receptor derived peptides from predicted regions of the  $\delta$ -opioid receptor have shown that the third intracellular loops and the juxtamembranous region of the C-terminal tail of the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors are critical for functional receptor-G protein interaction [4–6]. These observations have confirmed that there are different determinants for receptor-G protein coupling and G protein activation.

The COOH-termini of all three opioid receptors have the same size, but exhibit a variability in amino acid composition with one region close to the seven transmembrane domain which forms an additional fourth loop by a conserved palmitoylated cysteine residue [3]. Mutagenesis and deletion studies of the COOH-termini of the  $\mu$ - and  $\delta$ receptors have shown that this region is the target for various kinases [2] and plays a key role for agonistdependent phosphorylation [7], therefore it is believed that this region is involved in the regulation of cellular compartmentalization, desensitization and in other signaling mechanisms. In order to map opioid receptor subdomains important for protein interaction and to begin to identify the components of a putative signal transduction complex mediated by the intracellular domains of the opioid receptors, we initially focused on the COOH termini and the third intracellular loop of the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors and generated GST fusion peptides from these domains to be used as affinity matrices for screening interacting partners in pull down experiments.

Much attention has been paid recently to the functional consequences of  $G\beta\gamma$  binding to various intracellular domains of GPCRs. It is believed that interaction of  $G\beta\gamma$  with the intracellular domains of the receptors may facilitate the interface of GPCRs to diverse signaling pathways. Direct interaction of  $G\beta\gamma$  with the i3 loop of the M2- and M3-muscarinic receptors has been reported [8]. However, up to now direct interaction of these complexes with the opioid receptors has not been demonstrated and therefore our first approach was focused in determining whether direct binding of  $G\beta\gamma$  subunits complexes to the intracellular domains of the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors exist. In addition we demonstrate the differential binding of the G $\alpha$  subunits to the C-terminal tails of both  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs.

Another class of proteins, that can directly interact with GPCRs and serve as scaffolds regulating their function, is the RGS proteins. RGS isoforms can act upon members of Gi/Go classes of heterotrimeric G proteins [9,10] that mediate the physiological effects of opioid receptors. Recent observations reveal that RGS proteins integrate, by association, G proteins in signaling pathways linked to such diverse cellular responses as cell growth and differentiation, cell motility, and intracellular trafficking, indicating that RGS proteins play fundamental roles in physiology and disease [11-13]. Regulation of RGS proteins by chronic morphine treatment in rat locus coeruleus has been reported

[14] and opioid agonists have been proposed to up-regulate RGS4 mRNA levels in PC12 cells which might contribute to opioid desensitization [15]. RGS2 and RGS9 have been shown to attenuate signaling by  $\mu$ -opioid receptor [16], whereas recombinant RGS4 has been shown to blunt the inhibitory effect of [Leu]-enkephalin, acting via the  $\delta$ -opioid receptor on cAMP accumulation in NG108-15 membranes [17]. These results indicate that RGS proteins and particularly RGS4 could potentially modulate opioid receptor signaling pathways, however, the function and the structural determinants responsible for such regulatory mechanisms are still unknown. Therefore our second approach was focused on defining whether RGS4 preferentially binds to specific intracellular regions of the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. Our results demonstrate for the first time that RGS4 a) interacts with both  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors, b) forms stable complexes with the  $\mu$ -CT and active G $\alpha$ t and c) modulates DAMGO-mediated adenylyl cyclase inhibition in HEK293 cells.

### 2. Experimental procedures

### 2.1. Purified proteins

Transducin heterotrimer or individual G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  subunits were purified from bovine retina as described [18]. Preparation of recombinant histidine tagged (6xHisRGS4) and the RGS domain of RGS4 (4Box) were purified after expression in *Escherichia coli* (BL21-SI) from the pQE60 vectors (kindly provided by Dr T. Wilkie, University of Texas, TX, USA) as described in Ref. [19]. Gi $\alpha$  and Gio protein subunits were purified as described previously [20].

### 2.2. Preparation of fusion constructs

GST fusion protein constructs for the COOH-termini and the intracellular loop of the opioid receptors were generated from cDNA clones of the rat  $\mu$ - and mouse  $\delta$ -opioid receptors generously provided by Dr G. Bell, Chicago, IL, USA. For the production of the fusion protein the following oligonucleotides a) COOH µ-OR-GST-5' -CAC CAG CTG CCT GAA TCC AGT TCT TTA C-3' and 5' -TTA GGG CAA TGG AGC AGT TTC TGC CTC-3, b) i3loop  $\delta$ -OR-GST-5' -CAC CCG CCT GCG CAG CGT-3' and 5' -CTA GCG CGT GAT GCG CCG CAG-3' and finally c) COOH δ-OR-GST-5' -CAC CAG CAG CCT CAA CCC GGT TCT CTA-3' and 5' -TCA GGC GGC AGC GCC ACC-3' were designed for PCR using the directional TOPO cloning procedure following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Positive transformants were transferred from Entry Clones to the Destination Vector pDest-15 for N-terminal GST fusion expression from a T7 promoter, using the Gateway Cloning System. Transformation was carried out using DH5 $\alpha$  cells and all positive clones were verified by nucleotide sequence analysis.

### 2.3. Protein expression

Positive clones were transformed in E. coli (BL21-SI) cells for protein expression (Invitrogen). 500 ml of LB media with ampicillin (100 µg/ml) were inoculated with an overnight culture started from a single colony. GST fusion proteins were induced with arabinose (0.2%) at  $OD_{600} = 0.6$ cultures and shaken at 37 °C for 3–4 h. Thereafter, cells were pelleted, lysed by freezing, sonicated with 20 ml PBS buffer pH 7.6 containing 1% Triton, 0.2 mM PMSF, 20 µg/ml leupeptin and antipain and a protease inhibitor cocktail (Complete Roche Diagnostics), and incubated under rotation at 4 °C for 1 h. Soluble protein was obtained after centrifugation at 150,000 rpm for 1 h at 4 °C. Glycerol (50%) was added to the Triton-supernatant and the lysates were stored in -20 °C. In order to purify the fusion peptides, 1-ml aliquots of the glycerol lysates were immobilized to 50 µl of a 50% glutathione-sepharose (Amersham Biosciences) slurry in PBS and after incubation and extensive washing with PBS and 0.1% Igepal. Fusion proteins were eluted from the affinity matrix and resolved by 10% or 10-20% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Coomassie Blue staining (Fig. 1).

# 2.4. In vitro binding of GST fusion proteins (GST pull down assays)

0.5 ml of PBS containing protease inhibitor mixture Complete (Roche Diagnostics), 0.2 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml leupeptin and 20  $\mu$ g/ml antipain, was added to 200–500  $\mu$ l of the GST glycerol lysates (to yield a final concentration of 0.5–1  $\mu$ M) and were immobilized on glutathione–Sephar-

### Α

### COOH-termini

Rat-µ: 329 SCL*NPVLYAFLDENFKRCFR*EFCIPTSSTIEQQNSTRVRQNTREHPS TANTVDRTNHQLENLEAETAPLP 398

**Mouse-δ:** 311 SSL*NPVLYAFLDENFKRCFR*QLCRAPCGGQEPGSLRRPRQATARER VTACTPSDGPGGGAAA 372

Third intracellular loop

Rat -µ: 258 RLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITR 280 Mouse -8: 239 RLRSVRLLSGSKEKDRSLRRITR 261



Fig. 1. Generation of opioid receptor subdomain GST fusion proteins. (A) Alignment and amino acid composition of the COOH-tails and the third intracellular loop of the  $\delta$ - and  $\mu$ -ORs. Carboxyl-terminal tails: in italics are indicated the amino acid similarities between the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. Third intracellular loops: In bold are indicated the amino acid differences between the two receptor subtypes. B, C. Peptides corresponding to segments of  $\delta$ -i3L and the rat  $\mu$ -CT and mouse  $\delta$ -CT were generated as fusion proteins in bacteria and cell lysates were purified using a glutathione affinity matrix as described under Experimental procedures. Proteins were electrophoresed on denaturing PAGE (12.5%), and visualized by Coomassie staining (B), or western blotting (C) using a GST antibody (1:5000, Santa Cruz, Biotechnology). Numbers at the left represent the migration position of prestained molecular mass standards in kilodaltons. The molecular weights for the GST fusions were for the  $\mu$ -CT 35,000 Da, for the  $\delta$ -CT 33,000 Da, for the  $\delta$ -i3L 31,000 Da, and for the GST alone 29,000 Da.

ose 4B beads (50  $\mu$ l of pre-equilibrated 1:1 glutathione– sepharose slurry) in PBS. The mixture was washed three times with 0.5 ml of PBS, and the immobilized fusion proteins were incubated with purified proteins (0.5–2  $\mu$ M) for 45 min at room temperature to a final volume of 100 or 200  $\mu$ l PBS. The GST-slurry with the bound proteins was subsequently washed four times with 500  $\mu$ l PBS and 0.1% Igepal and bound proteins were eluted with 20  $\mu$ l of Laemmli loading buffer, boiled and resolved by SDS-PAGE (10–20%).

### 2.5. Cell cultures and transient transfection

COS-7 and/or HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 10% bovine serum. Transfections were performed on 80% confluent monolayers in 100 mm dishes. Rat  $\mu$ -opioid receptor (3  $\mu$ g) and HA-RGS4 (3  $\mu$ g) c-DNAs were transiently transfected in COS-7 cells using lipofectamine according to the manufacturer's instructions. Assays were performed 48–72 h after transfection.

### 2.6. Western blotting

Protein samples were subjected to gradient 10-20% or 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then electroblotted to Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked with 5% milk, PBS, 0.1% Triton for 30 min followed by an overnight incubation with the appropriate antibody. Bound proteins were visualized using antisera that specifically recognize the purified

proteins followed by horseradish-peroxidase-coupled secondary antibodies as described in Ref. [21]. Detection was performed with enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham) using either X-ray FUJI film or a Fluor-S Imager (Bio-Rad).

