



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΟΙ SIGMA ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ»**

ΦΩΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Επιβλέπων)

ΤΣΕΖΟΥ ΑΠΑΣΙΑ (Μέλος)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«SIGMA RECEPTORORS AND CARCINOGENESIS»**

## Περίληψη

Αρχικά οι σ υποδοχείς είχαν προταθεί ως υποκατηγορία των οπιοειδών υποδοχέων. Σήμερα, είναι γνωστό ότι αποτελούν μη οπιοειδείς μεμβρανικές πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου και σχετίζονται με νευροψυχιατρικές διαταραχές. Οι σ υποδοχείς διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με την ικανότητά τους να δεσμεύουν κάποια φάρμακα: τους Sigma – 1 (σ1) και τους Sigma – 2 (σ2) υποδοχείς.

Ο σ1 υποδοχέας βρίσκεται στην περιοχή επαφής Ενδοπλασματικού δικτύου-Μιτοχονδρίου (MAM), στο ήπαρ/ σπλήνα/ καρδιά/ιππόκαμπο. Το καρβοξυτελικό του άκρο, εμφανίζει λειτουργία πρωτεΐνης – συνοδού, προάγοντας την σωστή αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και ρυθμίζοντας την αποδόμηση των κακώς αναδιπλωμένων. Συμμετέχει στην ενδο-οργανιδιακή σηματοδότηση του μιτοχονδρίου- E/Δ, του πυρήνα- E/Δ, και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης - E/Δ.

Ο σ2 υποδοχέας δεν είναι πλήρως μελετημένος, αφού το γονίδιο και η αμινοξιδελική του αλληλουχία είναι άγνωστες. Σύμφωνα με μελέτες, ο σ2 υποδοχέας ταυτίζεται με τον PGRMC1. Βρίσκονται στο Ν.Σ. / ήπαρ/ νεφρούς/ καρδιά/ γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα από τον σ1. Πιθανά σχετίζονται με : τα κανάλια ιόντων και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων

Επειδή με την έναρξη του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η συγκέντρωση των σ1 και των σ2 αυξάνεται, σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως πνεύμονα/ ορθοκολικού/ μαστού/ παγκρέατος, ενώ οι προσδέτες τους αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και οδηγούν σε απόπτωση πιθανά μέσω των κασπασών, ο συνδυασμός τους με τα ήδη υπάρχοντα αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να αυξήσει τη δράση των δεύτερων. Οι σ2 προσδέτες, ήδη χρησιμοποιούνται σε απεικονιστικές μεθόδους για διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου..

Η μελέτη λοιπόν της δυνητικής χρήσης των προσδετών των σ1 και σ2 υποδοχέων ως αντικαρκινικοί παράγοντες, αλλά και η μεγάλη χρησιμότητα τους στην απεικόνιση των όγκων, αποτελεί μέχρι και σήμερα το ιερό δισκοπότηρο σε αυτόν τον τομέα.

## Abstract

The object of this study is to investigate the association of SRs and their selective ligands (because the molecular characteristics of the same SRs and particularly S2R, is not completely clear) in carcinogenesis and their potential use as antitumor agents, as well and their great utility in tumor imaging.

Methods: A systematic literature search was conducted using the PubMed database between April 1976 and April 2016 in order to indentify as many important sigma receptors and carcinogenesis as possible.

Results: The ion channels and transporters, enhances the cell's ability to adapt to the metabolic conditions encountered in the tumor tissue. The high expression of SRs in the proliferating cells compared with those at rest condition, indicating that is a significant clinical biomarker for determining the proliferative status of solid tumors using functional PET imaging technique.

Conclusion: The association of SRs in the pathophysiology of cancer cell is resulting from the high concentration of S1R and S2R binding sites observed in various tumor cell lines and tissues. It would be also remarkably, to determine if SRs are involved in metastasis and to others metastatic cell behaviors such as adhesion, secretion, motility and penetration. An absolute challenge for research in this field is to create an integrated model for the description of the molecular mechanisms of SR, which will include the known biological and pathophysiological role.

# Περιεχόμενα

## A. Εισαγωγή

A1. Ιστορική αναδρομή

A2. Υποκατηγορίες των  $\sigma$  υποδοχέων και παραλλαγές ματίσματος

A3. Ανατομική κατανομή των  $\sigma$  υποδοχέων

A3.1. Νευρικό σύστημα

A3.2. Περιφερικά όργανα

A3.3. Κυτταρικοί τύποι

A4. Μοριακά Χαρακτηριστικά των  $\sigma_1$  υποδοχέων

A4.1. Ο  $\sigma_1$  υποδοχέας

A4.2. Οι  $\sigma_1$  σε Knockout ποντίκια

A4.3. Μοριακή δομή της πρωτεΐνης του  $\sigma_1$  υποδοχέα

A4.4. Μελέτες για τις Μεταλλάξεις του  $\sigma_1$  υποδοχέα

A4.5. Μοριακή φύση του  $\sigma_2$  υποδοχέα

A4.6. Η έκφραση των  $\sigma$  υποδοχέων στις κυτταρικές γραμμές του όγκου και των ιστών (ανθρώπινες ή/και άλλες).

A5. Φαρμακολογία των  $\sigma_1$  υποδοχέων

A6. Lipid rafts και  $\sigma_1$  υποδοχείς

A7. Μετάθεση του  $\sigma_1$  από την περιοχή επαφής ΕΔ/μιτοχονδρίου (MAM)

A8. Αλληλεπιδράσεις των  $\sigma_1$  με λειτουργικές πρωτεΐνες στην μεμβράνη πλάσματος (plasma membrane)

A9. Οι  $\sigma_2$  υποδοχείς

A10. Ταυτοποίηση του συμπλόκου πρωτεΐνης PGRMC1 ως την υποθετική θέση πρόσδεσης του  $\sigma_2$  υποδοχέα

A10.1. Επισήμανση φωτοσυνάφειας και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών

A10.2. Το φαρμακολογικό προφίλ του [ $^{125}$ I] RHM-4 σε κύτταρα HeLa

A10.3. Η ενδοκυτταρική εντόπιση του PGRMC1 και  $\sigma_2$  υποδοχέα

A11. Η ανάπτυξη των  $\sigma_2$  υποδοχέων εκλεκτικών προσδετών

A11.1. Διαμορφωτικοί περιορισμοί των αναλόγων αμίνης

A11.2. Τα ανάλογα του Siramesine

A11.3. Διαμορφωτικά-εύκαμπτα αναλόγων της αμίνης

A12.(±) -PB28 (37) ανάλογο και άλλα πιπεραζινικά προερχόμενα ανάλογα

## **B. Σκοπός του μεταπτυχιακού**

### **Γ. Ειδικό Μέρος**

#### Γ1. σ υποδοχείς

Γ1.1. Επιδράσεις των σ ουσιών/φαρμάκων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο και τον κυτταρικό θάνατο

Γ1.2. Πιθανοί μηχανισμοί Μεταγωγής σήματος των σ υποδοχέων και Συνάφεια με την κυτταρική βιολογία του Καρκίνου

Γ1.3. Διαμόρφωση από τα ιοντικά κανάλια

Γ1.4. Διαμόρφωση από την ανκυρίνη

Γ1.5. Διαμόρφωση από το ενδοκυττάριο  $Ca^{2+}$

Γ1.6. Διαμόρφωση από τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων

#### Γ2. Σηματοδοτικά μονοπάτια των σ2 υποδοχέων

#### Γ3. Ο ρόλος των σ υποδοχέων στην θεραπεία και την απεικόνιση των όγκων

Γ3.1. Οι σ1 υποδοχείς ως θεραπευτικοί στόχοι

Γ3.2. Ουσίες σ υποδοχέων ως βοηθοί στην απεικόνιση Όγκων

Γ3.3. Η έκφραση των σ υποδοχέων στις κυτταρικές γραμμές του όγκου και των ιστών (ανθρώπινες ή/και άλλες).

#### Γ4. Οι σ υποδοχείς ως ρυθμιστές της ηλεκτρικής πλαστικότητας σε καρκινικά κύτταρα

#### Γ5. Οι σ2 και καρκίνος παγκρέατος. Διαφοροποίηση των σ1 από τους σ2 υποδοχείς

#### Γ6.Ο σ2 υποδοχέας ως βιοδείκτης της πολλαπλασιαστικής ανάπτυξης του κλάσματος των συμπαγών όγκων

#### Γ7. Οι σ προσδέτες

Γ7.1. Φαρμακολογική και θεραπευτική εκλεκτικότητα των σ1 προσδετών

Γ7.2. SR31747A, Περιφερικός εκλεκτικός προσδέτης των σ υποδοχέων ως αντικαρκινικός παράγοντας

Γ7.3. Οι σ2 προσδέτες και καρκίνος παγκρέατος

Γ7.4.Οι σ2 προσδέτες επάγουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα και ο πιθανός τους ρόλος ως αντικαρκινικοί παράγοντες

ιστούς

Γ7.5. Προαποπτωτικοί μηχανισμοί από τους σ2 προσδέτες

#### Γ8. Κυτταροτοξικότητα

Γ8.1. Οι σ2 προσδέτες δεν είναι επιβλαβής για τους φυσιολογικούς

Γ9. Τελικές υποθέσεις και προοπτικές για τη θεραπεία του καρκίνου

Γ10. Τελικές Παρατηρήσεις

Γ10.1 Τα ανάλογα της αδαμαντίνης (adamantine derivatives): ένας νέος σ προσδέτης με αντικαρκινική δράση

Γ10.2. Τελικές Παρατηρήσεις

**Δ. Επίλογος-Συμπεράσματα- Προοπτικές**

**Ε. Βιβλιογραφία**

# A. Εισαγωγή

## A1. Ιστορική αναδρομή

Οι  $\sigma$  υποδοχείς προτάθηκαν για πρώτη φορά το 1976 από τον Martin βασιζόμενος στην SKF-10047 (N-αλλυλονορμεταζοκίνη) και τις σχετικές βενζομορφάνες [Martin, W.R., et al (1976)]. Το όνομα τους στην πραγματικότητα προέρχεται από το πρώτο γράμμα "S" της ένωσης SKF-10047 η οποία πιστεύεται ότι είναι το πρότυπο προσδέτη για τους υποδοχείς αυτούς. Μέσα στα επόμενα 10 χρόνια, μια σειρά από μελέτες στην αλληλεπίδραση της SKF-10047 με έναν αριθμό διακριτών θέσεων πρόσδεσης, οδήγησε σε μεγάλη σύγχυση σχετικά με την πραγματική ταυτότητα και τη φύση των υποδοχέων κατά την πρώιμη κιάλας ιστορία τους.

Οι  $\sigma$  υποδοχείς αρχικά πιστευόταν πως αποτελούν έναν τύπο υποδοχέα των οπιοειδών. Αυτή η πεποίθηση προήλθε πάλι από μια ιστορική μελέτη της παραπάνω ομάδας του Martin οι οποίοι ταξινόμησαν την SKF-10047 και τις άλλες βενζομορφάνες σε χρονίως μορφίνο-εξαρτώμενες και μη εξαρτώμενες σε νωτιαίο μυελό σκύλων (spinal dogs). Σε αυτή την πρωτοποριακή μελέτη, ανακαλύφθηκε ότι οι φυσιολογικές δράσεις των ενώσεων που δοκιμάστηκαν ανήκαν σε τρεις διακριτές ομάδες. Αυτοί υπέθεσαν ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων προήλθε από αλληλεπιδράσεις με διαφορετικούς υποτύπους των υποδοχέων των οπιοειδών. Αρχικά πρότειναν, έναν  $\mu$  υπότυπο που μεσολαβεί στην δράση της μορφίνης και των άλλων σχετικών ενώσεων, έναν  $\kappa$  υπότυπο βάση της δράσης του ketocyclazocine και της ομάδας τέτοιων ενώσεων, και έναν  $\sigma$  υπότυπο ο οποίος χαρακτηριζόταν από την SKF-10047 και τις σχετικές με αυτήν άλλες ενώσεις. Στην μελέτη του ο Martin χρησιμοποίησε τις ρακεμικές βενζομορφάνες, σε ένα μίγμα των (+) - και (-) - ισομερών τους. Ως εκ τούτου, σε μετέπειτα μελέτες, όταν τα ισομερή των βενζομορφάνων αξιολογήθηκαν ξεχωριστά, προσδιορίστηκε ότι τα (-) - ισομερή, αντιπροσώπευαν στην συντριπτική τους πλειοψηφία των οπιοειδών-προκαλούμενες επιδράσεις. Στην περίπτωση της SKF-10047, το (+) - ισομερές προσδιορίστηκε σε μεταγενέστερες μελέτες για να παραχθούν δράσεις που δεν έχουν ευαισθησία στον ανταγωνιστή των οπιοειδών, ενώ το (-) - ισομερές αποκρινόταν σε αυτούς [Su TP. (1982)]. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η των οπιοειδών-μεσολαβούμενη δράση του (-) - SKF-10047, οφείλεται κυρίως στους  $\mu$  και  $\kappa$  υποδοχείς των οπιοειδών.

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, προέκυψε ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον για το (+) - ισομερές της SKF-10047, όταν διαπιστώθηκε ότι εμφάνιζε παρόμοιες



ιδιότητες με την φαινκυκλιδίνη (PCP) . Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, έκανε την εμφάνισή του στην βιβλιογραφία και ο όρος  $\sigma$  / PCP και πολλοί ερευνητές πίστευαν ότι οι θέσεις των  $\sigma$  και PCP είναι ταυτόσημες. Υπήρξαν πειστικές αποδείξεις ότι η (+) - SKF-10047 αλληλεπιδρούσε με την θέση πρόσδεσης της PCP, η οποία τελικά προσδιορίστηκε να είναι μέσα στο ιοντοφόρο τμήμα του υποδοχέα N-μεθυλ-D-ασπαρτικό (NMDA) . Ωστόσο, με την ταυτοποίηση των εκλεκτικών προσδετών για τον NMDA υποδοχέα, κατέστη προφανές ότι [ $^3\text{H}$ ] (+) - SKF-10047 θέση πρόσδεσης, θα μπορούσε να μετατοπιστεί εν μέρει μόνο με την χρήση εκλεκτικών προσδετών των NMDA υποδοχέων [Hanner M, et al (1996)]. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι η (+) - SKF-10047 συνδέεται με μια άλλη περιοχή εκτός από το ιονοφόρο του NMDA υποδοχέα. Αυτή η άλλη θέση πρόσδεσης τελικά έχει αναγνωριστεί ως η οντότητα, βάσει της οποίας ο  $\sigma$  υποδοχέας διατηρεί έως σήμερα την αρχιτεκτονική του.

Επίσης την δεκαετία του 1980, πρωτοποριακές μελέτες του Su TP. (1982)] έριξαν φως σε αυτό την επιπλέον ένωση του [ $^3\text{H}$ ] SKF-10047 προσδέτη. Οι μελέτες αυτές τελικά οδήγησαν στην ταυτοποίηση ενός μοναδικού προτύπου εκλεκτικότητας φαρμάκου για τους  $\sigma$  σε σχέση με άλλους γνωστούς υποδοχείς. Χρησιμοποιώντας την ομογενοποίηση του εγκεφάλου σε ινδικά χοιρίδια, ο Su ταυτοποίησε στην [ $^3\text{H}$ ] ( $\pm$ ) - SKF-10047 τις θέσεις πρόσδεσης με τους  $\sigma$  υποδοχείς, οι οποίες ήταν απρόσιτες για το οπιοειδές ετορφίνη. Ραδιοσυνδεδεμένη πρόσδεση σε αυτές τις περιοχές, οι οποίες είναι σήμερα αναγνωρισμένες ως  $\sigma$  υποδοχείς, μπορούσαν να ανασταλούν από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της φωσφολιπάσης C και των δισθενών κατιόντων, παρουσιάζοντας ένα προφίλ πρόσδεσης του φαρμάκου, που έρχεται σε αντίθεση με οτιδήποτε ήταν γνωστό έως εκείνη τη στιγμή [Su TP. (1982)]. Σε αυτές τις κλασσικές μελέτες, ο Su απέδειξε ότι οι  $\sigma$  υποδοχείς εμφανίζουν υψηλή συνάφεια με αρκετές (+) - βενζομορφάνες συμπεριλαμβανομένου των (+) - πενταζοκίνη, dextrallorphan, και (+) - κυκλαζοκίνη. Αυτές οι θέσεις πρόσδεσης ήταν διαφορετικές από ότι για τους κλασσικούς οπιοειδής υποδοχείς, επειδή πέραν του ότι έχουν αντίστροφη στερεοεκλεκτικότητα για τις βενζομορφάνες [δηλαδή τους υποδοχείς των οπιοειδών που κατά προτίμηση συνδέονται με το (-) – ισομερές], επιπλέον, ένας αριθμός των καθιερωμένων οπιοειδών και των οπιοειδών πεπτιδίων, δεν επιδεικνύει σημαντικού βαθμού συνάφεια για αυτές τις θέσεις. Επίσης, αυτές οι ετορφινικά-απρόσιτες θέσεις προσδέουν επίσης νευροληπτικές ουσίες όπως η αλοπεριδόλη, το αντικαταθλιπτικό μιπραμίνη, τον P-αδρενεργικό αποκλειστή της προπρανολόλης, και το συνδεδεμένο με την αναισθησία PCP. Όλα επομένως τα δεδομένα από την μελέτη

του Su έδειξαν σαφώς την ύπαρξη ενός νέου και ακόμη απροσδιόριστου υποδοχέα, ο οποίος είναι σήμερα αναγνωρίζεται ως σ.

Σε αντίθεση με την πρώιμη ιστορία για τους σ υποδοχείς που ορίζεται από φαρμακολογικές μελέτες, η επανάσταση στη μοριακή και την κυτταρική βιολογία, έχει αλλάξει σημαντικά τον τρόπο με τον οποίο προσεγγίζονται αυτοί οι υποδοχείς. Αν και ο αντίκτυπός της στον τομέα των σ υποδοχέων ήταν σχετικά πιο αργός από ό, τι σε άλλα πεδία, εντούτοις έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος. Βασικότερη μεταξύ των επιτευγμάτων ήταν η κλωνοποίηση του πρώτου σ υποδοχέα (σ1 υπότυπου). Το επίτευγμα αυτό έδωσε αρκετές πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία του υποδοχέα, καθώς και την σχέση τους με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Επιπλέον, η ανάπτυξη των κυττάρων και των μοριακών βιολογικά-βασισόμενων ερευνών, επέτρεψαν να διευκρινιστεί περαιτέρω η λειτουργία του σ υποδοχέα.

## **A2. Υποκατηγορίες των σ υποδοχέων και παραλλαγές ματίσματος**

Υπάρχουν δύο καθιερωμένοι υπότυποι σ υποδοχέων, οι οποίοι έχουν ορισθεί ως σ1 και σ2. Αυτοί οι δύο υπότυποι μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους με βάση το μοριακό τους βάρος, την κατανομή τους στους ιστούς και τα μοτίβα εκλεκτικότητας των φαρμάκων. Ο σ1 υπότυπος έχει κλωνοποιηθεί σε ένα αριθμό οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου ποντίκια, ινδικά χοιρίδια, και στον άνθρωπο. Αυτός ο υπότυπος έχει βρεθεί ότι είναι μια πρωτεΐνη 223 αμινοξέων που καλύπτει τουλάχιστον μία διαμεμβρανική περιοχή. Εκφράζεται ευρέως σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων της καρδιάς και του σπλήνα όπου η έκφραση του σ1 υποτύπου φαίνεται να υπερτερεί του σ2 υποτύπου [Wolfe SA Jr, et al (2001)]. Οι σ1 υποδοχείς φαίνεται να μετατοπίζονται κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης και να συνδέονται με την διαμόρφωση ή την παραγωγή ενδοκυτταρικών δεύτερων αγγελιαφόρων. Επιπλέον, οι σ1 υποδοχείς μπορούν να προσδεθούν με άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της ανκυρίνης B, της πρωτεΐνης θερμοπληξίας 70 (hsp70), την συζυγή πρωτεΐνη θερμοπληξίας (HSC 70), γλυκόζο-σχετιζόμενη πρωτεΐνη (GRP78 / BiP), και τα κανάλια καλίου [Hayashi T, et al.(2001), Yamamoto H, et al (2002)]. Για την μελέτη της λειτουργία τους, χρησιμοποιείται συνήθως η (+) - πενταζοκίνη ως εκλεκτικός αγωνιστής στους σ1 υποδοχείς, καθώς και εκλεκτικοί ανταγωνιστές όπως L- [2- (3,4-διχλωροφαινυλο) αιθυλο] -4-μεθυλ πιπεραζίνη (BD1063) και N , N- διπροπυλο-2- [4-μεθοξυ-3- (2-φαινυλαιθοξυ) phenyl]ethylamine (NE-100) είναι επίσης διαθέσιμοι [Chaki S, et ai (1994)]. Επίσης, αλληλουχία-ειδικών αντισωμάτων, antisense ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια και ένα σ1 knockout ποντίκι, αναπτύχθηκαν

προκειμένου να οριοθετηθούν περαιτέρω οι λειτουργίες αυτού του υποτύπου υποδοχέα [Hayashi T, et al (2000), Romieu P, et al (2004)].

Ο  $\sigma_2$  υπότυπος φαίνεται να είναι μια ξεχωριστή φυσική οντότητα από τον  $\sigma_1$  υποδοχέα. Συγκρίσεις των μεγεθών τους σε μελέτες που βασίζονται στην επισήμανσή τους, έδειξαν ότι το  $\sigma_2$  υπότυπος είναι ελαφρώς μικρότερος από τον  $\sigma_1$  υποδοχέα [Hellewell SB et al (1994)]. Η αλληλουχία του  $\sigma_2$  υποδοχέα δεν έχει ακόμη καθοριστεί, αν και σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στον τομέα αυτό τα τελευταία χρόνια. Σε αντίθεση με τους  $\sigma_1$  υποδοχείς που μετατοπίζονται εύκολα, οι  $\sigma_2$  φαίνεται να είναι σχεδίες λιπιδικών πρωτεϊνών που επηρεάζουν την σηματοδότηση του ασβεστίου μέσω των προϊόντων του σφιγγολιπιδίου. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν αποκλειστικά εκλεκτικοί  $\sigma_2$  αγωνιστές και  $\sigma_2$  ανταγωνιστές. Ο (+) - LR, 5K- (E) -8-(3,4-διχλωροβενζυλιδένιο) -5-(3-υδροξυφαινυλ) -2-methylmorphan-7-όνη (CB-184), είναι ένας από τους πιο εκλεκτικούς  $\sigma_2$  αγωνιστές, που αλληλεπιδρά επίσης με τους  $\mu$  οπιοειδείς υποδοχείς. Ο 1'- [4- [L- (4fluorophenyl) -1H-ινδολ-3-υλ] -L-βουτυλ] σπειρο [ισοβενζοφουραν-1 (3H), 4'-πιπεριδίνη (Lu 29 έως 179), αποτελεί επίσης έναν από τους πιο εκλεκτικούς  $\sigma_2$  ανταγωνιστές, που αλληλεπιδρά πάλι και με τους υποδοχείς της ντοπαμίνης D2 και  $\alpha$ -αδρενεργικών υποδοχέων [Perregaard J, et al (1998-2008)], ενώ ο ( $\pm$ ) -tropanyl 2- (4chlorophenoxy) βουτανοϊκός εστέρας [( $\pm$ )-SM-21] αλληλεπιδρά και με τους μεταφορείς της ντοπαμίνης (αδημοσίευτα δεδομένα). Ως εκ τούτου, για τη μελέτη της λειτουργίας του  $\sigma_2$  υποδοχέα, προσδέτες όπως ο DTG έχουν χρησιμοποιηθεί σε συστήματα που είναι εμπλουτισμένα σε  $\sigma_2$  υποδοχείς. Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί μη εκλεκτικά στους  $\sigma_2$  συστατικά, σε συστήματα που είναι εμπλουτισμένα με  $\sigma$  υποδοχείς. Η ανάπτυξη πραγματικών εκλεκτικών πειραματικών εργαλείων με τα οποία θα χειραγωγήσουν τους  $\sigma_2$  υποδοχείς, θα ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό την κατανόηση της λειτουργίας τους. Εκτός από τους  $\sigma_1$  και  $\sigma_2$  υποδοχείς, πολλές μελέτες αναφέρουν αποδείξεις για την ύπαρξη πρόσθετων υποτύπων [Booth RG et al 1993]. Ωστόσο, αυτοί οι υποθετικοί υπότυποι δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί καλά.

Πέραν από τους υποτύπους των  $\sigma$  υποδοχέων, υπάρχουν αποδείξεις για παραλλαγές ματίσματος. Μέχρι στιγμής, μόνο στον  $\sigma_1$  υπότυπο έχει βρεθεί η αλληλουχία. Αλλά, οι πληροφορίες σχετικά με τις παραλλαγές ματίσματος περιορίζονται ακόμη και σήμερα μόνον σε αυτόν τον υπότυπο. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο εκδοχές για την παραλλαγή του ματίσματος για τον  $\sigma_1$  υποδοχέα [(Zamanillo D, et al (2002), Inada T, et al 2004)], αλλά ο βαθμός στον οποίο αυτές οι παραλλαγές ματίσματος

επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες είναι ακόμα άγνωστος. Ωστόσο, διεξάγονται διάφορες μελέτες που εξετάζουν ένα πολυμορφισμό του  $\sigma$  υποδοχέα σε διάφορες νοσηρές καταστάσεις. Τα αποτελέσματα τους είναι ανάμεικτα, αλλά τα διαθέσιμα μέχρι στιγμής δεδομένα τους, υποστηρίζουν την πιθανότητα ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί, επιφέρουν και τις ανάλογες λειτουργικές συνέπειες [Miyatake R, et al 2004)].

### **A3. Ανατομική κατανομή των $\sigma$ υποδοχέων**

Οι  $\sigma$  υποδοχείς είναι παρόντες σχεδόν παντού στο σώμα και ο ακριβής εντοπισμός τους, μπορεί να πραγματοποιηθεί από ενδείξεις σχετικά με τις φυσιολογικές λειτουργίες τους.

#### **A3.1. Νευρικό σύστημα**

Μετά τις πρώτες αναφορές για  $\sigma$  υποδοχείς στον εγκέφαλο, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν χαρτογραφήσει την κατανομή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι  $\sigma$  υποδοχείς βρίσκονται στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, όπου υποβοηθούν μια ποικιλία από φυσιολογικές λειτουργίες. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των  $\sigma$  υποδοχέων στον εγκέφαλο, βρέθηκαν στους κινητικούς πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους. Κρανιακά νεύρα, όπως το πρόσωπο, το υπογλώσσιο, και το τρίδυμο περιέχουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα σε  $\sigma$  υποδοχείς [Bouchard P, et al (1997), Gundlach AL, et al (1986), McLean S, et al (1988)]. Άλλα μέρη του εγκεφαλικού στελέχους, συμπεριλαμβανομένης της παρεγκεφαλίδας, του ερυθρού πυρήνα, και κάτω ελιάς είναι επίσης πλούσια σε  $\sigma$  υποδοχείς [Bouchard P, et al (1997), Gundlach AL, et al (1986), McLean S, et al (1988)]. Αυτό το πρότυπο κατανομής προβλέπει έναν ρόλο των  $\sigma$  υποδοχέων στην κινητική λειτουργία, η οποία επιβεβαιώθηκε σε διάφορες αρχικές λειτουργικές μελέτες [Iran TT, et al (1998)]. Τα βασικά γάγγλια περιέχουν επίσης μέτρια επίπεδα  $\sigma$  υποδοχέων [Bouchard P, et al (1997), Gundlach AL, et al (1986), McLean S, et al (1988)]. Μελέτες σε διάφορες βλάβες, έδειξαν ότι οι  $\sigma$  υποδοχείς εντοπίζονται στην μέλαινα ουσία στους συμπαγείς νευρώνες [Gundlach AL, et al (1986)], και αυτή η κατανομή είναι συνεπής με την ικανότητα ενός αγωνιστή του  $\sigma$  υποδοχέα για την τόνωση της κινητικής συμπεριφοράς, μέσω των μελανοραβδωτών ντοπαμινεργικών οδών [Walker JM, et al (1993)]. Συνεπής με την πλούσια κατανομή των  $\sigma_2$  υποδοχέων στη μέλαινα ουσία ([Bouchard P, et al (1997)], αυτοί οι υποδοχείς είναι ο πρώτος υπότυπος που εμπλέκεται στην κινητική λειτουργία [Walker JM, et al (1993)]. Με την πάροδο του χρόνου, τα συσσωρευμένα δεδομένα

από ανατομικές και λειτουργικές μελέτες, υποστηρίζουν την συμμετοχή τους τόσο του σ1 όσο και του σ2 υπότυπου στην κινητική λειτουργία [Bouchard P, et al (1997)].