### 2.7. Measurements of cAMP accumulation

Measurements of adenylyl cyclase activity were performed as described previously [4]. Briefly, COS-7 cells, transiently transfected with the  $\mu$ -OR and HA-RGS4 as described above, were split to 12-well plates and incubated in a medium containing [<sup>3</sup>H] adenine (1.5  $\mu$ Ci/well) for 24 h. The generations of [<sup>3</sup>H] cAMP in response to treatment of the cells with various concentrations of DAMGO were then assessed. Results are calculated as the ratio of levels of [<sup>3</sup>H] cAMP to total [<sup>3</sup>H] adenine nucleotides (×1000) and the data are shown as percentage inhibition of forskolinstimulated cells.

### 3. Results

### 3.1. $G\beta\gamma$ complexes bind to the carboxyl-termini of the $\mu$ and $\delta$ -opioid receptors

The carboxyl-terminal tails of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs are 69 and 61 amino acids in length respectively and represent the largest intracellular domains of these receptors (Fig. 1, upper panel). The juxtamembrane segments of the third intracellular loop and the COOH-tail close to the VII membrane span of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs have been shown to be critical for coupling and G protein activation [5,22] and participate in receptor desensitization [23] and other aspects of signaling [24,25]. In an attempt to define whether these intracellular domains of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs serve as contact sites for  $G\beta\gamma$  complexes, or other signaling molecules the C-terminal regions (Ser<sup>329</sup>-Pro<sup>398</sup>) and (S<sup>311</sup>-A<sup>372</sup>) of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs respectively and the third intracellular loop of the  $\delta$ -OR (R<sup>239</sup>-R<sup>261</sup>) were constructed as GST fusion proteins termed  $\mu$ -CT,  $\delta$ -CT and  $\delta$ -i3L respectively. These GST fusion proteins were expressed in bacteria and purified with a glutathione-Sepharose column to near homogeneity (Fig. 1, lower panel).

Gβγ subunits of G protein play a leading role in transducing signals in many cellular contexts using different effectors [26], however, little is known which role the Gβγ complexes play in opioid receptor signaling and whether these proteins can directly interact with these receptors. Thus, initially we observed whether the Cterminal tails of the μ- and δ-ORs are capable of binding Gβγ complexes in vitro. For this reason the COOHterminal peptides of the μ- and δ-ORs, as well as the third intracellular loop of the δ-OR, were bound to a glutathione–Sepharose matrix and incubated with bovine retinal heterotrimeric Gt protein (Gαtβ1γ1) or purified Gβ1γ1 complexes. The resin was washed, and retained proteins were resolved by SDS/PAGE and subsequent immunoblotting with an anti-G $\beta$  antibody. As shown in Fig. 2 (upper panel), incubation of the  $\mu$ -CT with increasing concentrations of G $\beta$ 1 $\gamma$ 1, or heterotrimeric transducin followed by immunoblotting, recognized a 36 kDa polypeptide corresponding to G $\beta$  for both transducin and the dimeric purified G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 complexes. There was an increase in G $\beta$ binding as more G $\beta\gamma$  complex was added. In contrast, no detectable band was observed in pull downs using GST alone as control (Fig. 2, lanes 5, 6 and 10, 11).

To define whether the C-terminal tail of the  $\delta$ -OR also interacts with G $\beta\gamma$  complexes, similar pull down experiments were performed using equal amounts of the GST fusion encompassing the  $\delta$ -CT. As shown in Fig. 2 (middle panel),  $\delta$ -CT binds in a concentration dependent manner G $\beta\gamma$  complexes either from heterotrimeric Gt or purified G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 after immunoblotting with a G $\beta$  antibody, compared to GST alone where no binding was detected.

Since both C-terminal tails of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs interact effectively with G $\beta$ 1 $\gamma$ 1, we wondered whether other intracellular parts of these receptors also participate in G $\beta\gamma$ binding. Both  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs share a high degree of similarity within their third intracellular loops, we therefore used the fusion protein corresponding to the  $\delta$ -i3 loop. Pull down experiments using this  $\delta$ -i3L domain and either G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 complexes or G $\alpha$ t $\beta$ 1 $\gamma$ 1 demonstrated that G $\beta\gamma$  complexes are also capable of interacting with this receptor subdomain as compared to GST alone (Fig. 2, lower panel, compare lanes 2–4, 7, 9 with lanes 5, 6 and 8 respectively). These results demonstrate that the i3L together with the C-terminal domains of the  $\delta$ - and the  $\mu$ -ORs bind with G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 and provide the first biochemical evidence for the direct interaction between the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs with G $\beta\gamma$  complexes.

The direct interaction of the C-terminal peptide of the µ-OR with  $G\beta\gamma$  was also verified in pull down experiments using endogenous GB present in COS-7 cell lysates. Experiments using whole COS-7 cell extracts transiently expressing the µ-OR following DAMGO administration for 5 or 15 min showed binding of endogenous GB with the  $\mu$ -CT (Fig. 3, upper panel). Binding of  $G\beta\gamma$  to the  $\mu$ -CT was independent of time and agonist exposure (compare lanes 4 with 5 and 6). In contrast parallel pull down experiments using empty GST were unable to bind  $G\beta\gamma$  from the same cell lysates (lanes 1-3). Since brain GBy complexes consist mainly of  $\beta 1\gamma 2$  isoforms and in attempt to provide additional evidence for the role the  $\gamma$  subunit might play in the recognition of  $G\beta\gamma$  complex by the  $\mu$ -CT, or to other intracellular domains of the  $\delta$ -opioid receptor, similar pull down experiments were performed using purified brain  $G\beta 1\gamma 2$  and rat striatal membranes. As shown in Fig. 3 (lower panel), pull down experiments employing either purified  $G\beta 1\gamma 2$  complexes, or striatal membranes, which endogenously contain  $G\beta\gamma$ , with either the  $\delta$ -i3L, or the  $\delta$ - and  $\mu$ -CT peptides demonstrated the direct interaction of  $G\beta 1\gamma 2$ complexes with all opioid receptor subdomains. As brain Z. Georgoussi et al. / Cellular Signalling 18 (2006) 771-782



Fig. 2.  $G\beta\gamma$  from purified  $G\beta1\gamma1$  or heterotrimeric  $G\alphat\beta1\gamma1$  interacts with  $\mu$ -CT and  $\delta$ -CT and the  $\delta$ -i3L. Upper panel: the  $\mu$ -CT interacts with  $G\beta1\gamma1$  either from the purified complex  $G\beta1\gamma1$  or from the heterotrimeric transducin  $G\alphat\beta1\gamma1$ . A fixed amount (0.4  $\mu$ M) of GST- $\mu$ -CT was incubated with increasing amounts of  $G\beta1\gamma1$  (0.5–2  $\mu$ M). Lane (1), purified  $G\beta1\gamma1$ ; lanes (2–4), GST- $\mu$ -CT with  $G\beta1\gamma1$  at 0.5, 1 and 2  $\mu$ M respectively; lanes (5, 6) GST alone with  $G\beta1\gamma1$  at 1, and 2  $\mu$ M; lanes (7–9),  $\mu$ -CT with  $G\alphat\beta1\gamma1$  at 0.5, 1 and 2  $\mu$ M respectively; lanes (10, 11) GST alone with  $G\alphat\beta1\gamma1$  at 1 and 2  $\mu$ M; pull down experiments were performed as described in Experimental procedures. Experiments were repeated five times. Middle panel:  $\delta$ -CT binds  $G\beta1\gamma1$ . A fixed amount (0.2  $\mu$ M) of  $\delta$ -CT was incubated with increasing concentrations of  $G\beta1\gamma1$  and/or heterotrimeric  $G\alphat\beta1\gamma1$  (0.1–0.5  $\mu$ M). Lane 1, purified  $G\beta1\gamma1$ ; lanes 2–4,  $\delta$ -CT with  $G\beta1\gamma1$  at 0.1, 0.2 and 0.5  $\mu$ M respectively; lanes 5–7, GST alone with the same amounts of  $G\beta1\gamma1$  respectively; lanes 8–10,  $\delta$ -CT with  $G\alphat\beta1\gamma1$  at 0.1, 0.2 and 0.5  $\mu$ M respectively; lanes 11, 12 GST alone with 0.1 and 0.2  $\mu$ M  $G\alphat\beta1\gamma1$  respectively. Lower panel: The  $\delta$ -i3L binds to  $G\beta$  from  $G\beta1\gamma1$  and  $G\alphat\beta1\gamma1$ .  $G\beta1\gamma1$  interacts with the third intracellular loop of the  $\delta$ -opioid receptor. Lane, 1 purified  $G\beta1\gamma1$ ; lanes 2–4 correspond to the  $\delta$ -i3L peptide incubated with increasing concentrations of  $G\beta1\gamma1$  (0.1, 0.2, 0.5  $\mu$ M); lanes 5, 6 are GST alone with 0.1 and 0.2  $\mu$ M of  $G\alphat\beta1\gamma1$  respectively; lane 8 is GST alone with 0.1  $\mu$ M  $G\alphat\beta1\gamma1$ . The final concentrations of the GST and  $\delta$ -i3L fusions were 0.2  $\mu$ M. There is an increase in  $G\beta1\gamma1$  binding as more  $G\alphat\beta1\gamma1$  is added.  $G\beta$  was visualized with an anti-GS antibody (1:5000, T20 Santa Cruz, Biotechnology). The amount of GST fusions loaded was verified after stripping and reprobing with an anti-GST antibody (Santa Cruz at 1:5000).

and transducin  $G\beta\gamma$  complexes differ in their  $\gamma$  subunits [27], the  $\gamma$  subunit does not appear to play an important role in the recognition of  $G\beta\gamma$  complex by both  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs.