Σημαντικά επίπεδα σ υποδοχέων, βρίσκονται επίσης στις μεταιχμιακές περιοχές του εγκεφάλου. Ο εντοπισμός των σ υποδοχέων στην οδοντωτή έλικα και πυραμιδική στοιβάδα των κυττάρων του υπόκαμπου [Bouchard P, et al (1997), Gundlach AL, et al (1986), McLean S, et al (1988)], υποστηρίζει τον ρόλο τους στη μάθηση και την μνήμη. Επιπλέον, στον υπόκαμπο, και συγκεκριμένα η οδοντωτή έλικα, είναι πλούσια με τον σ1 υπότυπο [Bouchard P, et al (1997)], γεγονός που έχει ενοχοποιηθεί για την ρύθμιση της γνωστικής συμπεριφοράς.

Η παρουσία των σ υποδοχέων στον οσφρητικό βολβό και άλλα μεταιχμιακό και paralimbic σύστημα, όπως ο μετωπιαίος φλοιός, η έλικα του προσαγωγίου, ο υπόκαμπος και η αμυγδαλή, υποδηλώνει ότι μπορεί να διαμορφώνουν τις συναισθηματικές καταστάσεις [McLean S, et al (1988)]. Αυτό είναι σύμφωνο με τον προφανή ρόλο τους στην κατάθλιψη και σε άλλες διαταραχές της διάθεσης.

Οι νευροενδοκρινείς περιοχές είναι επίσης πλούσιες σε σ υποδοχείς. Ο υπεροπτικός και παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου, οι οποίοι στέλνουν συνδέσεις στην υπόφυση, παρουσιάζουν μεγάλη πυκνότητες σ υποδοχέων, όπως και η αδενούπόφυση [Gundlach AL, et al (1986), McLean S, et al (1988)]. Άλλες υποθαλαμικές περιοχές που περιέχουν επίσης σημαντικές συγκεντρώσεις σ υποδοχέων [McLean S, et al (1988)], και αυτές οι περιοχές είναι ιδιαίτερα πλούσιες με τον σ1 υπότυπο [Bouchard P, et al (1997)].

Αν και η ανατομική κατανομή των σ υποδοχέων είναι άκρως ενδεικτική του ρόλου τους στην απελευθέρωση των ορμονών από την υπόφυση, συστηματικές λειτουργικές μελέτες προκειμένου να εξεταστεί αυτό το ζήτημα δεν έχουν διεξαχθεί. Ωστόσο, η ικανότητα της SKF-10047 να αυξήσει τα επίπεδα της κορτικοστερόνης στο πλάσμα με ένα ναλοξόνης-ανεξάρτητο τρόπο [Eisenberg RM, et al (1985)] υποστηρίζει αυτή τη δυνατότητα. Η πρόσθετη παρουσία σ υποδοχέων στα ενδοκρινή όργανα (βλέπε παρακάτω), δείχνει επιπλέον ότι αυτό μπορεί να είναι μια εύφορη περιοχή για μελλοντική έρευνα.

Σε αντίθεση με τα αμελητέα επίπεδα σ υποδοχέων στις περισσότερες αισθητικές περιοχές του εγκεφάλου, αρκετές περιοχές του οπτικού συστήματος περιέχουν σημαντικές πυκνότητες σ υποδοχέων [McLean S, et al (1988)]. Αυτές οι περιοχές περιλαμβάνουν το πλάγιο γονατώδες σώμα και το άνω έπαρμα [McLean S, et al

(1988)]. Μαζί με τις πρόσφατες αναφορές για τους  $\sigma$  υποδοχείς στο μάτι , πρόσθετες μελέτες είναι αναγκαίες να διεξαχθούν για να εξετάσουν τον περαιτέρω ρόλο των  $\sigma$  υποδοχέων στην οπτική λειτουργία.

Η φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού περιέχει εξαιρετικά υψηλές πυκνότητες  $\sigma$  υποδοχέων υποδοχέων [Gundlach AL, et al (1986)]. Το κοιλιακό κέρασ του κινητικού μέρους του νωτιαίου μυελού είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε αυτούς τους υποδοχείς υποδοχέων [Gundlach AL, et al (1986)], το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τον ρόλο των  $\sigma$  υποδοχέων στον κινητικό έλεγχο. Επιπλέον, ένας ρόλος στην αισθητικότητα έχει προταθεί για αυτούς τους υποδοχείς, λόγω της έκφρασή τους στα ραχιαία γάγγλια των ριζών υποδοχέων [Gundlach AL, et al (1986)]. Δεδομένου ότι η κεντρική φαιά ουσία στον μεσεγκέφαλο περιέχει επίσης υψηλές πυκνότητες  $\sigma$  υποδοχέων [Gundlach AL, et al (1986), McLean S, et al (1988)], είναι κατανοητό ότι αυτοί ρυθμίζουν την αισθητήρια μετάδοση του πόνου.

### **A3.2. Περιφερικά όργανα**

Εκτός από την παρουσία τους στο νευρικό σύστημα, οι  $\sigma$  υποδοχείς εντοπίζονται και σε ποικίλα περιφερειακά όργανα. Η πρόωρη ένδειξη για την ύπαρξη  $\sigma$  υποδοχέων στην περιφέρεια προήλθε από μελέτες σύνδεσης σε ομογενοποιημένα ιστών, τα οποία μερικές φορές ακολουθούν αυτοραδιογραφικές έρευνες για να εξακριβωθεί πιο διακριτικά ο εντοπισμός τους σε φέτες του παρασκευάσματος. Πιο πρόσφατα, τα στοιχεία για την ύπαρξη των  $\sigma$  υποδοχέων σε περιφερικά όργανα, προέκυψαν, από μελέτες απεικόνισης σε ζωντανούς οργανισμούς και Northern blot ανάλυση, έναντι των μεταγραφών που συμβαίνουν για τον  $\sigma 1$  υπότυπο. Η ευρεία διανομή των  $\sigma$  υποδοχέων στο σώμα υποδηλώνει ότι εκτελούν ουσιαστικό ρόλο στην φυσιολογική λειτουργία.

Στην καρδιά περιέχονται σημαντικά επίπεδα  $\sigma$  υποδοχέων. Μελέτες δέσμευσης σε ομογενοποιημένα, δείχνουν ότι πάνω από το 80% των  $\sigma$  υποδοχέων στην καρδιά είναι του  $\sigma 1$  υποτύπου [Novakova M, et ai (1995)]. Αυτοί οι υποδοχείς είναι παρόντες στους δύο παρασυμπαθητικού νευρώνες που νευρώνουν [Novakova M, et ai (1995), Zhang H, et ai (2002)] τα καρδιακά μυοκύτταρα. Στα μυοκύτταρα, οι  $\sigma$  υποδοχείς επηρεάζουν την συσταλτικότητα, την εισροή του ασβεστίου, και την παλμική συχνότητα [Novakova M, et ai (1995)]. Στους ενδοκαρδιακούς νευρώνες, οι  $\sigma 1$  και οι  $\sigma 2$  υπότυποι επηρεάζουν την νευρική διεγερσιμότητα, με ρύθμιση του ασβεστίου και των καναλιών καλίου, αντίστοιχα [Zhang H, et ai (2002)]. Οι συνολικές επιπτώσεις

αυτών των επιρροών στις φυσιολογικές παραμέτρους της καρδιαγγειακής λειτουργίας δεν είναι ακόμα πλήρως σαφής.

Υπάρχουν αρκετές αναφορές για εντοπισμό των  $\sigma 1$  υποδοχέων στον πνεύμονα [van Waarde A, et al (2004)]. Δεν είναι σαφές αν  $\sigma 2$  υποδοχείς είναι επίσης παρόντες. Ο ρόλος των  $\sigma 1$  υποδοχέων στον πνεύμονα παραμένει μέχρι τώρα ανεξερευνήτος.

Τα υψηλότερα επίπεδα  $\sigma$  υποδοχέων στο σώμα έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται στο ήπαρ. Υπάρχουν τόσο  $\sigma 1$  όσο και  $\sigma 2$  υπότυποι [van Waarde A, et al (2004)]. Ωστόσο, η λειτουργία των  $\sigma$  υποδοχέων στο ήπαρ είναι προς το παρόν άγνωστη. Οι πρώτες μελέτες υπέθεσαν ότι θα μπορούσαν να έχουν έναν ρόλο όπως αυτό του κυτοχρώματος P450, πράγμα που δεν υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα [Monnet FP, et al (1993)].

Το νεφρό περιέχει  $\sigma 1$  και  $\sigma 2$  υποδοχείς [van Waarde A, et al (2004)]. Η λειτουργία τους στο νεφρό δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί.

Τα αναπαραγωγικά όργανα όπως όρχεις, ωοθήκες, ο σπερματικός πόρος και ο πλακούντας περιέχουν  $\sigma$  υποδοχείς [Wolfe SA Jr , et al (1989)]. Ο ειδικός υπότυπος που υπάρχει μέσα σε αυτούς τους ιστούς είναι ασαφής, αφού οι μελέτες που διεξήχθησαν δεν είχαν σημειωθεί για κάποια εκλεκτικότητα στους δύο υπότυπους [Wolfe SA Jr , et al (1989)]. Οι αυτοραδιογραφικές μελέτες για τον εντοπισμό των υποδοχέων πραγματοποιήθηκαν σε ορισμένους από αυτούς τους ιστούς. Στους όρχεις, η  $\sigma$  πρόσδεση είναι υψηλότερη στα απαγωγά σωληνάρια και τον πόρο της επιδιδυμίδας, και χαμηλότερη σε όλα τα σπερματικά σωληνάρια [Wolfe SA Jr , et al (1989)]. Στις ωοθήκες, παρουσιάζονται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των  $\sigma$  υποδοχέων σε συνθήκες ωρίμανσης των ωοθυλακίων [Wolfe SA Jr , et al (1989)].

Τα επινεφρίδια περιέχουν  $\sigma$  υποδοχείς. Η παρουσία του  $\sigma 1$  υποτύπου έχει επιβεβαιωθεί [Wolfe SA Jr , et al (1989)], ενώ ο βαθμός στον οποίο εκφράζονται οι  $\sigma 2$  υποδοχείς είναι ασαφής. Αν και η λειτουργία των υποδοχέων στα επινεφρίδια δεν έχει μελετηθεί συστηματικά, μπορεί να έχουν έναν ρόλο στην διαμόρφωση των νευροενδοκρινικών διεργασιών [Paul IA, et al (1993)].

Παρόμοια με την καρδιά, ο σπλήνας είναι πλούσιος σε  $\sigma 1$  υποδοχείς [Wolfe SA Jr, et al (2001)]. Αυτοραδιογραφικές μελέτες αποκάλυψαν ότι οι  $\sigma 1$  υποδοχείς είναι σε πιο μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ζώνες των T κυττάρων [Wolfe SA Jr, et al (2001)]. Η παρουσία των  $\sigma$  υποδοχέων μαζί με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και την

ικανότητα των στεροειδών να προσδένονται με αυτούς τους υποδοχείς [Su T-P, et al (1991)], διαφαίνεται ίσως κάποιος ρόλος για αυτούς τους υποδοχείς στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Το γαστρεντερικό σύστημα περιέχει σημαντικά επίπεδα  $\sigma$  υποδοχέων, και των δύο υποτύπων [Harada Y, et al (1994)]. Εντός του γαστρεντερικού σωλήνα, αυτοραδιογραφικές μελέτες αποκάλυψαν υψηλές συγκεντρώσεις  $\sigma$  υποδοχέων στο βλεννογόνο και υποβλεννογόνο πλέγμα [Roman F, et al (1989)]. Το σήμα ήταν ιδιαίτερα πυκνό στο επίπεδο του θόλου και του δωδεκαδάκτυλου [Roman F, et al (1989)].

Οι  $\sigma 1$  υποδοχείς έχουν πρόσφατα εντοπισθεί και στους οφθαλμούς [Shamsul Ola M, et al (2001), Wang WF, et al (2002)]. Βρίσκονται στην ίριδα, το ακτινωτό σώμα και τον αμφιβληστροειδή [Wang WF, et al (2002)] Συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων που περιέχουν  $\sigma 1$  υποδοχείς mRNA και την πρωτεΐνη αποτελούν: τα γαγγλιοκύτταρα του αμφιβληστροειδούς, οι φωτοϋποδοχείς, και τα επιθηλιακά μελανοφόρα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς [Shamsul Ola M, et al (2001)], τα οποία επιπλέον σχετίζονται με τα κύτταρα στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα [Shamsul Ola M, et al (2001)]. Έρευνες για την φυσιολογική και θεραπευτική σημασία των  $\sigma$  υποδοχέων στην λειτουργία της όρασης, έχουν ήδη ξεκινήσει, ενώ τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι οι αγωνιστές των  $\sigma$  υποδοχέων, μπορεί να μειώνουν την πίεση των οφθαλμών και να προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή από τον κυτταρικό θάνατο [Senda T, et al (1998)].

### **A3.3. Κυτταρικοί τύποι**

Οι  $\sigma$  υποδοχείς βρέθηκαν σε μία ποικιλία τύπων κυττάρου που δεν αποτελούν συστατικά μόνο κάποιων οργάνων. Φυσιολογικά-απαντώμενα κύτταρα όπως τα κύτταρα του αίματος, αλλά και τα κύτταρα του όγκου, περιέχουν σημαντικά επίπεδα  $\sigma$  υποδοχέων. Στα κύτταρα του αίματος που εκφράζουν  $\sigma$  υποδοχείς περιλαμβάνονται: λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος, κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, και TNF κύτταρα [Wolfe SA Jr, et al (1998)]. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν επίσης υψηλή συγκέντρωση σε  $\sigma$  υποδοχείς, και πολλές μελέτες αναφέρουν ότι εκφράζονται σε ιδιαίτερα υψηλές ποσότητες σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα στους όγκους [Wheeler KT, et al (2000)].

### **A.4. Μοριακά Χαρακτηριστικά των $\sigma 1$ υποδοχέων**



**A4.1. Ο σ1 υποδοχέας :** Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα σ1 έχει κλωνοποιηθεί και φαίνεται ότι είναι διαφορετικό από οποιαδήποτε γνωστή κατηγορία υποδοχέων [Hanner,M.,et al.(1996)]. Το πρωτεϊνικό προϊόν των 25300 kDa αυτού του γονιδίου, αναφέρεται ότι στερείται, σημαντικών κατά γενική ομολογία ομοιοτήτων με όλες τις γνωστές πρωτεΐνες στα θηλαστικά, αλλά αντιθέτως συγκλίνει προς τις μυκητιασικές ισομεράσες της στερόλης.

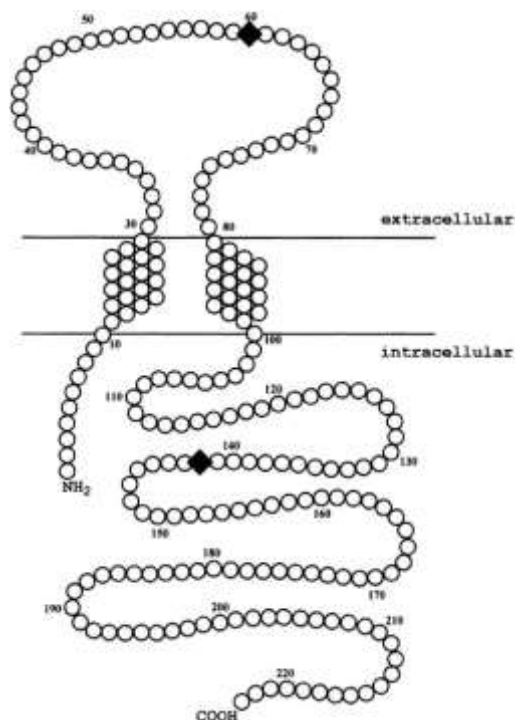
Το γονίδιο του σ1 έχει απομονωθεί από ινδικό χοιρίδιο, ποντίκια και τον άνθρωπο [Hanner,M.,et al.(1996),Kekuda, R. et al. (1996)]. Έχει περίπου 7 kbp μάκρος και περιέχει τέσσερα εξώνια, που διακόπτονται από τρία εσώνια. Το εξώνιο 3 είναι το κοντότερο (93 bp), και το εξώνιο 4 είναι το μακρύτερο (1132 bp). Μεταξύ των εσωνίων, το 3 εσώνιο είναι το μεγαλύτερο (περίπου 1250 bp).

Το εξώνιο 2 κωδικοποιεί την ενιαία διαμεμβρανική περιοχή παρουσία του υποδοχέα. Στον άνθρωπο, το γονίδιο για τον σ1 υποδοχέα βρίσκεται επί του χρωμοσώματος 9p13, σε μια περιοχή που σχετίζεται με ψυχιατρικές διαταραχές [Prasad PD, et al (1998)]. Μια παραλλαγή ματίσματος του σ1 υποδοχέα έχει βρεθεί σε κύτταρα Jurkat [Ganapathy ME, et al (1999)] και σε ποντίκια [Wang LM, et al (2000)]. Ενδιαφέρον είναι, ότι οι παραλλαγές ματίσματος του σ1 υποδοχέα, έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν χαρακτηριστικά σ2υποδοχέων [Wang LM, et al (2004)].

**A4.2. Οι σ1 σε Knockout ποντίκια:** Πρόσφατα, παρασκευάστηκε σ1 υποδοχέας σε Knockout ποντίκια για τη διερεύνηση της in vivo συνάφειάς του. Τα ομόλογα μεταλλαγμένα ποντίκια βρέθηκε ότι ήταν βιώσιμα και γόνιμα, και δεν εμφάνιζαν κάτι εμφανές στον φαινότυπο. Μια σημαντική μείωση στην υπερκινητικητική ανταπόκριση μετρήθηκε μετά από θεραπεία με (+) SKF-10047, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση για ένα ρόλο του σ1 υποδοχέα, με ψυχοδιεγερτική δράση [Langa F, et al (2002)].

**A4.3. Μοριακή δομή της πρωτεΐνης του σ1 υποδοχέα:** Οι αναλύσεις με υδροθεραπεία της αλληλουχίας αμινοξέων του σ1 υποδοχέα, αποκάλυψαν πως πρόκειται για ένα ενιαίο διαμεμβρανικό τμήμα [Hanner,M.,et al.(1996),Kekuda, R. et al. (1996)]. Ακολούθως, οι Aydar E, et al.(2002) παρουσίασαν στοιχεία ότι ο σ1 υποδοχέας έχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα που εντοπίζονται στη μεμβράνη του πλάσματος (PM) (όταν εκφράζεται σε ωοκύτταρα *Xenopus laevis*) με το αμινικό (NH<sub>2</sub>) και το καρβοξυλικό (COOH) άκρο του στην κυτταροπλασματική πλευρά της

μεμβράνης. Αυτή η προσέγγιση οδήγησε στην πρόταση ενός μοντέλου για τη μοριακή δομή του  $\sigma 1$  υποδοχέα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 [Aydar et al.(2002)] .



**Εικόνα 1:** Μοντέλο της δομής του  $\sigma 1$  υποδοχέα.[Aydar et al.(2002)]

**A4.4. Μελέτες για τις Μεταλλάξεις του  $\sigma 1$  υποδοχέα:** Επειδή με μια παραλλαγή ματίσματος ο  $\sigma 1$  υποδοχέας που στερείται το εξώνιο 3, δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύει τον  $\sigma$  προσδέτη, η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, με τα κρίσιμα ανιονικά αμινο-όξυνα υπολείμματα, είναι πιθανό να βρίσκεται μέσα ή γύρω από την περιοχή που κωδικοποιείται από το εξώνιο 3 [Ganapathy ME, et al (1999)]. Ο  $\sigma 1$  υποδοχέας στον άνθρωπο, έχει μεταλλαχθεί ξεχωριστά στην περιοχή αυτή για κάθε ένα από τα ανιονικά αμινοξέα, που ετερόλογα εκφράζεται σε MCF-7 κύτταρα, και η επίδραση της κάθε μετάλλαξης στην θέση δέσμευσης του προσδέτη έχει ερευνηθεί [Seth P, et al (2001)]. Οι μελέτες αυτές προσδιορίζουν τα δύο ανιονικά αμινοξέα, D126 και E172, που είναι αναγκαία για την δέσμευση του προσδέτη.

Παρόλο που η λειτουργία δέσμευσης του προσδέτη μπλοκάρεται με οποιαδήποτε από αυτές τις δύο μεταλλάξεις, η έκφραση των μεταλλαγμένων αυτών ουσιών είναι φυσιολογική σε επίπεδο πρωτεΐνης. Ωστόσο, είναι ακόμα δυνατό αυτές οι μεταλλάξεις που προκαλούνται στον  $\sigma 1$  υποδοχέα να εντοπίζεται σε λάθος σημείο; Ως εκ τούτου, η διαπίστωση αυτή θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με κάποια προσοχή. Το μοντέλο του  $\sigma 1$  υποδοχέα (Εικ. 1) θα πρέπει να αντικαταστήσει το προτεινόμενο

σύνδεσης με τον προσδέτη στο COOH-τελικό άκρο του ενδοκυτταρικού τμήματος, πέρα από την προτεινόμενη δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή [Aydar et al.(2002)] . Κατά συνέπεια, οι Wang LM et al. (2004) ανέφεραν ότι παραλλαγές ματίσματος που έχουν χάσει ένα ή περισσότερα από αυτά τα αμινοξέα, όχι μόνο χάνουν τον σ1 προσδέτη, αλλά και αποκτούν τα χαρακτηριστικά του σ2 προσδέτη. Περισσότερη σε βάθος μοριακή έρευνα του σ1 υποδοχέα είναι απαραίτητη, ώστε, να κατανοήσουμε πώς η μοριακή δομή του, σχετίζεται με διάφορους λειτουργικούς του ρόλους.

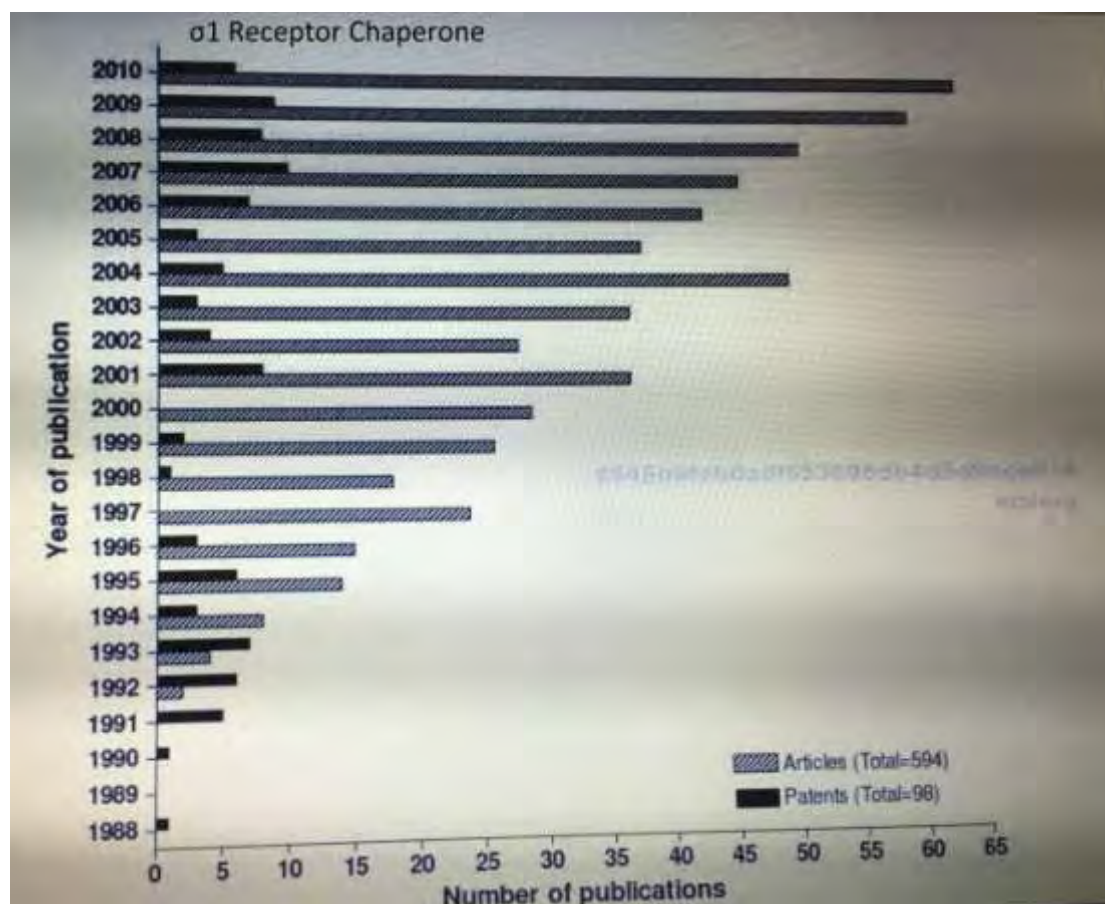
**A4.5. Μοριακή φύση του σ2 υποδοχέα:** Η μοριακή φύση του σ2 υποδοχέα δεν είναι ακόμα γνωστή, παρά τη φαινομενικά υψηλή πυκνότητα φάρμακων που προσδέονται με τον σ1 και σ2 υποδοχέα σε διάφορους ιστούς, π.χ., το ήπαρ [Hellewell SB, et al (1994)]. Μια μελέτη φωτοσυνάφειας χρησιμοποιώντας DTG (ένα φάρμακο του υποδοχέα σ1 και σ2) αποκάλυψε την ύπαρξη δύο ζωνών (μπάντες) πρωτεΐνης  $M_r$  25.000 και 21.500 [Hellewell SB, et al (1994)]. Επειδή ο σ1 υποδοχέας ακολούθως κλωνοποιήθηκε [Seth P, et al (2001)] και αποδείχθηκε ότι είναι μία πρωτεΐνη με  $M_r$  25.300, έχει υποθεθεί ότι το γονίδιο του σ2 υποδοχέα κωδικοποιεί την δεύτερη πρωτεΐνη με  $M_r$  21.500. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες, ωστόσο, το γονίδιο του σ2 υποδοχέα παραμένει άγνωστο.

Έχει προταθεί ότι τα χαρακτηριστικά του σ2 είναι, στην πραγματικότητα, μια συνέπεια του σ1 γονιδίου, κατόπιν εναλλακτικού ματίσματος [Wang LM et al. (2004)]. Ωστόσο, στον σ1 υποδοχέα σε Knockout ποντίκια, αν και ο σ1 προσδέτης-ειδικού φαρμάκου είναι σημαντικά μειωμένος, η δέσμευση του μη ειδικού φαρμάκου (DTG) δεν πραγματοποιείται, υποδηλώνοντας ότι ο σ2 υποδοχέας μένει ανεπηρέαστος [Langa F, et al (2002)]. Πρόσθετες μελέτες απαιτούνται για να διευκρινιστεί αυτό το θέμα, π.χ., χρησιμοποιώντας μελέτες φωτοσυνάφειας με φάρμακα εκλεκτικά στους σ2 υποδοχείς, για να καθοριστεί αν η δεύτερη ζώνη που παρατηρείται σε μελέτες φωτοσυνάφειας του ήπατος με DTG είναι, στην πραγματικότητα, το προϊόν ενός ειδικού γονιδίου που κωδικοποιεί τον σ2 υποδοχέα.