# 3.2. Differential binding of $G\alpha$ to the $\mu$ - and $\delta$ -ORs intracellular domains

Since  $G\beta 1\gamma 1$  binds to both  $\mu$ - and  $\delta$ -OR C-terminal tails and the  $\delta$ -i3L, we wanted to determine whether the same regions are targets for direct Ga binding. For that reason similar GST-pull down experiments were performed using the same fusion proteins and various forms of  $G\alpha t$ . As shown in Fig. 4A,  $\mu$ -CT was unable to bind heterotrimeric (lane 5), inactive  $G\alpha_{GDP}$  (lane 2), or active  $G\alpha_{GTPvS}$  (lane 7) at 1  $\mu M$  concentration of  $G\alpha_t$  used as assessed by immunoblotting with a  $G\alpha$  antibody. This indicates that any conformation of Gat failed to effectively interact with the  $\mu$ -CT. Similar observations were obtained when Gai, or Gao were used (Fig. 4A, lower panel). However when similar preincubations were performed using the immobilized  $\delta$ -CT with increasing concentrations of heterotrimeric Gat and GatGDP we were able to observe polypeptides corresponding to  $G\alpha$  after immunoblotting with a specific

anti-G $\alpha$ , indicating that this receptor subdomain binds in a dose dependent manner heterotrimeric Gt protein (Fig. 4B, left upper panel, lanes 2–4), inactive  $G\alpha t_{GDP}$  (Fig. 4B, lanes 2, 4 right upper panel), as compared with GST alone (Fig. 4B, left panel, lanes 5–7 and 3, 5 right panel).  $G\alpha t_{GTPvS}$  was also bound to  $\delta$ -CT with lower affinity than that observed for the inactive and heterotrimeric Gt (Fig. 4B, lower panel). To verify the specific G $\alpha$  binding within the  $\delta$ -CT we measured the ability of Gaq and Gas that do not couple with opioid receptors to interact with this domain. As shown in Fig 4C, the  $\delta$ -CT failed to interact with either Gag or Gas in pull down experiments using mouse brain membranes that contain these proteins. Similarly, µ-CT was unable to bind any Ga subunits derived from mouse brain membranes. These results suggest that the  $\delta$ -CT has the potential to differentiate between the various  $G\alpha$  subunits tested.

Since the C-terminal tails of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs display different profiles for G $\alpha$  subunit binding we sought to determine the ability of the  $\delta$ -i3L region to interact with G $\alpha$ t. When similar experiments were performed using the  $\delta$ i3L and either heterotrimeric transducin (Fig. 4D, left upper panel), inactive G $\alpha$ t<sub>GDP</sub> (Fig. 4D, right upper panel), or various low concentrations of active G $\alpha$ t<sub>GTP $\gamma$ S</sub> we were able



Fig. 3. Binding of endogenous  $G\beta\gamma$  complexes and brain  $G\beta1\gamma2$  to the  $\mu$ - and  $\delta$ -OR subdomains. Upper panel: the carboxyl-terminal tail of the  $\mu$ -OR binds endogenous  $G\beta\gamma$  complexes from COS-7 cells. Lysates of COS-7 cells, transiently transfected with the rat  $\mu$ -opioid receptor as described in Experimental procedures, were stimulated for 5 and 15 min with DAMGO (1  $\mu$ M), and incubated either with GST alone (Lanes 1–3), or the GST- $\mu$ -CT (Lanes 4–6). Lane 7 represents the presence of endogenous  $G\beta\gamma$  in COS-7 cell lysate (input). Proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti- $G\beta$  polyclonal antibody (T20, Santa Cruz). Left lower panel:  $G\beta1\gamma2$  complexes isolated from brain extracts as described by Mazzoni et al. [18] interact with the  $\mu$ -CT. Lanes 1 and 2 correspond to GST alone with  $G\beta1\gamma2$  at 2 and 1  $\mu$ M respectively; lanes 3 and 4,  $\mu$ -CT with  $G\beta1\gamma2$  at 2 and 1  $\mu$ M, and lane 5 represents purified  $G\beta1\gamma2$ . Right lower panel:  $\mu$ -CT (lane 3), or  $\mu$ -CT (lane 4), as described in Experimental procedures. Experiments were repeated at least three times. Bound proteins were analyzed with an anti- $G\beta$  antibody.

in all cases to detect a 39 kDa polypeptide corresponding to  $G\alpha$ , indicating the ability of the i3-loop peptide to interact with all conformations of  $G\alpha t$  as compared with that of GST alone where no binding was detected (Fig. 4D).

# 3.3. Direct interaction of RGS4 protein with the $\mu$ - and $\delta$ -ORs

Recent observations have demonstrated that RGS proteins can selectively interact with different GPCRs [12,28]. To elucidate whether RGS proteins can form complexes with the  $\mu$ - and/or the  $\delta$ -ORs subdomains, similar pull down experiments were performed using purified recombinant 6xhistidine tagged RGS4 (6xHis-RGS4). As shown in Fig. 5A, incubation of increasing concentrations of RGS4 with the immobilized  $\mu$ -CT, the  $\delta$ -CT and the  $\delta$ -i3L and subsequent immunoblotting with an anti-His monoclonal antibody identified a 26 kDa polypeptide indicating that  $\mu$ and  $\delta$ -OR subdomains interact in a dose dependent manner with RGS4 protein. In contrast, no corresponding band was observed when  $\mu$ -CT was incubated with another RGS protein, purified RGS9 $\Delta$ PSR/G $\beta$ 5, or GST alone (Fig. 5B,

Fig. 4. Differential binding of heterotrimetic G $\alpha$ t, inactive G $\alpha$ t-GDP, or active G $\alpha$ t-GTP $\gamma$ S to the  $\mu$ -CT, the  $\delta$ -CT and the  $\delta$ -i3L. A. Upper panel,  $\mu$ -CT does not bind to the heterotrimetic Gat, inactive Gat-GDP or active Gat<sub>GTPyS</sub>.  $\mu$ -CT was incubated with 1  $\mu$ M of heterotrimetic Gat (lane 2), Gat<sub>GDP</sub> (lane 5) and Gat<sub>GTPyS</sub> (lane 7). GST alone was used as control with 1 µM of heterotrimeric Gat (lane 3), Gat<sub>GDP</sub> (lane 6) and Gat<sub>GTPyS</sub> (lane 8) respectively. Lanes 1, 4, 9 (input) correspond to purified heterotrimeric transducin,  $G\alpha_{GDP}$  and  $G\alpha t_{GTP\gamma S}$  respectively. The concentrations of the GST and  $\mu$ -CT were estimated to be 0.4  $\mu$ M. Results are representative from five independent experiments. Lower panel,  $\mu$ -CT does not bind Ga<sub>o</sub> and Ga<sub>i</sub>. Purified Ga<sub>i</sub> (1  $\mu$ M) lane 1, heterotrimeric Gt (1  $\mu$ M) lane 2, and G $\alpha_0$  lane 7 (1  $\mu$ M) were incubated with  $\mu$ -CT (lanes 2, 5, 8), or GST alone (lanes 3, 6, 9) respectively. B. Heterotrimeric G $\alpha$ t $\beta$ 1 $\gamma$ 1 interacts with the  $\delta$ -CT in a dose dependent manner. A fixed amount of GST fusion of the  $\delta$ -OR was incubated with increasing amounts of G $\alpha$ t $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (0.25, 0.5 and 1  $\mu$ M), lanes 2–4, respectively; lanes 5–7 are GST alone using the same amounts of G $\alpha$ t $\beta$ 1 $\gamma$ 1. Lane 1 represents purified heterotrimeric Gt. Binding of  $G\alpha_{GDP}$  to the  $\delta$ -CT.  $G\alpha_{GDP}$  interacts with the COOH-tail of the  $\delta$ -OR in a dose dependent manner. A fixed amount of  $\delta$ -CT was incubated with  $G\alpha_{GDP}$  at 0.5 and 1  $\mu$ M respectively, lanes 2, 4; lanes 3 and 5 are GST with the same amounts of Ga<sub>GDP</sub> respectively used as controls. GatGTP<sub>Y</sub>S binds to the  $\delta$ -CT.  $\delta$ -CT was incubated with GatGTPyS (0.1, 0.2 and 0.5 µM lanes 2, 3, 4) or GST alone (lanes 5, 6), with the same amounts of GatGTPyS respectively. Ga was identified using an antibody (OC1 1:1000) generously provided by Dr G. Milligan, University of Glasgow, UK. C. &-CT does not interact with Gaq and Gas. &-CT was incubated with mouse brain membranes (100 µg) for 30 min at 4 °C in a total volume of 250 µl. The resin was washed and bound proteins were visualized by immunoblotting of membrane transfers following SDS-PAGE. The membrane transfers were incubated with anti-Gag and anti-Gas antibodies (1:1000, Santa Cruz) and then stripped and reprobed for GST antiserum. Lane 1 represents brain G protein without resin incubation. D. δ-i3L binds heterotrimetic Gαt, active and inactive Gat-GDP. Left panel:  $\delta$ -CT (0.2  $\mu$ M) was incubated with 0.25, 0.5 and 1  $\mu$ M of heterotrimeric Gat (lanes 2–4) or GST alone (lanes 5–7); lane 1 represents purified Gat. Right panel.  $\delta$ -CT was incubated with 0.25, 0.5 and 1  $\mu$ M of Gat<sub>GDP</sub> (lanes 2–4) or GST alone (lanes 5–7). Lane 1 represents purified Gαt<sub>GDP</sub> Gαt<sub>GTPvS</sub> binds to the third intracellular loop of the δ-OR. A fixed amount of GST-δ-i3L was incubated with Gαt<sub>GTPvS</sub> at 0.06, 0.12 and 0.25 μM respectively, lanes 2–4; lanes 5–7 are GST alone with the same amounts of  $G\alpha t_{GTP\gamma S}$  and lane 1 corresponds to purified  $G\alpha t_{GTP\gamma S}$ . The amounts of GST fusion used were verified after stripping and reprobing with an anti-GST antibody (Santa Cruz at 1:5000). Experiments were repeated at least four times.



lane 2). These results provide the first biochemical evidence demonstrating the direct binding of RGS4 protein with the intracellular domains of the  $\delta$ - and  $\mu$ -ORs.