## **A5. Φαρμακολογία των σ 1 υποδοχέων**

Από τότε που άρχισε να εμφανίζεται η έννοια του σ1 υποδοχέα, επικράτησε μεγάλη σύγχυση γύρω από την ταυτότητά του και ακόμα και την σύστασή του, που συνεχίστηκε μέχρι και έως λίγα χρόνια, όπου και έγινε δυνατή η κλωνοποίηση του [Su,T.P.,et al. (2010)]. Τα τελευταία δε χρόνια το ενδιαφέρον για τους σ υποδοχείς

διαρκώς και αυξάνεται και αυτό προκύπτει από το πλήθος των δημοσιεύσεων που ολοένα και αυξάνει (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2**

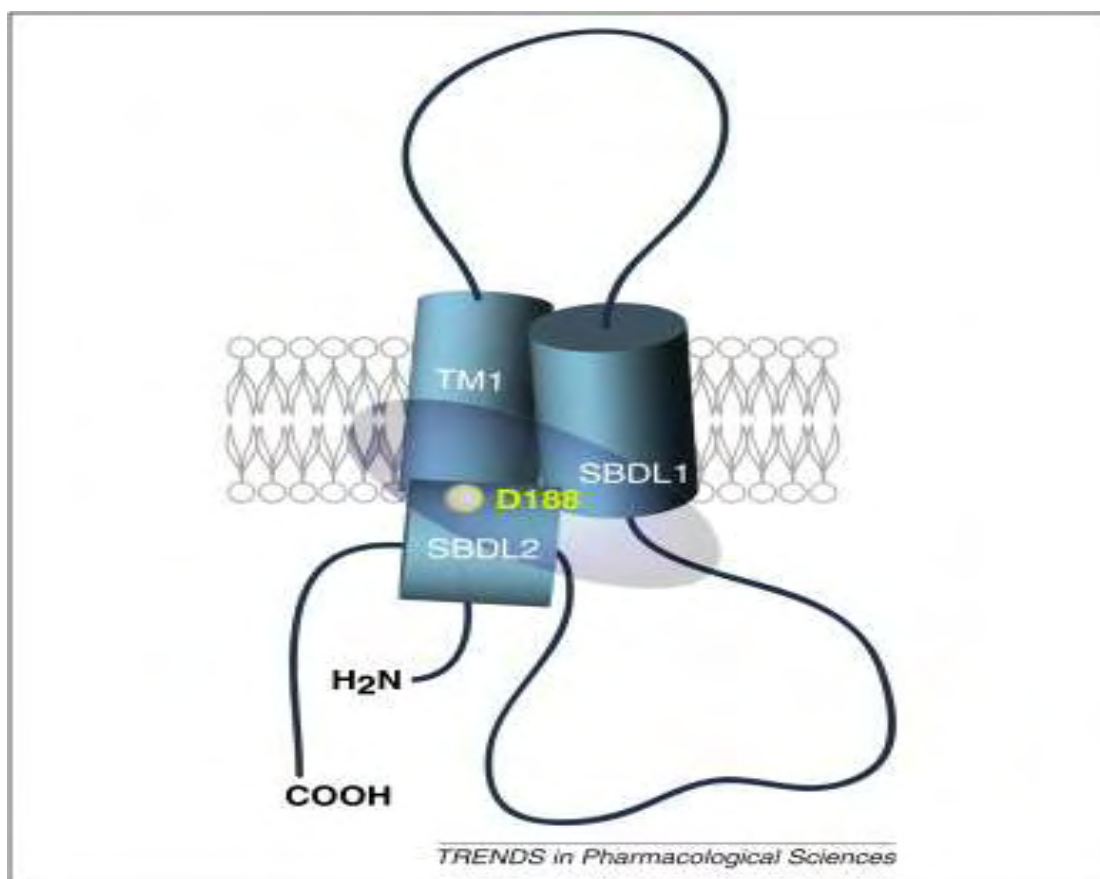
Ο 223-ων αμινοξέων  $\sigma 1$  υποδοχέας, που έχει κλωνοποιηθεί από διάφορα είδη θηλαστικών είναι κατά 90% ταυτόσημος και στο 95% με παρόμοιες αλληλουχίες αμινοξέων [Hanner, M. et al. (1996),Kekuda, R. et al. (1996), Prasad, P.D. et al. (1998), Seth, P. et al. (1998), Mei, J. and Pasternak, G.W. (2001)].Αυτός ο υποδοχέας έχει ταυτοποιηθεί στο 30% και παρουσιάζει 67% ομοιότητα με μια ζυμομυκητική στερόλη C8-C7 ισομεράση (ERG2), η οποία εμπλέκεται στην μετασκουαλένιο-στερόλική σύνθεση [ Moebius, F.F. et al. (1997)].

Σε αντίθεση με την στερόλη ισομεράσης της ζύμης, ο  $\sigma 1$  δεν παρουσιάζει δραστηριότητα της ισομεράσης της στερόλης [Hanner, M. et al. (1996), ] και δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα στην αλληλουχία του με οποιαδήποτε γνωστή πρωτεΐνη των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένης και της C8-C7 στερόλικής ισομεράσης των θηλαστικών- πρωτεΐνη σύνδεσης emoramil.(EBP). Παρά το γεγονός ότι η EBP είναι σε θέση να ανακτήσει την ικανότητα μετατροπής της D8-στερόλη σε D7-στερόλη, σε ERG2 ανεπάρκεια του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* [Silve, S. et al. (1996)],

ο σ 1 υποδοχέας δεν είναι σε θέση να διασωθεί του C8-C7 ισομερισμού [Hanner, M. et al. (1996)].

Αναλύσεις υδροθεραπείας έδειξαν ότι ο σ1 περιέχει 3 υδρόφοβες περιοχές (αμινοξέα 11-29, 91-109 και 176-194) και είναι τοπολογικά όμοιες με της ισομεράσης της στερόλης της ζύμης. Η TMBase ανάλυση ([http://www.ch.embnet.org/software/tmbase/TMBASE\\_doc.html](http://www.ch.embnet.org/software/tmbase/TMBASE_doc.html)) κατέδειξε ότι οι πρώτες δύο υδρόφοβες περιοχές (11-29 και 91-109), είναι διαμεμβρανικά-εκτεινόμενες έλικες με έναν βρόχο 50 αμινοξέων ανάμεσα και ένα 125 αμινοξέων C-άκρο [Aydar, E. et al. (2002)].

Στο ΕΔ των κυττάρων ωοθήκης χάμστερ (CHO), το τοπολογικό μοντέλο του σ1 επιβεβαιώνεται γενικά με δύο διαμεμβρανικά μοντέλα που προτάθηκαν αρχικά από τους Aydar et al.(2002) (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3** : Aydar et al.(2002)

Εκτός από την αλληλουχία αμινοξέων, οι δεσμευτικές περιοχές του σ1 έχουν εντοπιστεί. Η ταυτοποίηση της θέσης πρόσδεσης του σ1 έχει σημαντικά βοηθηθεί από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης του σ1 υποδοχέα [Ramachandran, S. et al. (2007)] και την χρήση της φωτοσυνάφειας [Chen, Y. et al. (2007), Guo, L.W. et al. (2005),

Pal, A. et al. (2008), Pal, A. et al. (2007)]. Το στεροειδές στην περιοχή δέσμευσης I (SBDLI), στην δεσμευτική περιοχή II (SBDLII) και οι N-τελικές περιοχές TM1 του  $\sigma_1$ , έχει αποδειχτεί ότι σχηματίζουν τουλάχιστον ένα μέρος της θέσης πρόσδεσης [Guo, L.W. et al. (2005), Pal, A. et al. (2008), Pal, A. et al. (2007), Fontanilla, D. et al. (2008)]. Όταν η χωροταξική θέση μεταξύ SBDLI και SBDLII εκτιμήθηκε, ανακαλύφθηκε ότι υπάρχει στενή αντιπαράθεση (μέσα στις  $8\text{ \AA}$ ), των SBDLI και SBDLII περιοχών [Pal, A. et al. (2008)]. Αυτό υποστηρίζεται από περαιτέρω μελέτες που έχουν αποδείξει ότι μια παραλλαγή ματίσματος του mRNA που στερείται το εξώνιο 3 (αμινοξέα 119 έως 149) των τεσσάρων εξωνίων του γονιδίου του  $\sigma_1$  υποδοχέα, δεν είναι σε θέση να δεσμεύσει την (+) - [3H] -pentazocine [Ganapathy, M.E. et al. (1999)] και ότι η περιοχή, από την δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή (SBD1) προς το C-άκρο, θα μπορούσε να είναι μέρος της θέσεως πρόσδεσης [Seth, P. et al. (2001)]. Επιλεγμένα υπολείμματα στην δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή, έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι σημαντικά για την δέσμευση του προσδέτη, με βάση μελέτες στις μεταλλάξεις [Yamamoto, H. et al. (1999)]. Επιπλέον, μεγάλο μέρος της έρευνας στον τομέα αυτό έχει αφιερωθεί στην σχέση δομής-δραστικότητας των προσδετών που δεσμεύονται στον  $\sigma_1$  [Tam, S.W. (1985), Tam, S.W. and Cook, L. (1984), Weber, E. et al. (1986), Tam, S.W. (1983), de Costa, B.R. et al. (1989)[A], de Costa, B.R. et al. (1989)[B], Ablordeppey, S.Y. et al. (2000), Glennon, R.A. et al. (1994)]. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν: τις βενζομορφάνες (SKF-10047, την πενταζοκίνη, την δεξτρομεθορφάνη), τα αντιψυχωσικά (Αλοπεριδόλη), αντικαταθλιπτικά (φλουβοξαμίνη), τα στεροειδή (Προγεστερόνη), τα αντιισταμινικά (χλωροφαιριραμίνη), τους προσδέτες του υποδοχέα της πυρηνικής ορμόνης (ταμοξιφένη), τους ανταγωνιστές διαύλων ασβεστίου (βεραπαμίλη, emoramil), τα αντιμυκητιασικά (Fenpropimorph, tridemorph), και τα ναρκωτικά φάρμακα όπως [μεθαμφεταμίνη, κοκαΐνη, διμεθυλοτροπταμίνη (DMT)]. Παρά την μεγάλη ποικιλία προσδετών που προσδέονται στο  $\sigma_1$ , μια μόνο βασική φαρμακοτρόπος ουσία έχει προσδιοριστεί [Fontanilla, D. et al. (2009), Glennon, R.A. (2005)], και η οποία συνεχίζει να παρέχει μια βάση για περαιτέρω ανάπτυξη φαρμάκων.

Ποιός από τους προσδέτες είναι αγωνιστής και ποιός ανταγωνιστής των  $\sigma_1$  υποδοχέων, έχει ενεργά απασχολήσει τους ερευνητές. Ο ακριβής μοριακός τύπος των αγωνιστών  $\sigma_1$  και των ανταγωνιστές παίζει ιδιαίτερο ρόλο. Οι BD1047 και BD1063 έχουν καθιερωθεί ως ανταγωνιστές των  $\sigma_1$ , εν μέρει, επειδή η δυστονία που παράγεται από τον υψηλής συνάφειας  $\sigma_1$  προσδέτη, δυοτολίλγουνιδίνη (DTG) και την αλοπεριδόλη [Matsumoto, R.R. et al. (1995)], είναι μειωμένη, όταν οι ενώσεις

χορηγήθηκαν στα ποντίκια. Σε παρόμοια πειράματα συμπεριφοράς σε ζώα έχουν χορηγηθεί αλοπεριδόλη και NE-100 ως ανταγωνιστές, και (+) - SKF-10047, (+) - πενταζοκίνη, μιπραμίνη, φλουοξετίνη και DTG ως αγωνιστές [Matsumoto, R.R. et al. (1995), Wang, Y. et al. (1987), Maurice, T. et al. (1994), Maurice, T. et al. (1998), Okuyama, S. et al. (1995)].

Ο σ1 υποδοχέας σχηματίζει ένα  $Ca^{+2}$  – ρυθμιστικό τριμερές σύμπλοκο πάνω στο ΕΔ μαζί με την ανκυρίνη Β και τον IP3 υποδοχέα σε NG-108 κύτταρα νευροβλαστώματος [Hayashi, T. and Su, T.P. (2001)]. Αγωνιστές, όπως (+) - πενταζοκίνη, (+) - SKF10047, PRE084, κοκαΐνη, προγεστερόνη και η θειική πρεγνενολόνη, διαχωρίζουν την ανκυρίνη Β (ANK 220) από τον υποδοχέα IP3, ενώ η NE-100 μπλοκάρει την αποσύνδεση του ANK200 από τον υποδοχέα IP3R-3 που προκαλείται από (+) – πενταζοκίνη και, ως εκ τούτου, λαμβάνεται ως ανταγωνιστής [Hayashi, T. and Su, T.P. (2001)].

Επί πλέον, με την ικανότητα των προσδετών να διαχωρίζουν τον σ1 και την ΒίΡ πρωτεΐνη συνοδό του ΕΔ γνωστή ως GRP78 [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)], ταξινομούνται ως αγωνιστές, η (+) - πενταζοκίνη, (+) - SKF10047, PRE084, φλουοξετίνη, κοκαΐνη, θειική πρεγνενολόνη και θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη, [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)]. Η NE-100, προγεστερόνη και η αλοπεριδόλη, ωστόσο, αναστέλλουν την ενεργοποίηση ή τον διαχωρισμό μεταξύ σ1 και ΒίΡ [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)] και, συνεπώς, ταξινομούνται ως ανταγωνιστές. Ο προσδιορισμός των N-αλκυλιωμένων τρυπταμίνων, όπως DMT, ως ενδογενείς αγωνιστές για τον σ1, με βάση την απώλεια του DMT αποκρίσεως του σ1, που προκαλούνται από υπερκινητικότητα σε ομοζυγότη null knockout (KO) ποντίκι, [Fontanilla, D. et al. (2009)] έχει επιπλέον προσθέσει στην γνώση της φαρμακολογίας άλλον έναν αγωνιστή του σ1 υποδοχέα.