Since all peptides encompassing selective domains of the  $\delta$ - and  $\mu$ -ORs bind RGS4 we concentrated our further studies on the  $\mu$ -CT. It is known that receptors promote G protein



Fig. 5. Direct binding of the RGS4 to the  $\mu$ - and  $\delta$ -OR subdomains. A. RGS4 interacts with the  $\mu$ -CT,  $\delta$ -CT and  $\delta$ -i3L. GST- $\mu$ -CT ( $(0.5\mu$ M) (lanes 2,3), GST- $\delta$ -CT (lanes 6,7), GST- $\delta$ -i3L ( $(0.2 \mu$ M) (lanes 8 and 9), or GST alone ( $(0.5\mu$ M) (lanes 4 and 5) were incubated with the indicated amount of RGS4 isolated from *E. coli* as described in Experimental procedures. Experiments were repeated at least four times. Bound proteins were analyzed using a His-monoclonal antibody (1:2500, Clontech). B. RGS9 does not interact with the  $\mu$ -CT. Purified RGS9 $\Delta$ PSR/G $\beta$ 5 (2  $\mu$ M) (lane 1) was incubated with  $\mu$ -CT (lane 2), or GST alone (lane 3) and reactions were processed as described in Experimental procedures. Results are representative of two individual experiments. C. The  $\mu$ -CT interacts with HA-RGS4 from COS-7 in an agonist-dependent manner. COS-7 co-transfected with the c-DNA expressing the  $\mu$ -OR and HA-RGS4 (3  $\mu$ g each), or with vector alone as described in Experimental procedures. 72 h post-transfection cells were stimulated or not with 1  $\mu$ M DAMGO for 5 min. Subsequently COS-7 cell lysates (500  $\mu$ g) challenged or not with DAMGO (lanes 4 and 3 respectively) were incubated for 30 min at room temperature with 1  $\mu$ M of the GST fusion protein encompassing the  $\mu$ -CT (lanes 2–4), or with GST alone (lanes 5–7). Protein complexes were washed, separated on 10% SDS-PAGE and detected for RGS4 bound with an anti-HA antibody. In the presence of DAMGO, RGS4 binds to  $\mu$ -CT (lane 4), whereas in its absence, RGS4 does not interact with the  $\mu$ -CT (lane 3). RGS4-expressing cell lysates did not interact with GST alone (lanes 6, 7). Lane 1 represents transfected COS-7 cell lysates with RGS4; lane 2 and lane 5 represent pull down of mock-transfected cells with  $\mu$ -CT and GST, respectively.

activation and that RGS proteins tend to bind with higher affinity to activated G proteins in vitro [29], we therefore anticipated that agonists would promote binding of RGS proteins to the plasma membrane by receptors. In order to investigate this possibility and provide additional evidence concerning the association of RGS4 with the µ-CT we tested the ability of RGS4 binding in a cellular context where a more native milieu and other signaling molecules of the opioid receptors participate. COS-7 cells were transiently transfected with the cDNAs expressing the HA-RGS4 and the rat µ-opioid receptor. Receptor expression assessed by <sup>3</sup>H]-diprenorphine binding showed the presence of  $1500 \pm 120$  fmol/mg of membrane protein (data not shown). Lysates of these cells were examined in pull down experiments using the immobilized  $\mu$ -CT, before and after stimulation for 5 min with DAMGO. As shown in Fig. 5C, HA-RGS4 interacts with the  $\mu$ -CT only in cells that have been stimulated with DAMGO (compare input lane 1, with lanes 3 and 4). Pull down experiments using either mock-transfected cell lysates, or GST alone did not display any RGS4 binding (lanes 2, 5–7). These results show that RGS4 binds to the  $\mu$ -CT in the context of cell lysates, which contains native proteins involved in signaling when the  $\mu$ -OR is activated, suggesting that the relative expression of the receptor and the RGS4 in COS-7 cells together with the presence of endogenous G proteins may allow a tight RGS4-µ-CT complex to be formed in the presence of opioid agonist.

### 3.4. Do RGS4 and $G\beta\gamma$ bind concurrently within the $\mu$ -CT?

Because RGS4 and G $\beta\gamma$  bind to the  $\mu$ -CT, we wondered whether these proteins use distinct or similar overlapping binding sites within the C-terminal domain of the  $\mu$ -OR. Keeping µ-CT and RGS4 concentrations constant we examined whether increasing amounts of  $G\beta\gamma$  could displace binding of RGS4 to the immobilized µ-CT. Indeed, as shown in Fig. 6, increasing concentrations of  $G\beta\gamma$ reduced RGS4 binding (upper panel, lanes 3-5); thus demonstrating competition for the same sites between these two proteins. Interestingly, when  $G\beta\gamma$  and RGS4 were at equimolar concentrations, GB showed a stronger binding to µ-CT than that observed in the absence of RGS4 (Fig. 6, middle panel, compare lane 5 with 6). Because there is a reduction of RGS4 and an increase in  $G\beta\gamma$  binding, the binding between these proteins seems to be competitive but not mutually exclusive, since there is always a residual RGS4 binding observed to the µ-CT.

### 3.5. Effect of RGS4 protein in $\mu$ -OR signaling

In an attempt to investigate the functional significance of the interaction between RGS4 and the  $\mu$ -OR we examined the ability of the expressed HA-tagged RGS4 to alter DAMGO-mediated adenylyl cyclase inhibition in HEK293 cells stably expressing the  $\mu$ -OR. As shown in Fig. 7,



Fig. 6. G $\beta\gamma$  competes with RGS4 binding to the  $\mu$ -CT. To assess whether there is a competition in binding between RGS4 and G $\beta\gamma$  for the  $\mu$ -CT, a fixed amount of  $\mu$ -CT was incubated for 20 min with 0.5  $\mu$ M of RGS4, lanes 2–5, followed by a 20 min incubation with increasing amounts of G $\beta1\gamma1$  (0.1, 0.2, 0.5  $\mu$ M), lanes 3–5. Lane 1 is purified RGS4 (0.2  $\mu$ M) and lane 8, purified G $\beta1\gamma1$  (0.25  $\mu$ M). Immunoblotting was performed as described in Experimental procedures. Proteins were visualized first employing an anti-His-monoclonal antibody then stripped and reprobed with an anti-G $\beta$  (1:5000, Santa Cruz).

expression of HA-RGS4 significantly reduced DAMGOmediated inhibition of forskolin-stimulated adenylyl cyclase as demonstrated by a significant shift at the right of the levels of cAMP accumulation observed in the presence of HA-RGS4 compared with the inhibition observed in its absence. Indeed, in control HEK293 cells transfected with vector alone, 50 nM DAMGO resulted in 55±1.5% inhibition of cAMP accumulation with an IC<sub>50</sub> of 3.2 nM, which was significantly attenuated in cells expressing HA-RGS4 (30±2%) with an IC<sub>50</sub> of 44 nM respectively. This reversed  $\mu$ -opioid agonist mediated inhibition of the cAMP accumulation could be attributed to the ability of RGS4 to block receptor and Gi/Go coupling to adenylyl cyclase.

### 3.6. RGS4 forms complexes with active $G\alpha$ and the $\mu$ -CT

Previous studies have demonstrated that GPCRs selectively recruit members of B/R4 subfamily of RGS proteins to modulate G protein signaling [12]. Moreover, it was recently shown that RGS2 could form stable heterotrimeric complexes with activated  $G\alpha q$  and the third loop of the M1muscarinic receptor [28]. In an attempt to examine whether similar complexes between the C-terminal tail of µ-OR and the RGS4 can be formed, we preincubated RGS4 and  $G\alpha t_{GDP}$  in the presence or absence of AlF<sup>-4</sup> and Mg<sup>2+</sup> (AMF). As demonstrated previously, we found that  $G\alpha t_{GDP}$ alone either in the presence or the absence of AMF did not associate with the  $\mu$ -CT (Fig. 8A, lanes 4, 5, upper panel), whereas RGS4 binds to the  $\mu$ -CT (Fig. 8A, lanes 2, 3, lower panel). However, when RGS4 and Gat<sub>GDP</sub> were preincubated together in the presence of AMF, and the same pull down was performed, we observed that  $G\alpha t$  interacts with the  $\mu$ -CT (Fig. 8A, lane 3). In contrast, when RGS4 and G $\alpha$ t were incubated in absence of AMF, no Ga associated with

the RGS4 bound to the  $\mu$ -CT (Fig. 8A, lane 2). Similar results were also obtained when G $\alpha$ i was employed in the case of G $\alpha$ t. Indeed, as demonstrated in Fig. 8B, G $\alpha$ i was bound to the  $\mu$ -CT only when it was preincubated with RGS4 and in the presence of AMF, (Fig. 8B, compare lane 3 with lanes 2 and 4). These observations suggest that the RGS4 and G $\alpha$  subunit(s) form a heterotrimeric complex with the  $\mu$ -CT. These findings also demonstrate that G $\alpha$  has the ability to interact with the C-terminal domain of the  $\mu$ -OR only in the presence of RGS4 and that the latter probably uses distinct domains to bind both activated G $\alpha$  and the  $\mu$ -CT.

### 4. Discussion

Little is known whether the intracellular domains of the  $\mu$ - and the  $\delta$ -ORs play a distinct role in mediating protein– protein interactions by recruiting cytoplasmic proteins at specific modular domains located in them. As part of an effort to define interacting proteins at the inner face of these receptors, the C-termini of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs were fused to glutathione-S-transferase protein and their ability to interact with partners of the activation cycle of G proteins, such as the G $\beta\gamma$  complexes, known to play a role in effector activation [30], in opioid tolerance [31] and adenylyl cyclase superactivation [32], and the RGS4 protein reported to be up-regulated upon opioid receptor activation [15,33] was investigated.

Our observations have shown that both C-termini of the  $\delta$ - and  $\mu$ -ORs together with the third loop of the  $\delta$ -OR interact with G $\beta$ 1 $\gamma$ 1 complexes in a dose dependent manner.



Fig. 7. Effect of RGS4 on  $\mu$ -opioid receptor mediated adenylyl cyclase inhibition. HEK 293 cells stably expressing the  $\mu$ -OR were transfected with 5 µg of HA-tagged RGS4 (generously provided by Dr G. Milligan, University of Glasgow, UK). 48 h post-transfection cells were incubated with [<sup>3</sup>H] adenine as described in Experimental procedures. Generation of [<sup>3</sup>H] cAMP was measured in response to treatment with forskolin (50 µM) and increasing concentrations of DAMGO in cells expressing HA-RGS4, or vector alone used as control. Results are represented as the percentage of inhibition of forskolin induced-cAMP accumulation and represent the mean±SD of triplicate determinations of three independent experiments.



Fig. 8. RGS4 forms a complex with  $G\alpha$  and the  $\mu$ -CT. A. Purified  $G\alpha t_{GDP}$  (0.5  $\mu$ M) and His-RGS4 (0.5  $\mu$ M) were incubated in PBS with protease inhibitors and 1 mM GDP in the presence (lanes 3, 5) or absence (lanes 2, 4) of AMF (100 mM NaF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M AlF<sub>3</sub>) for 10 min at room temperature and 20 min at 4 °C. GST- $\mu$ -CT bound to glutathione–Sepharose beads were added to the reactions and incubated for 25 min at 4 °C under rotation and bound proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred, and detected using an anti-G $\alpha$  antibody or an anti-His antibody as previously described. B. Purified G $\alpha$ i (0.5  $\mu$ M) was incubated with His-RGS4 as described above with 1 mM GDP in the presence (lane 3) or absence (lanes 2, 4) of AMF for 10 min at room temperature. Equal protein levels were verified by stripping and reprobing the membranes with a specific GST antibody (lower panel). Results are representative of three independent experiments.

This interaction was also verified in pull down experiments using endogenous GB present in COS-7 cells or rat striatal membranes. In addition, µ-CT also binds purified brain  $G\beta 1\gamma 2$  complexes. This is the first report showing that the intracellular domains of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs directly bind with these G protein complexes. Two important points concerning the interaction of  $G\beta\gamma$  with the intracellular domains of the opioid receptor can be made. First, is that all the fusion peptides recognize both brain and transducin  $G\beta\gamma$  complexes, indicating that this  $G\beta\gamma$  interaction is not isoformselective. Second, is that  $G\beta\gamma$  binding does not require dissociation of the heterotrimeric G protein. The finding that  $G\beta\gamma$  interaction with the  $\mu$ -CT occurs in an agonist independent manner also supports the above observation. The fact that  $G\beta\gamma$  binding to the intracellular domains of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs is independent of heterotrimeric dissociation may indicate that there are possibly two binding sites on these receptors for  $G\beta\gamma$  interaction, i.e., one for free  $G\beta\gamma$ and a second that is employed when it is in its heterotrimeric state as previously reported for the third intracellular loop of the M3-M2-muscarinic receptors [34]. Previous results using peptides from the COOH-terminus and the intracellular portions of the  $\delta$ -OR have shown that these regions are key sites responsible for G protein coupling and activation [5,22,35], for arrestin binding [23], and for opioid receptor phosphorylation and desensitization [7,36]. Direct interaction of  $G\beta\gamma$  complexes with GPCRs was also reported for the photon receptor rhodopsin, where binding of  $G\beta\gamma$  was suggested to play an important role in signal amplification and/or receptor regulation [37]. On the other hand direct interaction of  $G\beta\gamma$  complexes with the third intracellular loop of the M2- and M3-muscarinic receptors was reported to be dependent on G protein activation and resulted in the formation of a ternary complex with GRK2 [8,34]. These observations suggest that direct  $G\beta\gamma$  association with the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs may provide an interface that

acts as a docking site to facilitate novel signaling responses. In line of these considerations it was recently found that STATs can directly interact with the  $\mu$ -CT [38] supporting the concept that multicomponent signal transduction complexes are formed within the C-terminal tails of the opioid receptors.

In this study we also show that  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs display different profiles in G $\alpha$  subunit binding. The  $\delta$ -i3L has the ability to bind to all conformational states of  $G\alpha$  protein with higher affinity compared with the binding observed with the  $\delta$ -CT. In contrast, the  $\mu$ -CT does not interact with Gai or Gao or with either form of transducin tested, even when it is in a heterotrimeric state. This result is surprising since GPCRs are known to interact with the whole heterotrimer. The inability of  $G\alpha$  subunit to bind to the  $\mu$ -CT could be explained that either i) binding of  $G\beta\gamma$  masks the site of  $G\alpha$  binding, ii)  $G\alpha$  subunits interact mainly with the intracellular loops of the µ-OR rather than its C-terminal tail and iii) binding of  $G\alpha$  subunit to the  $\mu$ -CT is promoted by other participating molecules of the activation cycle of G proteins. To test the latter hypothesis we tested the ability of the µ-OR to bind to members of the RGS family known to play an essential role in opiate action [15, 39]. It is already evident that the signaling efficiency and specificity of GPCRs can be modulated by RGS proteins, which can selectively interact with different GPCRs and can integrate signaling pathways by physical scaffolding mechanisms [12,28]. Our efforts were mainly focused on RGS4, because it was shown that this protein was up-regulated in response to opioid agonists [15,33] and was found to blunt the inhibitory effects of  $\delta$ -opioid agonists on cAMP accumulation [17]. We demonstrate for the first time the direct association of RGS4 to all the GST fusion proteins encompassing the  $\mu$ -CT, the  $\delta$ -CT, as well as the  $\delta$ -i3L. RGS4 binding to the  $\mu$ -CT was markedly attenuated by the presence of  $G\beta\gamma$  complexes indicating that both proteins use overlapping sites for interaction. In accord with our findings it was found that  $G\beta\gamma$  binds and displaces RGS4 from deactivated  $G\alpha q$  although the RGS4's affinity for  $G\beta 1\gamma 1$  was much weaker than that of  $G\alpha q$  [40]. It would be important to identify the specific contact sites on RGS4 and  $G\beta\gamma$  within the  $\mu$ -CT and determine whether these sites overlap or are distinct.

Our findings also suggest that the µ-OR and RGS4 protein are not prebound prior to agonist stimulation of the receptor, since it was noted that in COS-7 cells coexpressing HA-RGS4 and the µ-OR, binding of RGS4 to the  $\mu$ -CT was detected only when the cells were challenged with the opioid agonist DAMGO. This result suggests that RGS4 and the  $\mu\text{-}OR$  in COS-7 cells are not complexed in the resting state of the receptor and that G protein activation increases RGS binding. Although G protein independent effects of receptors on RGS proteins have been demonstrated previous studies have shown that RGS protein-G protein interactions are promoted by receptors [41,42]. In line with these observations we can assume that  $\mu$ -opioid receptor stimulation increases a pool of RGS-G $\alpha$ complexes. These complexes facilitate a faster binding of RGS4 to the C-terminal tail than RGS4 alone that probably has a weaker binding affinity for the µ-CT, suggesting that activated G proteins can promote RGS-receptor interactions. It was found that receptors might help to localize and orient RGS proteins to optimize their GAP activity towards  $G\alpha$  at the plasma membrane [12]. Moreover it was shown that the recruitment of RGS4 to the plasma membrane in response to heterologous receptor expression reflects increases in the abundance and affinity of target G proteins, implying the importance of G protein activation in RGS coupling [43]. Since recombinant RGS4 directly interacts with both C-termini of the  $\mu$ - and  $\delta$ -ORs, we could therefore suggest that these domains assume an active conformation that promotes RGS4 binding in in vitro assays. Fluorescence resonance energy transfer studies reported that purified RGS4 bound to Gq,  $G\beta\gamma$  and PLC $\beta1$ and that the strongest interactions are those between RGS4 and activated  $G\alpha$  and that the interactions with other components of the signaling pathway were significantly weaker [40].

A new role for RGS proteins as direct regulators of adenylyl cyclase has been proposed [44]. Our data indicated that RGS4 expression in HEK293 cells attenuated DAMGO-mediated adenylyl cyclase inhibition indicating that RGS4 serves as an effector antagonist in  $\mu$ -OR signaling. Consistent with these findings it was also reported that inclusion of RGS4 in NG-108 membranes reversed enkephalin-mediated inhibition of cAMP accumulation and enhanced PGE1-stimulated activity significantly [17], that RGS3 inhibits G $\beta$ 1 $\gamma$ 2-mediated production of inositol phosphate [45] and that RGS2 and RGS16 can each act as effector antagonists for M1 mAChR-directed Gq/11 $\alpha$ signaling [28,46]. RGS4 was also found to be involved in 5-HT1a-mediated neurotransmitter release in vivo [47], in  $\alpha$ 2A-adrenoreceptor stimulation of Go1 $\alpha$  and Gi2 $\alpha$  [48] and in regulation of serotoninergic signaling pathways [49].