## **A6. Lipid rafts και σ1 υποδοχείς**

Εκτός από τις φαρμακολογικές έρευνες που αναφέρονται, οι πρόσφατες κύτταρο-βιολογικές μελέτες έχουν ρίξει άπλετο φως στους σ1 υποδοχείς, ως παράδειγμα μιας απροσδόκητης σύνδεσης μεταξύ φαρμακολογίας και κυτταρικής βιολογίας. Ένα εντυπωσιακό εύρημα είναι ότι οι σ1 έχει αναφερθεί πως συνδέονται με μικροπεριοχές που περιέχουν λιπίδια, όπου ο υποδοχέας ρυθμίζει την δυναμική των λιπιδίων. Για παράδειγμα, οι σ1 υποδοχείς έχει βρεθεί ότι σε πλούσιους σε χοληστερίνη, αδιάλυτο-παραγόμενους lipid rafts του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), σε κύτταρα

νευροβλαστώματος NG-108, είναι σημαντικοί για την διαμερισματοποίηση του συντιθέμενου από λιπίδια ΕΔ [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003), Hayashi, T. and Su, T.P. (2003) ]. Σε μικρές περιοχές λιπιδίων του ΕΔ, ο σ1 εντοπίζεται με την caveolin-2, μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την χοληστερόλη.

Σε πρωτογενής καλλιέργειες ιπποκάμπου σε ποντίκια, οι σ1 δείχθηκε ότι σχηματίζουν γαλακτοκεραμιδικούς πλούσιους lipid rafts και πως προωθούν την διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων [Hayashi, T. and Su, T.P. (2004)]. Επιπλέον, ο ίδιος ο σ1 υποδοχέας, προτάθηκε ότι περιέχει περιοχές σύνδεσης με την χοληστερόλη στο C-τελικό του άκρο [Palmer, C.P. et al. (2007)].

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει επίσης ότι η D-ερυθρο-σφιγγοσίνη, η σφινγκανίνη, (αλλά όχι το sphingosine-1 φωσφορικό άλας) και τα κεραμιδικά, τα ενδογενή λιπίδια που σε διάφορες μορφές συνδέονται με lipid rafts, συνδέονται με τους σ1 υποδοχείς, με σχετικά υψηλού βαθμού συνάφεια [Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010), Ramachandran, S. et al. (2009)].

Επί πλέον, ανοσοιστοχημικές μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, έχουν αποκαλύψει ότι οι σ1 συχνά συγκεντρώνονται σε υπομεμβράνιες περιοχές του ΕΔ [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003)]. Τελευταία επίσης δείχθηκε ότι μια πλούσια σε σ1 υποδοχείς υποπεριοχή του ΕΔ είναι ταυτόσημη με την περιοχή επαφής ΕΔ/μιτοχονδρίου (MAM) [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)], η οποία αρχικά ανακαλύφθηκε ως υποσυνιστώσα του ΕΔ που αλληλεπιδρά φυσικά με την μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη [Rusinoi, A.E. et al. (1994)]. Επίσης, οι σ1 εντοπίστηκαν πρόσφατα σε συγκεκριμένες μικροπεριοχές λιπιδίων στο MAM, πλούσιες σε ceramide και χοληστερόλη. Το πιο ενδιαφέρον είναι ότι στο κύτταρο, ο βιολογικός εντοπισμός των σ1 υποδοχέων στο ΕΔ (ή στο MAM), επηρεάζεται από τους φαρμακολογικούς χειρισμούς στον υποδοχέα (βλέπε παρακάτω).

## **A.7 Μετάθεση του σ1 από την περιοχή επαφής ΕΔ/μιτοχονδρίου (MAM)**

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο σ1 μπορεί να μετακινηθεί στη μεμβράνη του ΕΔ υπό ιδιαίτερες συνθήκες, όπως με την χορήγηση κάποιας φαρμακολογικής θεραπείας ή κατά τη διάρκεια κυτταρικού στρες [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007), Mavlyutov, T.A. and Ruoho, A.E. (2007)]. Ο σ1 μπορεί συνεπώς να αναδιανεμήτε στις

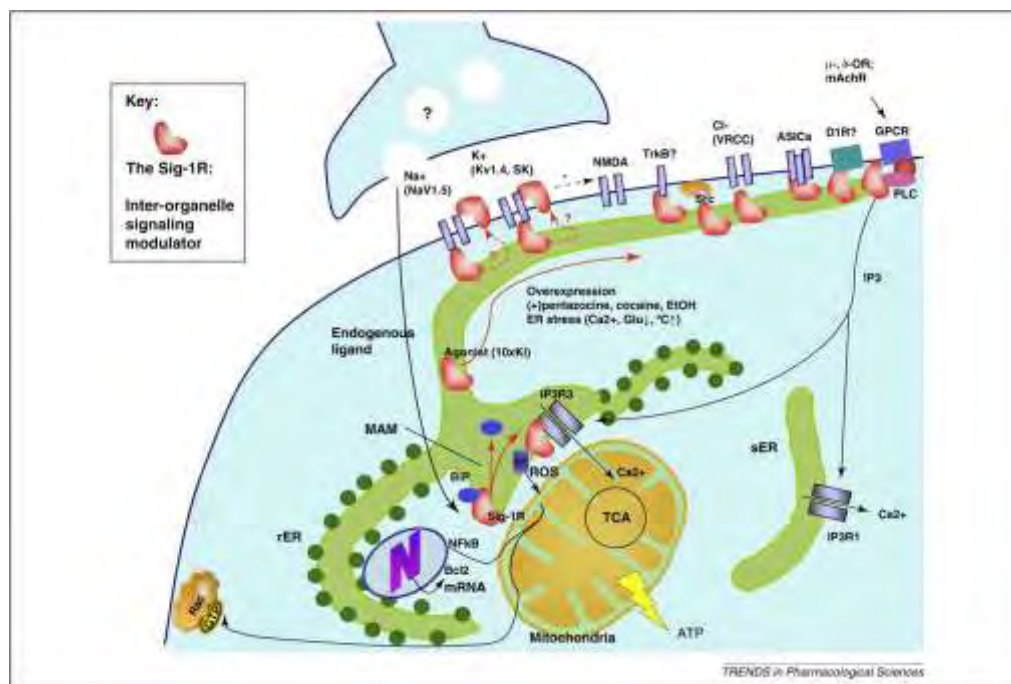


plasmalemmal (πλασμαλεμικές) δεξαμενές του ΕΔ και τις πυρηνικές εγκυστώσεις [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003), Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010), Mavlyutov, T.A. and Ruoho, A.E. (2007)].

Η Θεραπεία των NG-108 κυττάρων με την κοκαΐνη, για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει την μετατόπιση του σ1 από το ΕΔ καθώς και από τον πυρήνα με μια διαδικασία εκβλάστησης [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003), Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010)]. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι σ1 ανιχνεύθηκαν στον εξωκυττάριο χώρο σε κύτταρα NG-108 τα οποία είχαν προηγουμένως λάβει κοκαΐνη, γεγονός που υποδηλώνει ίσως μια συνοδό δράση του σ1 ακόμη και στον εξωκυττάριο χώρο [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003), Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010)]. Επιπλέον εκτός από την διέγερση με προσδέτες, στρεσογόνοι παράγοντες όπως, η στέρηση γλυκόζης ή εξάντληση των ΕΔ  $Ca^{+2}$  από θαψιγαργίνη [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)], προκαλούν επίσης μετατόπιση του σ1 από την ΜΑΜ. Η υπερέκφραση του σ1, αυξάνει επίσης την μετατόπιση του από την ΜΑΜ, στην περιοχή πλασμύλημμα (plasmalemmal) [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)]. Χρόνια χρήση αιθανόλης προκαλεί μια αναδιαμόρφωση (και ίσως μετατόπιση) των σ1 στον εγκέφαλο, σε ποντίκια [Meunier, J. et al. (2006)]. Πιο εντυπωσιακά, η (+) πενταζοκίνη, ένας αγωνιστής των σ1, προκαλεί μια μείωση των σ1 στα κλάσματα λιπιδικών σχεδιασμών, ενώ προκαλεί αύξηση τους σε κλάσματα λιπιδίων χωρίς σχεδιασμό [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003)]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η (+) πενταζοκίνη, εφαρμόζεται σε συγκέντρωση περίπου 10 φορές της  $K_i$ -value, η οποία κάνει κατά προσέγγιση 50% τους σ1 να διαχωριστούν από τον άλλο συνοδό του ΕΔ, την ΒiP, στην περιοχή ΜΑΜ, καθώς και να μετατοπίζονται από αυτήν (Εικόνα 4).

Αν και δεν είναι σαφές έως αυτήν την στιγμή το πώς ακριβώς πραγματοποιείται και ρυθμίζεται αυτή η μετατόπιση, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι οι μικροπεριοχές των λιπιδικών σχεδιασμών, θα μπορούσαν να διαδραματίζουν έναν ρόλο στην ρύθμιση της υποκυτταρικής κατανομή των σ1. Σε αντίθεση με το κύριο μέρος της μεμβράνης του ΕΔ, η ΜΑΜ, μπορεί να σχηματίσει ανθεκτικά παράγωγα μικροπεριοχών πλούσια με χοληστερόλη και κεραμικά (ceramides) [Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010)]. Τα διαλυόμενα σύμπλοκα των σ1 υποδοχέων, αποτελούν σπασμένα κλάσματα τύπου λιπιδικών σχεδιασμών και έχουν μια συνάφεια δέσμευσης με αυτά τα λιπίδια [Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010)]. Είναι σημαντικό ότι, μεταβάλλοντας τη σύνθεση των ανθεκτικών παράγωγων των μικροπεριοχών του ΕΔ και χαμηλώνοντας την σύνθεση της χοληστερόλης ή / και την αναστολή των

κεραμιδικών, μπορεί να προκληθεί μετατόπιση των  $\sigma 1$  από την MAM προς την ΕΔ δεξαμενή (cisternae) [Hayashi, T. and Fujimoto, M. (2010)]. Ένα βασικό ερώτημα, ανακύπτει όμως: γιατί οι  $\sigma 1$  μετατοπίζονται;



**Εικόνα 4:** Η συμμετοχή του  $\sigma 1$  υποδοχέα σαν συνοδευτικός ενδοοργανικός ρυθμιστικός σηματοδότης [Hayashi, T. and Su, T.P. (2003)]

#### **A8. Αλληλεπιδράσεις των $\sigma 1$ με λειτουργικές πρωτεΐνες στην μεμβράνη πλάσματος (plasma membrane)**

Εάν οι  $\sigma 1$  υποδοχείς ληφθούν ως συνοδοί που διορθώνουν τις λάθος τοποθετημένες πρωτεΐνες, είναι πιθανό η προκαλούμενη από τους προσδέτες ή το στρες μετατόπιση των  $\sigma 1$ , να μπορεί να αλλάζει τις πρωτεΐνες στόχους στο MAM, με τις άλλες στο πλασμίλημα, στις μεμβράνες πλάσματος (PM) ή στις πυρηνικές εγκυστώσεις. Πράγματι, μέσω ηχογράφησης με την βοήθεια σταθεροποιημένων αυτοκόλλητων επιθεμάτων σε βάτραχο, στα μελανότροπα κύτταρα της υπόφυσης, ανακαλύφθηκε ότι ο αγωνιστής των  $\sigma 1$  (+) – πενταζοκίνη, ανέστειλε την προς τα έξω μετακίνηση του καλίου και αυτή η επίδραση ήταν αναστρέψιμη με τον  $\sigma 1$  ανταγωνιστή NE-100 [Soriani, O. et al. (1999), Hayashi, T. and Su, T. (2005)]. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι η μεσολάβηση των  $\sigma 1$  στους κάλιο-τασεοελεγχόμενους διαύλους ιόντων, θα

μπορούσε να διαμορφώνεται από τους σ1 χωρίς την χρήση των πρωτεϊνών G ή της φωσφορυλίωσης [Aydar, E. et al. (2002), Wilke, R.A. et al. (1999)].

Εκτός από την άμεση φυσική αλληλεπίδραση και τη ρύθμιση των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου σε νευρικές απολήξεις στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης ποντικών [Aydar, E. et al. (2002)], οι σ1 υποδοχείς, έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν τα κανάλια ιόντων καλίου σε παρασκευάσματα ιπποκάμπου, ενδοκαρδιακούς νευρώνες και κύτταρα όγκου, σε ποντίκια [Kennedy, C. and Henderson, G. (1990), Monassier, L. et al. (2007), Zhang, H. and Cuevas, J. (2005)]. Οι σ1 προσδέτες έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν διάφορους τύπους διαύλων  $Ca^{2+}$  σε ποντίκια, σε προσυναπτικούς νευρώνες του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού [Zhang, H. and Cuevas, J. (2002), Hayashi, T. et al. (2000)]. Οι σ1 ρυθμίζουν τον N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ (NMDA) υποδοχέα των διαύλων ιόντων [Monnet, F.P. et al. (1990), Monnet, F.P. et al. (2003), Kume, T. et al. (2002), Hayashi, T. et al. (1995)] και έτσι επηρεάζουν, εν μέρει, την συναπτική πλαστικότητα μέσω μικρών αγωγίμων ασβέστιο-εξαρτώμενων διαύλων καλίου (κανάλια SK) [Martina, M. et al. (2007)].

Πρόσφατα επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι σ1 ρυθμίζουν τους καρδιακούς τασεοελεγχόμενους διαύλους νατρίου (HNav1.5) σε HEK293 και COS-7 κύτταρα, καθώς επίσης και σε καρδιακά μυοκύτταρα νεογνών σε ποντίκια [Langa, F. et al. (2003), Johannessen, M.A. et al. (2009)]. Επί πλέον, έχει δειχθεί ότι λόγω της φυσικής συνάφειας των σ1 με των οξύ-ανιχνεύσιμων καναλιών ιόντων (ASIC) 1α [Carnally, S.M. et al. (2010)], οι σ1 αποτελούν μέρος της ρύθμισης αυτών των καναλιών. Είναι πιθανό ότι η λειτουργία των σ1 ως συνοδός, να είναι στενά συνδεδεμένη με την λειτουργική ρύθμιση των καναλιών ιόντων παρέχοντας μια δυνατότητα διακίνησης του ικρίωματος στα κανάλια ιόντων [Su, T.P. et al. (2009)]. Η διακίνηση θα μπορούσε επίσης να ρυθμίζεται από ενδογενή μόρια όπως, DMT ή / και στεροειδή και η προγεστερόνη [Su, T.P. et al. (2009)].