Since RGS4 interacts with several G $\alpha$  subunits [50] and RGS proteins negatively regulate  $G\alpha$  signaling by serving as GAPs [17,51], we sought to determine whether RGS4 could recruit activated  $G\alpha$  to bind to the  $\mu$ -CT. It was shown that GDP-AlF<sub>4</sub><sup>-1</sup>-Gi $\alpha$  promotes a high affinity complex with RGS4 and GDP-AlF4<sup>-</sup>-Gta was an effective competitor indistinguishable from Gi $\alpha$ 1 and Go $\alpha$  in competition assays employing RGS4-stimulated GTP hydrolysis by α-GDP- $AlF_4^{-1}$ -bound complexes [52]. In this respect we were able to find that Ga binds to the µ-CT following exposure to  $AlF_4^{-1}$  in the presence of RGS4, suggesting that activated Ga prebound with RGS4 could form a heterotrimeric complex with the µ-CT. This finding can also explain the agonist-dependent RGS4 binding to the µ-CT. Indeed, stronger interaction of RGS4 to the µ-CT, following exposure to  $AlF_4^{-1}$ -activated G $\alpha$ , was observed as compared to RGS4 binding in its absence (data not shown). In support with our findings previous observations have demonstrated i) that RGS4 interacts directly and with high affinity with the transition state conformation of  $\alpha$  subunit [52], ii) that RGS4 selectively interacts with  $G\alpha$  [50], and iii) that RGS2 prebound with  $Gq\alpha$  could associate with the third loop of the M1 muscarinic acetylcholine receptor to form a stable heterotrimeric complex [28]. RGS protein-G protein interactions can also be promoted by receptors [42,43]. Recruitment of RGS2 to the plasma membrane of GPCRs was also demonstrated, while others report RGS2 localization to the plasma membrane when expressed in CHO cells [9,28,43].

Taken together, these results demonstrate that the Cterminal tail of the  $\mu$ -OR can contribute to the formation of a signal transduction complex employing G $\beta\gamma$  complexes, monomeric G $\alpha$  and RGS4. The interaction of RGS4 with G $\alpha$  and possibly with G $\beta\gamma$  at the  $\mu$ -CT may serve to position RGS4 in a signaling complex close to the membrane. The dynamics of such interactions are not yet clarified, and it is not known whether the formation of such complexes are stabilized by agonist binding to the receptor, or whether the agonist initiates the formation of a signal transduction complex de novo. Our data suggest that regions critical for  $\mu$ - and  $\delta$ -OR signaling are contained within the C-terminal tails of these receptors and raise the possibility that RGS4 could have a yet undiscovered role in opioid action.

### References

- [1] K.M. Standifer, G.M. Pasternak, Cell. Signal. 9 (1997) 237.
- [2] P.Y. Law, Y.H. Wong, H.H. Loh, Biopolymers 51 (1999) 440.
- [3] P.Y. Law, Y.H. Wong, H.H. Loh, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000) 389.
- [4] M. Merkouris, I. Mullaney, Z. Georgoussi, G. Milligan, J. Neurochem. 69 (1997) 2115.
- [5] Z. Georgoussi, M. Merkouris, I. Mullaney, G. Megaritis, C. Carr, C. Zioudrou, G. Milligan, Biochim. Biophys. Acta 1359 (1997) 263.

- [6] G. Megaritis, M. Merkouris, Z. Georgoussi, Recept. Channels 7 (2000) 199.
- [7] G. Pei, B.L. Kieffer, R.J. Lefkowitz, N.J. Freedman, Mol. Pharmacol. 48 (1995) 173.
- [8] G. Wu, J.L Benovic, J.D. Hildebrandt, S.M. Lanier, J. Biol. Chem. 273 (1998) 7197.
- [9] J.R. Hepler, Trends Pharmacol. Sci. 20 (1999) 376.
- [10] E.M. Ross, T.M. Wilkie, Annu. Rev. Biochem. 69 (2000) 795.
- [11] R.R. Neubig, D.P. Siderovski, Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002) 187.
- [12] S. Hollinger, J.R. Hepler, Pharmacol. Rev. 54 (2002) 552.
- [13] D.A. Sierra, S. Popov, T.M. Wilkie, Trends Cardiovasc. Med. 10 (2000) 263.
- [14] S.J. Gold, M.H. Han, A.E. Herman, Y.G. Ni, C.M. Pudiak, G.K. Aghajanian, R.L. Liu, B.W. Potts, S.M. Mumby, E.J. Nestler, Eur. J. Neurosci. 17 (2003) 971.
- [15] T. Nakagawa, M. Minami, M. Satoh, Eur. J. Pharmacol. 433 (2001) 29.
- [16] Z. Rahman, S.J. Gold, M.N. Potenza, C.W. Cowan, Y.G. Ni, W. He, T.G. Wensel, E.J. Nestler, J. Neurosci. 19 (1999) 2016.
- [17] J.R. Hepler, D.M. Berman, A.G. Gilman, T. Kozasa, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 428.
- [18] M.R. Mazzoni, J.A. Malinski, H.E. Hamm, J. Biol. Chem. 266 (1991) 14072.
- [19] D. Yowe, K. Yu, T.M. Wilkie, S. Popov, Methods Enzymol. 344 (2002) 647.
- [20] E. Lee, M. Linder, A.G. Gilman, Methods Enzymol. 237 (1994) 146.
- [21] E.J. Dell, J. Connor, S. Chen, E.G. Stebbins, N.P. Skiba, D. Mochy-Rosen, H.E. Hamm, J. Biol. Chem. 277 (2002) 49888.
- [22] M. Merkouris, I. Dragatsis, G. Megaritis, G. Konidakis, C. Zioudrou, G. Milligan, Z. Georgoussi, Mol. Pharmacol. 50 (1996) 985.
- [23] B. Cen, Q. Yu, Y. Guo, Y. Wu, K. Ling, Z. Cheng, L. Ma, G. Pei, J. Neurochem. 76 (2001) 1887.
- [24] V. O'Connor, O. El Far, E. Bofill-Cardona, C. Nanoff, M. Freissmath, A. Karschin, J.M. Airas, H. Betz, S. Boehm, Science 286 (1999) 1180.
- [25] J. Bockaert, P. Marin, A. Dumuis, L. Fagni, FEBS Lett. 546 (2003) 65.
- [26] D.E. Clapham, E.J. Neer, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37 (1997) 167.
- [27] J.D. Hildebrandt, Biochem. Pharmacol. 54 (1997) 325.
- [28] L.S. Bernstein, S. Ramineni, C. Hague, W. Cladman, P. Chidiac, A.I. Levey, J.R. Hepler, J. Biol. Chem. 279 (2004) 21248.
- [29] S. Popov, T. Kozasa, T. Wilkie, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 7216.
- [30] H.E. Hamm, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 4819.

- [31] S. Chakrabarti, M. Oppermann, A.R. Gintzler, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 4209.
- [32] M. Rubenzik, E. Varga, D. Stropova, W.R. Roeske, H.I. Yamamura, Mol. Pharmacol. 60 (2001) 1076.
- [33] M. Garnier, P.F. Zaratin, G. Ficalora, M. Valente, L. Fontanella, M.-H. Rhee, K.J. Blumer, M.A. Scheideler, J. Pharmacol. Exp. Ther. 304 (2003) 1299.
- [34] G. Wu, G.S. Bogatkevich, Y.V. Mukhin, J.L. Benovic, J.D. Hildebrandt, S.M. Lanier, J. Biol. Chem. 275 (2000) 9026.
- [35] H.L. Wang, J. Neurochem. 72 (1999) 1307.
- [36] L. Zhang, Y. Yu, S. Mackin, F.F. Weight, G.R. Uhl, J.B. Wang, J. Biol. Chem. 271 (1996) 11449.
- [37] D.J. Kelleher, G.L. Johnson, Mol. Pharmacol. 34 (1988) 452.
- [38] G. Mazarakou, Z. Georgoussi, J. Neurochem. 93 (2005) 918.
- [39] V. Zachariou, D. Georgescu, N. Sanchez, Z. Rahman, R. DiLeone, O. Berton, R.L. Neve, L.J. Sim-Selley, D.E. Selley, S.I. Gold, E.J. Nestler, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 13656.
- [40] L. Dowal, J. Elliott, S. Popov, T.M. Wilkie, S. Scarlata, Biochemistry 40 (2001) 424.
- [41] X. Xu, W. Zeng, S. Popov, D.M. Berman, I. Davigon, K. Yu, D. Yowe, S. Offermanns, S. Muallem, T.M. Wilkie, J. Biol. Chem. 274 (1999) 3549.
- [42] W. Zeng, X. Xu, S. Popov, S. Mukhopadhay, P. Chidiac, J. Swistok, W. Danho, K.A. Yagaloff, S. Fisher, E. Ross, S. Muallem, T. Wilkie, J. Biol. Chem. 273 (1998) 34687.
- [43] A.A. Roy, K.E. Lemberg, P. Chidiac, Mol. Pharmacol. 64 (3) (2003) 587.
- [44] S. Salim, S. Sinnarajah, J.H. Kehrl, C.W. Dessauer, J. Biol. Chem. 278 (2003) 15842.
- [45] C.S. Shi, S.B. Lee, S. Sinnarajah, C.W. Dessaner, S.G. Rhee, J.H. Kehrl, J. Biol. Chem. 276 (2001) 24293.
- [46] T. Anger, W. Zhang, U. Mende, J. Biol. Chem. 279 (6) (2004) 3906.
- [47] C.E. Beyer, A. Chavami, Q. Li, A. Sung, K.J. Rhodes, L.A. Dawson, E. Schechter, L.E.K.H. Young, Brain Res. 1022 (2004) 214.
- [48] A. Cavali, R.M. Druey, G. Milligan, J. Biol. Chem. 275 (2000) 23693.
- [49] A.M. Lione, M. Errico, S/l Lin, D.S. Cowen, J. Neurochem. 75 (2000) 934.
- [50] K.M. Druey, B.M. Sullivan, D. Brown, E.R Fischer, N. Watson, K.J. Blumer, C.R. Gerfen, A. Scheschonka, J.H. Kehrl, J. Biol. Chem. 273 (1998) 18405.
- [51] L. De Vries, B. Zheng, T. Fischer, E. Elenko, M.G. Farguhar, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000) 235.
- [52] D.M. Berman, T. Kozasa, A.G. Gilman, J. Biol. Chem. 271 (1996) 27209.

# 9. Βιογραφικό σημείωμα

### Δεκέμβριος 2011

### 1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ ΟΝΟΜΑ ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	: Λεοντιάδης : Λεωνίδας : Ιορδάνης : 19 Απριλίου 1978
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΤΗΛ. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΤΗΛ. ΣΗΜΕΡΙΝΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ Δ/ΝΣΗ ΣΗΜΕΡΙΝΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	: 6972138477, 210 7665800 : <u>lleontas@bio.demokritos.gr</u> , <u>lleontas@yahoo.com</u> : 210 6503586, 210 6503588 : Εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας, Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», Νεαπόλεως και Πατριάρχου Γρηγορίου, Αγ. Παρασκευή, τ.κ. 15310, Αθήνα
ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΘΕΣΗ	: Υποψήφιος Διδάκτωρ (Υ.Δ.) Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. Υπότροφος Μεταπτυχιακός Υποψήφιος Διδάκτορας (Υ.Μ.Υ.Δ.) στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

### 2. ΣΠΟΥΔΕΣ-ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 2002 Σεπτέμβριος έως σήμερα	: Υποψήφιος Διδάκτωρ του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α., θέμα διδακτορικής διατριβής «Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με υποδοχείς που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες»
- 2001 Νοέμβριος	: Ένταξη στο πρόγραμμα Υ.Μ.Υ.Δ. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Ινστιτούτο Βιολογίας (υποτροφία από το πρόγραμμα Υ.Μ.Υ.Δ.)
- 2001 Νοέμβριος	: Αποφοίτηση από το τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών με βαθμό πτυχίου «Λίαν

- 1997 έως 2001 : Φοιτητής στο Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Πατρών.

- 1993 έως 1996 : Μαθητής στο 5° Λύκειο Βύρωνα (Βαθμός Απολυτηρίου 19 και 5/11).

### 3. ЕРЕУЛНТІКН ЕМПЕІРІА

- -2002 Μάρτιος έως σήμερα : Έναρξη εργασίας για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας. Ινστιτούτο Βιολογίας. Е.К.Е.Ф.Е. «Δημόκριτος», με επιβλέπουσα την Δρ. Ζαφειρούλα Τίτλος Γεωργούση. εργασίας: «Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών uε υποδοχείς που συζεύγνυνται με G πρωτείνες»
- 2000-2001
   : Διπλωματική εργασία για το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών υπό την επίβλεψη των καθηγητών Β. Μαρμάρα και Μ. Λαμπροπούλου. Τίτλος εργασίας: «Μελέτη προτύπου φωσφορυλιωμένων σε τυροσίνη πρωτεϊνών από αιμοκύτταρα μεταλλαγμένων στελεχών του εντόμου Ceratitis capitata»
- -1999 Ιούλιος
   : Εργασία μικρής διάρκειας στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» στο εργαστήριο της Δρ. Ζ. Γεωργούση. Τίτλος εργασίας:
   «Μελέτη οπιοειδών υποδοχέων Παρασκευή και αξιολόγηση της καταλληλότητας αντισώματος που προσδένεται σε συγκεκριμένη περιοχή του δ-οπιοειδούς υποδοχέα»

# 4. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Ιούνιος 2008: Υποτροφία συμμετοχής στο Παγκόσμιο Συνέδριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας FEBS-IUBMB, Αθήνα.
- Ιούλιος 2007: Υποτροφία από την οργάνωση International Narcotics Research Conference (I.N.R.C.) για την παρακολούθηση του συνεδρίου I.N.R.C. 2007, Βερολίνο, Γερμανία
- Ιούνιος 2006: Υποτροφία από το πρόγραμμα Υ.Μ.Υ.Δ. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.
   «Δημόκριτος» για την παρακολούθηση του συνεδρίου 31<sup>st</sup> FEBS Congress
   "Molecules in Health and Disease", Κωνσταντινούπολη, Τουρκία
- Ιούλιος 2004: Υποτροφία από την οργάνωση International Narcotics Research Conference (I.N.R.C.) για την παρακολούθηση του συνεδρίου I.N.R.C. 2004, Κυότο, Ιαπωνία
- Νοέμβριος 2001 Ιούλιος 2007: Υποτροφία από το πρόγραμμα Υ.Μ.Υ.Δ. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο

Ινστιτούτο Βιολογίας, εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ζ. Γεωργούση

- Υποτροφία επίδοσης 1999-2000 για το Γ' έτος του Πανεπιστημίου και βραβείο, Πρόγραμμα υποτροφιών ΙΚΥ 2000-2001.
- Υποτροφία επίδοσης 1997-1998 για το Α' έτος του Πανεπιστημίου και βραβείο, Πρόγραμμα υποτροφιών ΙΚΥ 1998-1999.

# 5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Leontiadis L.J., Papakonstantinou M.-P., Georgoussi Z. (2009). "Regulator of G protein signaling 4 confers selectivity to specific G proteins to modulate mu- and delta-opioid receptor signaling". Cellular Signalling, 21(7): 1218-28.
 Βιβλιογραφικές αναφορές: 12, Ετεροαναφορές: 9

- Georgoussi Z., **Leontiadis L.**, Mazarakou G., Merkouris M., Hyde K., Hamm H. (2006) "Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling". Cellular Signalling, 18(6): 771-82.

Βιβλιογραφικές αναφορές: 52, Ετεροαναφορές: 43

4-year Impact Factor (I.F.) of Cellular Signaling Journal: 5.058 (2006), 4.171 (2009)

# 6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΒΙΒΛΙΑ

- Z. Georgoussi, L.J. Leontiadis, E-M. Georganta, M. Papakonstantinou, M. Sarris, D-D. Fourla, A. Agalou. (2008). Chimeric peptides corresponding to intracellular regions of opioid receptors as baits for screening novel receptor-interacting partners. 6<sup>th</sup> Hellenic forum on bioactive peptides (Ed. Paul A. Cordopatis, Evy Manessi-Zoupa, George Pairas).

# 7. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

### Διεθνή συνέδρια

- M.-P. Papakonstantinou, **L.J. Leontiadis**, F. Nikolos, M. Sarris and Z. Georgoussi (2010). "RGS2 and RGS4 proteins differentially modulate delta and kappa opioid receptor signaling". FEBS Journal, Vol. 277 (S1): 145-6.

- **L. Leontiadis** and Z. Georgoussi (2008). "RGS4 protein: A novel interacting protein essential for  $\mu$ - and  $\delta$ - opioid receptor signaling". FEBS Journal, Vol. 275 (S1): 338.

- **L.J. Leontiadis**, H.E. Hamm and Z. Georgoussi (2006). "The carboxyl-terminal tail of the mu opioid receptor - docking site for RGS4 protein binding". FEBS Journal, Vol. 273 (S1): 101-2.

## Εθνικά συνέδρια

- **Leontiadis L.J.**, Papakonstantinou M.-P., Georgoussi Z. (2010). "Regulator of G protein signaling 4: A novel regulator of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor signaling". Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition, Vol. 24 (2), p. 168-170.

- Papakonstantinou M.-P., Sarris M., Nikolos F., **Leontiadis L.J.**, Fourla D.D., and Georgoussi Z. (2009) "RGS2 protein: a new modulator of opioid receptor signaling". Book of Abstracts of the 60<sup>th</sup> Meeting, Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 55, p. 187.

- L.J. Leontiadis, M.-P. Papakonstantinou, M. Sarris and Z. Georgoussi (2008). "RGS4 protein interacts with μ- and δ- opioid receptors to modulate their internalization fate". Πρακτικά  $22^{00}$  Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών ,"From Cells to Behavior", p. 111.

- **Leontiadis L.J.**, Papakonstantinou M.-P., Sarris M., Georgoussi Z. (2008). "RGS4 and RGS2 differentially modulate opioid receptor signaling". Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition, Vol. 22 (2), p. 214-216.

- Leonidas J. Leoniidais and Zafiroula Georgoussi (2007). "RGS4 protein: new player in  $\mu$ - and  $\delta$ - opioid receptor signaling". Book of Abstracts of the 59<sup>th</sup> Meeting, Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 54, p. 175.

- Λεοντιάδης Λ.Ι., Παπακωνσταντίνου Μ.-Π., Σαρρής Μ. και Γεωργούση Ζ. (2007). «Χαρτογράφηση των λειτουργικών περιοχών των οπιοειδών υποδοχέων που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με την RGS4 πρωτεΐνη». Πρακτικά 29<sup>ου</sup> Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, σελ. 216-7.

- Leontiadis L.J., Georgoussi Z. (2007). "RGS4 protein interacts with the carboxylterminal tails of the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors". Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakokinetikes, Vol. 25(1): 72-74.

- Leonidas Leonidais and Zafiroula Georgoussi (2006). "The COOH tail of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors: 'magic tail' in action". Proceedings of the 58<sup>th</sup> Meeting, Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 53.

- **L.Leontiadis**, H. Hamm and Z. Georgoussi (2005). "The COOH tail of the  $\mu$ -opioid receptor forms tight complexes with RGS4 and Ga to regulate opioid receptor signaling". Proceedings of the 57<sup>th</sup> Meeting, Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 52, p. 409-11.

- Λεοντιάδης Λ., Hamm H., και Γεωργούση Ζ. (2005). «Διαφορική πρόσδεση των Ga και όχι των Gβγ συμπλόκων των G πρωτεϊνών στις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων». Πρακτικά 27<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, σελ. 205-6.

- **L.Leontiadis**, G.Mazarakou, H. Hamm and Z. Georgoussi (2004). "Direct interaction of the carboxyl-terminal tails of the  $\mu$ - and  $\delta$ - opioid receptors with G protein subunits». Proceedings of the 56<sup>th</sup> Meeting, Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 51.