Αν και ο σ1 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις G πρωτεΐνες άμεσα [Aydar, E. et al. (2002), Wilke, R.A. et al. (1999)], έχει πρόσφατα αναφερθεί [Kim, F.J. et al. (2009)] ότι υπάρχει μια λειτουργική και φυσική σύνδεση του με τους κλωνοποιημένους mu υποδοχείς των οπιοειδών, οι οποίοι είναι G-πρωτεΐνες συζευγμένων υποδοχέων (GPCRs). Αυτή η αλληλεπίδραση, η οποία εμφανίζεται μόνο μέσα από την με τον ανταγωνιστή-δεσμευμένη μορφή των σ1, μαζί με τον υποδοχέα των οπιοειδών mu, οδήγησε σε μια πολύ σημαντική λειτουργική μετατόπιση προς τα αριστερά, του αγωνιστή των mu (DAMGO) για την ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης, ένα

αποτέλεσμα συνεπές με την *in vivo* παρατήρηση, ότι ο ανταγωνιστής των  $\sigma 1$  ενισχύει την μορφίνο-επαγόμενη αναλγησία. Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε με την ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης σε μουσκαρινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, από  $\sigma 1$  υποδοχείς σε κυτταρικές μεμβράνες από εγκεφαλικό ιστό σε ποντίκια, υποδεικνύοντας έναν πιθανό καθολικό ρόλο για τους  $\sigma 1$  στην διαμόρφωση της λειτουργίας των GPCR αγωνιστών ή / και στην διακίνηση των GPCRs [Mavlyutov, T.A. et al. (2010)]. Έμμεσες αποδείξεις επίσης καταδεικνύουν πως η αύξηση των  $\sigma 1$  μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους υποδοχείς της ντοπαμίνης 1 (D1Rs) στον εγκεφαλικό ιστό ποντικών, μετά την χορήγηση μεθαμφεταμίνης [Hayashi, T. et al. (2010)].

Εκτός από τα κανάλια ιόντων και των υποδοχέων, κινάσες πάνω στην πλασματική μεμβράνη (PM), ρυθμίζονται επίσης από τους  $\sigma 1$ . Για παράδειγμα, η υπερέκφραση των  $\sigma 1$ , ενισχύει την σύζευξη μεταξύ του υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης B και της C φωσφολιπάσης, σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού [Yagasaki, Y. et al. (2006)]. Πρόσφατα ευρήματα [Yao, H. et al. (2010)] έδειξαν ότι η κοκαΐνη προκαλεί μετατόπιση των  $\sigma 1$  από το ΕΔ στην PM σε περιοχές λιπιδικών σχεδιασμών, με την ενεργοποίηση της Src κινάσης. Αποδείχθηκε ότι η ενεργοποίηση της Src οδήγησε στην παραγωγή των ROS και ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα μεταγραφής, οδηγώντας έτσι στην επαγωγή της χημειοκίνης (chemokine) MCP-1 στην μικρογλοία [Yao, H. et al. (2010)]. Η συνολική δράση των  $\sigma 1$  απεικονίζεται στην Εικόνα 4. Συνολικά, όλα αυτά τα στοιχεία δίνουν μια νέα διάσταση στην ρύθμιση των λειτουργικών πρωτεϊνών στην PM, και επιπλέον, εκτός από τα εξωτερικά ερεθίσματα, οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να ρυθμίζονται μέσω ενός φαινομενικά συντονισμένου τρόπου, από έναν κινητό ρυθμιστή σηματοδότησης μεταξύ των οργανιδίων του ΕΔ και τον  $\sigma 1$  υποδοχέα. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν οι  $\sigma 1$  αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες PM από απόσταση (δηλαδή από την περιοχή του πλασμαλήμματος ή εντός της PM δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

## **A9. Οι $\sigma 2$ υποδοχείς**

Οι  $\sigma 2$  υποδοχείς δεν έχουν ακόμη κλωνοποιηθεί και η ύπαρξη τους έχει επιβεβαιωθεί με την βοήθεια της φωτο-σήμανσης, και έχει βρεθεί ότι είναι μια 21,5 kDa πρωτεΐνη. Η ακριβής κατανομή των  $\sigma 2$  υποδοχέων δεν είναι πολύ σαφής. Αλλά έχουν εντοπιστεί τόσο στο ΚΝΣ όσο και σε ορισμένους ιστούς, όπως στο ήπαρ και στο γαστρεντερικό σύστημα. Είναι πλούσιοι σε σχεδιασμούς λιπιδίων, εκφράζονται υπερβολικά σε πολλαπλασιαστικά κύτταρα, και σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το

στάδιο ανάπτυξης του καρκίνου, το οποίο είναι συμπτωματικά σε συμφωνία με την PGRMC1, μια πολύ γνωστή και ευρέως κλωνοποιημένη πρωτεΐνη [Huang YS, et al. (2014)]. Κανένας ενδογενής προσδέτης και για τους δύο υποδοχείς δεν έχει ταυτοποιηθεί. Αν και κάποια νευροστεροειδή, όπως η progesterone, η τεστοστερόνη, και η pregnenolone, έχουν δείξει μια χαμηλή συνάφεια με τους σ1, δεν υπάρχει κανένα στοιχείο που να υποδεικνύει ότι αυτά τα νευροστεροειδή παίζουν κάποιο φυσιολογικό ρόλο, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τους υποδοχείς. Δεν είναι ακόμα σαφές τι ρόλο διαδραματίζουν οι σ υποδοχείς στην φυσιολογική κατάσταση. Ερευνητικά δεδομένα κατέδειξαν ότι ο σ1 υποδοχέας δεν είναι συζευγμένος με G πρωτεΐνες, δεν σχετίζεται με την υδρόλυση του ATP, αλλά μπορεί να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες των ιοντικών διαύλων. Ο σ1 υποδοχέας έχει αναγνωριστεί ως ένας νέος θεραπευτικός στόχος για την σχιζοφρένεια, την κατάθλιψη, τον εθισμό, και την ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ωστόσο, πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τον σ2 υποδοχέα, την λειτουργία του, και τους ρυθμιστικούς ρόλους τους [Huang YS, et al. (2014)].

#### **A10. Ταυτοποίηση του συμπλόκου πρωτεΐνης PGRmC1 ως την υποθετική θέση πρόσδεσης του σ2 υποδοχέα**

Αν και η δομή του σ2 υποδοχέα δεν είναι γνωστή, ο σ2 είναι ευρέως αποδεκτός σαν βιοδείκτης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων in vitro και in vivo, και ως στόχος για τη χημειοθεραπεία [Xu J, et al (2011)].

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι: η πυκνότητα των σ2 υποδοχέων σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα σε καρκίνο του μαστού, είναι περίπου δεκαπλάσια από ότι στα αδρανή κύτταρα, η έκφραση του σ2 αυξάνεται κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την ηρεμία στον πολλαπλασιασμό, και μειώνεται κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τον πολλαπλασιασμό στην αδράνεια [Xu J, et al(2011)].

Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο του σ2 υποδοχέα, ο ακριβής ρόλος του κατά των όγκων και του φυσιολογικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, παραμένει προς το παρόν άγνωστος [Xu J, et al(2011)].

Με την ανάπτυξη των σ2 εκλεκτικών προσδετών, συμπεριλαμβανομένου των [3H] RHM-1, [125I] RHM-4 και SW120, μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα, να εντοπιστεί και να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτής της πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία προσδετών του υποδοχέα και με τεχνικές μοριακής απεικόνισης [Xu J, et al(2011)].

Το συστατικό μεμβράνης του υποδοχέα της προγεστερόνης 1 (PGRMC1), υπερεκφράζεται σε μία ποικιλία όγκων, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά

κύτταρα, και ως εκ τούτου αποτελεί σημαντικό βιοδείκτη για την εξέλιξη του καρκίνου και έναν πιθανό στόχο για αντικαρκινική φαρμακοθεραπεία [Xu J, et al(2011)].

Η PGRMC1, η οποία υπάρχει σε φωσφορυλιωμένη και αποφωσφορυλιωμένη μορφή κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θέσης-πρόσδεσης του κυτοχρώματος b5 και άλλων πιθανών τέτοιων θέσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν τις INSIG-1, PAIR-BP1 και P450 πρωτεΐνες [Xu J, et al(2011)].

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η PGRMC1 είναι ένας βιοδείκτης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και ένας θεραπευτικός στόχος για την αναστολή της καρκινογένεσης [Ahmed, I. S. et al.(2010)]. Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι η PGRMC1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του ενδομητρίου στον άνθρωπο [Chen, J. I. et al.(2009)].

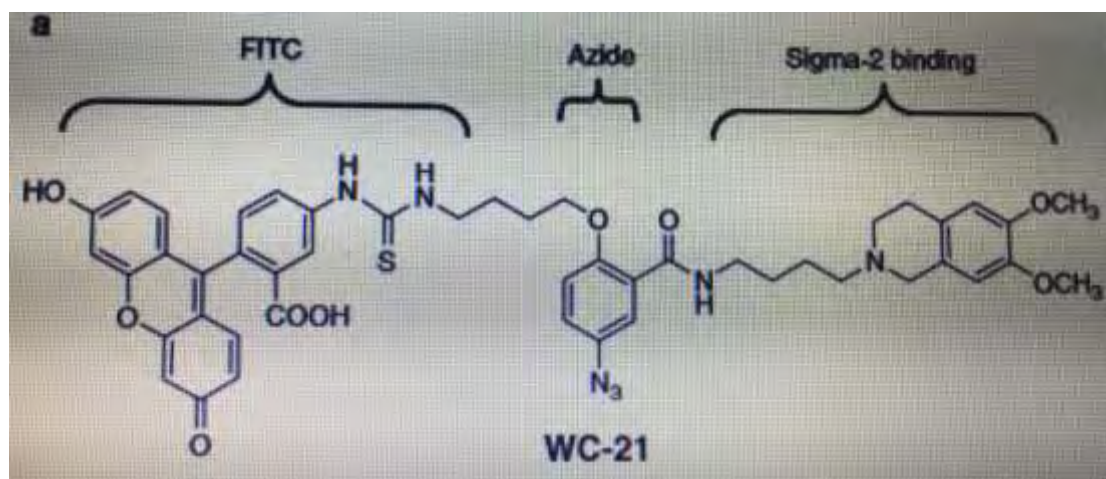
Η αναγνώριση του συμπλόκου πρωτεΐνης ή της πρωτεΐνης που περιέχει τη θέση σύνδεσης του προσδέτη του σ2 υποδοχέα, είναι το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό του ρόλου αυτού του υποδοχέα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και που καθορίζει ένα νέο στόχο για την ανάπτυξη νέων παραγόντων απεικόνισης όγκου και θεραπειών του καρκίνου. Εδώ περιγράφεται μία νέα στρατηγική που αναπτύχθηκε για την ταυτοποίηση του υποδοχέα σίγμα-2. Ο ανιχνευτής φωτοσυνάφειας του σ2, WC-21, είναι ένα ανάλογο της RHM-1, και περιέχει μία χαρακτηριστική ομάδα αζιδίου για την φωτοσυνάφειας tagging του σ2 υποδοχέα, καθώς και μια ισοθειοκυανική φθοροσκεΐνη ομάδα (FITC) για την απεικόνιση της πρωτεΐνης. Η WC-21 έχει χρησιμοποιηθεί για την άμεσα επισήμανση της θέσεως σύνδεσης του σ2 υποδοχέα σε ηπατικά ομογενοποιημένα μεμβρανών σε ποντίκια [Xu J, et al(2011)].

**A10.1. Επισήμανση φωτοσυνάφειας και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών:** Η WC21 έχει υψηλότερη συνάφεια δέσμευσης για τους σ2 υποδοχείς ( $K_i = 8,7 \text{ nM}$ ) και η σχετικά χαμηλή συνάφεια δέσμευσης για τους σ1 υποδοχείς ( $K_i > 4000 \text{ nM}$ ) (Εικόνα 5). Η WC-21 επώαστηκε σε ομογενοποιημένη μεμβράνη ήπατος σε ποντίκια, και το σύμπλοκο WC-21-πρωτεΐνη φωτοδιασυνδέθηκε (φωτο-crosslinked).

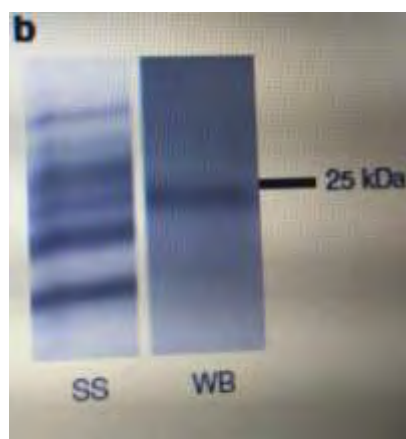
Η υπερκείμενη πρωτεΐνη εμπλουτίστηκε και διαχωρίστηκε σε γέλη ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 4b). Η Western blot ανάλυση απεκάλυψε μια δεσπόζουσα πρωτεϊνική ζώνη στα ~ 24 kDa που σημάνθηκε με PITO-συζευγμένο ανιχνευτή WC-21 (Εικόνα 6). Η σήμανση αυτής της πρωτεϊνικής μάντας με WC-21, θα μπορούσε να αποκλειστεί

από καλώς χαρακτηρισμένους προσδέτες των σ2. Από την Western blot ανάλυση της πρωτεϊνικής μπάντας WC-21-σεσημασμένης, τα προϊόντα λύσης που περιέχουν 35 μg πρωτεΐνης, έτρεξαν σε μια γέλη ακρυλαμιδίου 12% και μεταφέρθηκαν σε μία μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (Bio-Rad Laboratories).

Η θέση της επικρατούσας μπάντας του προσδέτη-σεσημασμένης πρωτεΐνης στη γέλη προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μια κοχλιάριας (horseradish) συζευγμένη με υπεροξειδάση αντι-FITC αντίσωμα κασίικας (Bioscience Resource Project) σε 1:1000 αραιώση. Η ανάλυση αποτυπώματος Western με μια υπεροξειδάση (HRP) αντισώματος αντι-FITC αποκάλυψε την επικρατούσα πρωτεϊνική ζώνη στα ~ 24 kDa που είχε σημειωθεί με WC-21 (Εικόνα 6). Η σεσημασμένη αυτή ζώνη πρωτεΐνης θα μπορούσε να μπλοκαρισθεί από σ2 προσδέτες, όπως τους DTG, αλοπεριδόλη και RHM-1. Το γονίδιο για PGRMC1 βρίσκεται στο q22-q24 του X chromosome<sup>23</sup> [Xu J, et al (2011)].