# 8. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

# Διεθνή συνέδρια

- M.-P. Papakonstantinou, **L.J. Leontiadis**, M. Sarris, F. Nikolos and Z. Georgoussi (2011). RGS2 and RGS4 proteins act as novel modulators of kappa and delta opioid receptors signaling. 8<sup>th</sup> European Opioid Conference, 13-15 Απριλίου 2011, Κρακοβία, Πολωνία. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- M.-P. Papakonstantinou, **L.J. Leontiadis**, F. Nikolos, M. Sarris and Z. Georgoussi. "RGS2 and RGS4 proteins differentially modulate delta and kappa opioid receptor signaling".  $35^{\text{th}}$  FEBS Congress, "Molecules of Life", 26 Ιουνίου – 1 Ιουλίου 2010, Γκέτεμπουργκ, Σουηδία. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- L.J. Leontiadis, M.-P. Papakonstantinou, M. Sarris, Z. Georgoussi. "RGS4 regulates opioid receptor signaling". International Narcotics Research Conference (I.N.R.C.), 39<sup>th</sup> Annual Meeting, 13-18 Ιουλίου 2008, Τσάρλεστον, Νότια Καρολίνα, ΗΠΑ. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- L.J. Leontiadis and Z. Georgoussi. "RGS4 protein: A novel interacting protein essential for μ- and δ- opioid receptor signaling".  $33^{rd}$  FEBS Congress &  $11^{th}$  IUBMB Conference, "Biochemistry of Cell Regulation", 28 Ιουνίου-3 Ιουλίου 2008, Αθήνα, Ελλάδα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- L. Leontiadis, M.-P. Papakonstantinou, Z. Georgoussi. "RGS4 interacts directly with  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors to regulate their signaling". International Narcotics Research Conference (I.N.R.C.), 8-13 Ιουλίου 2007, Βερολίνο, Γερμανία. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- **L.J. Leontiadis**, H.E. Hamm and Georgoussi. "The carboxyl-terminal tail of the mu opioid receptor – Docking site for RGS4 protein binding".  $31^{st}$  FEBS Congress "Molecules in Health and Disease", 24-29 Ιουνίου 2006, Κωνσταντινούπολη, Τουρκία. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- Leontiadis L. Hamm H. and Georgoussi Z. The C-terminal domain of the mu-opioid receptor is an anchor domain for direct RGS4 protein binding regulating opioid receptor signaling. Keystone Symposia on G Protein-Coupled Receptors: Evolving Concepts and New Techniques, 12-17 Φεβρουαρίου 2006, Κίστοουν, Κολοράντο, ΗΠΑ. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- L. Leontiadis, K. Hyde, H. Hamm and Z. Georgoussi. "Direct interaction of the third intracellular loop of the  $\delta$ - opioid receptor with G protein subunits". International Narcotics Research Conference (I.N.R.C.), 18-23 Ιουλίου 2004, Κυότο, Ιαπωνία. (αναρτημένη ανακοίνωση)

# Εθνικά συνέδρια

- M.-P. Papakonstantinou, **L.J. Leontiadis**, F. Nikolos, and Z. Georgoussi. RGS2 and RGS4 proteins: novel modulators of kappa and delta opioid receptor signaling.  $8^{\eta}$  Ημερίδα Φαρμακολογίας, Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας, 12 Μαρτίου 2011, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- M-P. Papakonstantinou, L.J. Leontiadis, F. Nikolos, M-Sarris and Z. Georgoussi. Delta and kappa opioid receptor signaling is differentially modulated by RGS4 and RGS2 proteins.  $61^{\circ}$  Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 15-17 Οκτωβρίου 2010, Αλεξανδρούπολη. (αναρτημένη ανακοίνωση)

M.-P. Papakonstantinou, L.J. Leontiadis, F. Nikolos, M. Sarris, Z. Georgoussi.
 "Regulators of G protein signaling RGS4 and RGS2: Novel modulators of delta and kappa opioid receptor signaling". Διημερίδα της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών, 1-2 Οκτωβρίου 2010, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- **L.J. Leontiadis**, M.-P. Papakonstantinou, Z. Georgoussi. "Regulator of G protein signaling 4: a novel regulator of μ- and δ-opioid receptor signaling". 6° Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακολογίας, Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας (Ε.Ε.Φ.), 4-6 Ιουνίου 2010, Ηράκλειο. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- Μ.-Π. Παπακωνσταντίνου, Μ. Σαρρής, Φ. Νικολός, Λ. Λεοντιάδης, Δ.Δ. Φούρλα, και Ζ. Γεωργούση. «Η πρωτεΐνη RGS2: ένας νέος ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης των οπιοειδών υποδοχέων». 60° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 20-22 Νοεμβρίου 2009, Ζάππειον Ίδρυμα, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- L.J. Leontiadis, M.-P. Papakonstantinou, M. Sarris, Z. Georgoussi. "RGS4 protein interacts with  $\mu$ - and δ- opioid receptors to modulate their internalization fate". 22° Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών "From Cells to Behavior", 16-19 Οκτωβρίου 2008, Ευγενίδιο Ίδρυμα, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- L.J. Leontiadis, M-P. Papakonstantinou, M. Sarris and Z. Georgoussi. "RGS4 and RGS2 differentially modulate opioid receptor signaling". 5° Πανελλήνιο Συνέδριο

Φαρμακολογίας, Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας, 23-25 Μαΐου 2008, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- **L.J. Leontiadis**, E.-M. Georganta, M.-P. Papakonstantinou, D.-D. Fourla, M. Sarris, A. Agalou, Z. Georgoussi. "Chimeric peptides corresponding to intracellular regions of opioid receptors as "baits" for screening novel receptor-interacting partners". 6<sup>th</sup> Hellenic Forum on Bioactive peptides, 18-20 Μαΐου 2008, Πάτρα. (προφορική ανακοίνωση)

Λ.Ι. Λεοντιάδης, Ζ. Γεωργούση. «RGS4 πρωτεΐνη: ένας νέος 'παίχτης' στη σηματοδότηση των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων». 59° Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 7-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα. (προφορική ανακοίνωση)

- Λ. Λεοντιάδης, Μ-Π. Παπακωνσταντίνου, Μ. Σαρρής και Ζ. Γεωργούση. «Χαρτογράφηση των λειτουργικών περιοχών των οπιοειδών υποδοχέων που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με την RGS4 πρωτεΐνη». 29° Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, 17-19 Μαΐου 2007, Καβάλα. (προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση)

- Λ. Λεοντιάδης και Ζ. Γεωργούση (2007). «Η RGS4 πρωτεΐνη προσδένεται στα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων». 8<sup>η</sup> Ημερίδα Φαρμακολογίας, Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας, 24 Φεβρουαρίου 2007, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- Λ. Λεοντιάδης και Ζ. Γεωργούση. «Το καρβοξυτελικό άκρο του μ- και δ-οπιοειδούς υποδοχέα: 'μαγική ουρά' εν δράσει». 58° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9-11 Νοεμβρίου 2006, Πάτρα. (προφορική ανακοίνωση)

- Λ. Λεοντιάδης, Η. Hamm και Ζ. Γεωργούση. «Το καρβοξυτελικό άκρο του μοπιοειδούς υποδοχέα, σημείο εκκίνησης ενός σταθερού συμπλόκου μεταξύ της RGS4 πρωτεΐνης και της Ga υπομονάδας των G πρωτεϊνών, υπεύθυνο για τη σηματοδότηση του υποδοχέα». 57° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9-11 Δεκεμβρίου 2005, Αθήνα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

- Λ. Λεοντιάδης, Η. Hamm, Ζ. Γεωργούση. «Διαφορική πρόσδεση των Ga και όχι των Gβγ συμπλόκων των G πρωτεϊνών στις ενδοκυτταρικές περιοχές των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων». 27° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, 12-14 Μαΐου 2005, Ναύπλιο. (προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση)

- L.Leontiadis, G.Mazarakou, H. Hamm and Z. Georgoussi. «Διαφορική πρόσδεση των G πρωτεϊνών στα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων». 56° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 25-27 Νοεμβρίου 2004, Λάρισα. (αναρτημένη ανακοίνωση)

## 9. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΛΛΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ – ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

### Συνέδρια

- 2011 Αύγουστος	:	: ISN-ESN 2011, 23 <sup>rd</sup> Biennial Meeting, Megaron, Athens							
- 2009 Σεπτέμβριος	:	23°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
	E	Βιολογικών Επιστημών και 41° Ετήσιο Γενικό Συνέδριο							
	τ	της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Εγκεφάλου και Συμπεριφοράς							
<ul> <li>- 2003 Νοέμβριος</li> </ul>	:	55°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
	В	Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας							
- 2002 Οκτώβριος	:	54°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
	В	Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας							
- 2001 Δεκέμβριος	:	53°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
	Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.								
<ul> <li>- 2001 Ιούλιος</li> </ul>	:	Θερ	ινό σχολείο	«Ημέρες	Βιολογίας»,	Ινστιτούτο			
	Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».								
- 2001 Μάιος	:	23°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
Βιολογικών Επιστημών									
- 2000 Δεκέμβριος	:	1°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Πανελλήνιας	ς Ένωσης			
	Βιολόγων								
- 2000 Μάιος	:	$22^{\circ}$	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
Βιολογικών Επιστημών									
- 1999 Μάιος	:	21°	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
Βιολογικών Επιστημών									
- 1998 Μάιος	:	$20^{\circ}$	Πανελλήνιο	Συνέδριο	Ελληνικής	Εταιρείας			
Βιολογικών Επιστημών									

# Σεμινάρια

Συμμετοχή με προφορική παρουσίαση σε **ερευνητικά και βιβλιογραφικά σεμινάρια** του **Ι.Β.** Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για το χρονικό διάστημα **2001-2006** 

# 10. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (E.E.B.M.B. – μέλος της F.E.B.S.)
- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες (E.E.N.) και των διεθνών εταιρειών F.E.N.S. και I.B.R.O.
## 11. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Επικουρική διδασκαλία εργαστηριακών ασκήσεων προπτυχιακών μαθημάτων **Βιοχημείας Ι, Βιοχημείας ΙΙ, Κλινικής Χημείας**, τμημάτων Βιολογίας και Φαρμακευτικής, Σχολή Θετικών Επιστημών, Ε.Κ.Π.Α.

- Επικουρική επίβλεψη διπλωματικών φοιτητών και υποψηφίων διδακτόρων στο Εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας, Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».