**Εικόνα 5:**[Xu J, et al (2011)].

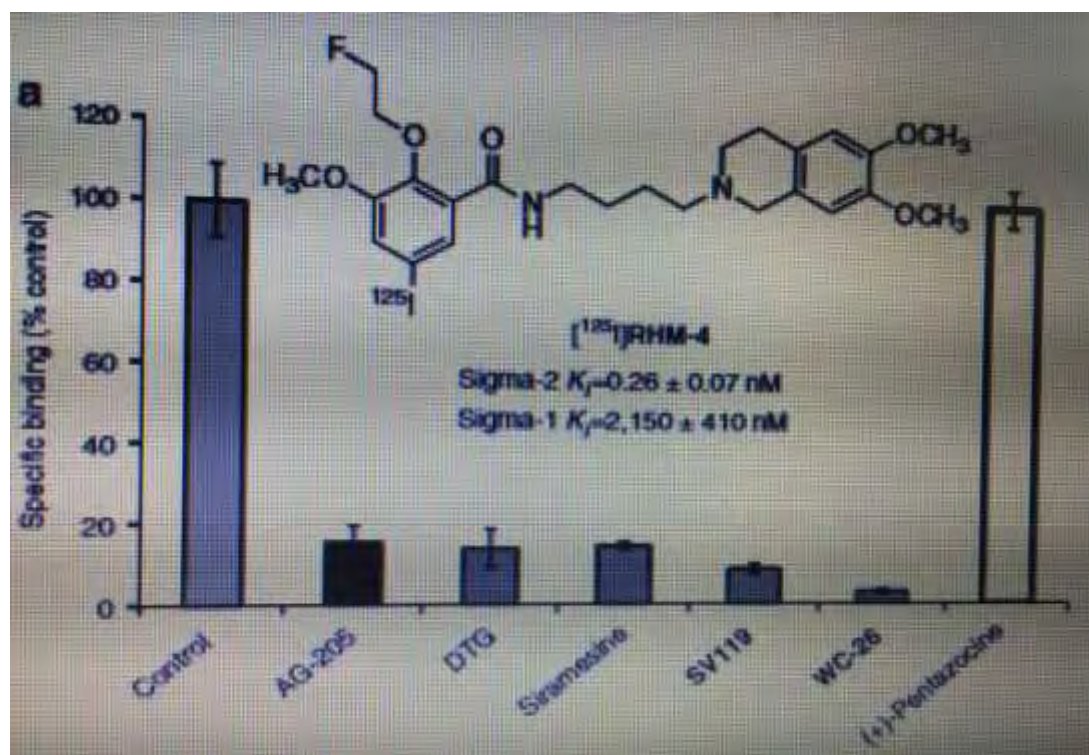


**Εικόνα 6:** [Xu J, et al( 2011)].

#### **A10.2. Το φαρμακολογικό προφίλ του [125I] RHM-4 σε κύτταρα HeLa:**

**κύτταρα HeLa:**Είναι τα πρώτα «αθάνατα» ανθρώπινα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια και παραμένουν ζωντανά εδώ και 60 χρόνια. Χάρη στα κύτταρα HeLa (σύντηξη από το Χενριέτα Λακς) βρέθηκε το εμβόλιο της πολιομυελίτιδας, επετεύχθη σημαντική πρόοδος ενάντια στον καρκίνο και τους ιούς, υπήρξε εξέλιξη στην τεχνητή γονιμοποίηση και τη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

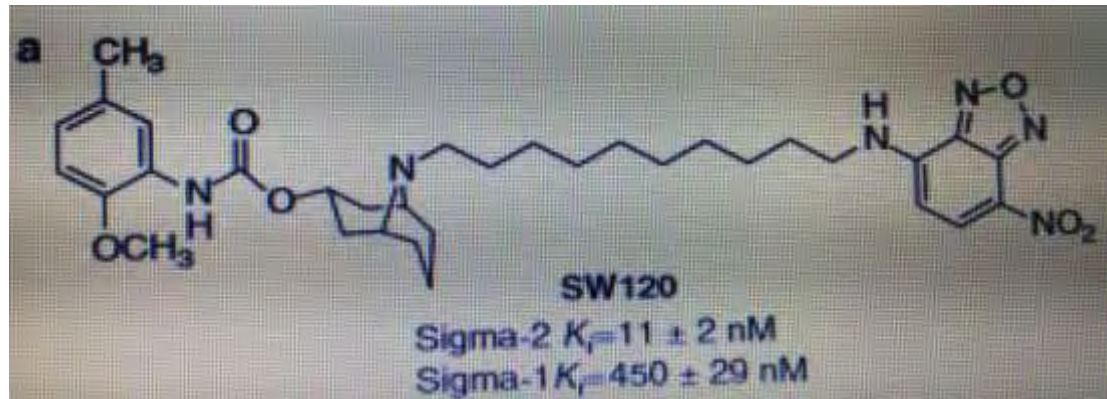
Η [125I] RHM-4 (Εικόνα 5a) είναι ένας χρήσιμος ραδιοσημασμένος προσδέτης για τη μέτρηση της πυκνότητας των  $\sigma_2$  υποδοχέων, σε όγκους και σε κανονικούς ιστούς. Η AG-205, αναφερόμενη PGRMC1 προσδέτης και τα γνωστά υποκατάστατα του  $\sigma_2$  υποδοχέα , DTG, siramesine, SV119 και WC-26, εύκολα εντοπίζονται με τον [125I] RHM-4 ραδιοσημασμένο προσδέτη, μέσα στα κύτταρα HeLa ομογενοποιημένων κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 7). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν επίσης σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, σε ποντίκια, σε ομογενοποιήματα της κυτταρικής μεμβράνης [Xu J, et al( 2011)].



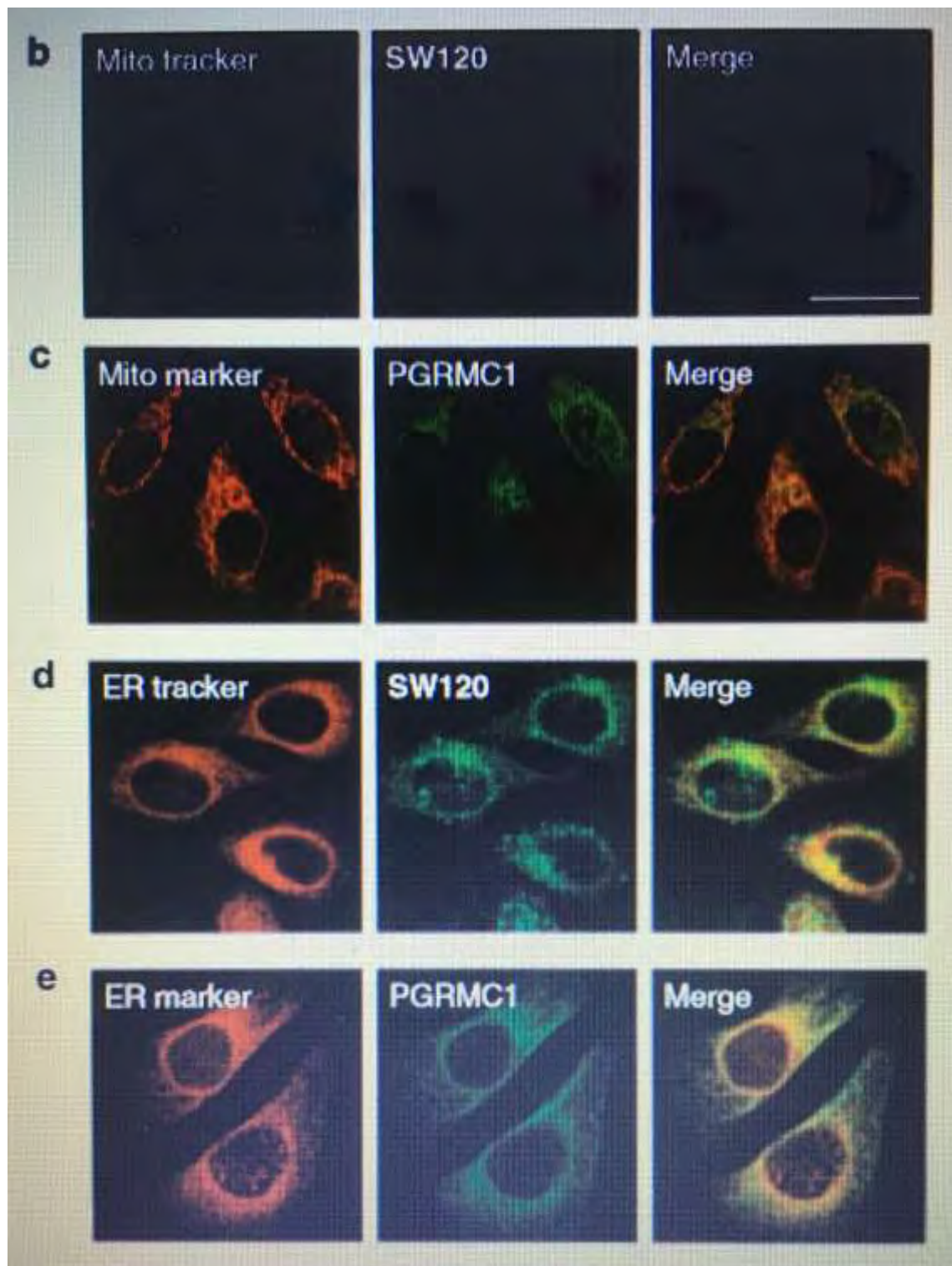
**Εικόνα 7:** [Xu J, et al( 2011)]



**A10.3. Η ενδοκυτταρική εντόπιση του PGRMC1 και  $\sigma 2$  υποδοχέα:** Η ενδοκυτταρική εντόπιση του PGRMC1 και του  $\sigma 2$  υποδοχέα έχει συγκριθεί με την χρήση συνεστιακής μικροσκοπήσεως. Οι πρωτεΐνες PGRMC1 γίνονταν ορατές με ένα αντίσωμα αντι-PGRMC1, ενώ οι  $\sigma 2$  υποδοχείς απεικονίζονταν χρησιμοποιώντας το φθορίζων ανιχνευτή, SW120 (Εικόνα 8). Τόσο ο ανιχνευτής του  $\sigma 2$  υποδοχέα (Εικόνα 9b,d) όσο και το αντι-PGRMC1 αντίσωμα (Εικόνα 9c,e) συνεντοπίστηκαν σε δείκτες των μιτοχονδρίων (Εικόνα 9b,c) και του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικόνα 9d,e).



**Εικόνα 8:** [Xu J, et al( 2011)]



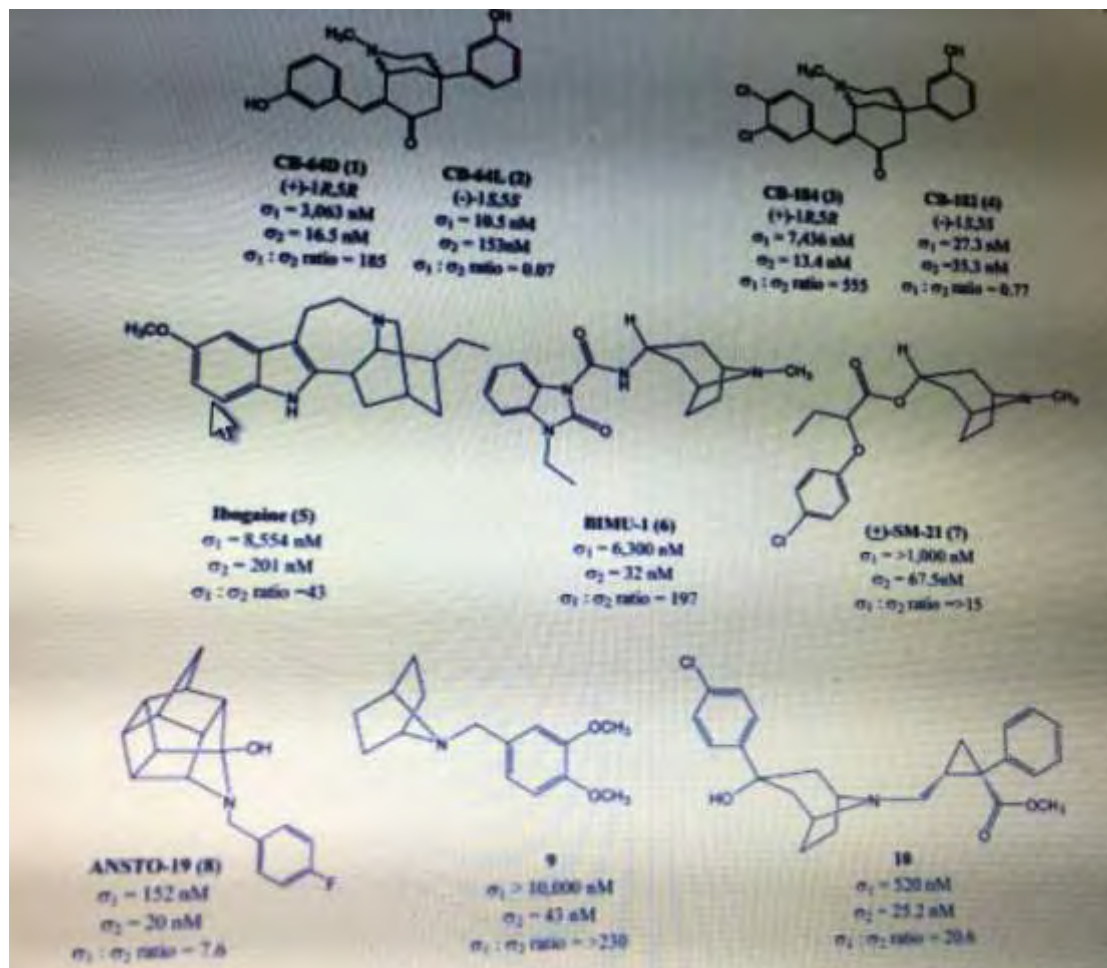
**Εικόνα 9:** [Xu J, et al( 2011)].

### **A11. Η ανάπτυξη των $\sigma 2$ υποδοχέων εκλεκτικών προσδετών**

Αν και πολλές διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων, έχει δειχθεί να προσδένονται με τους  $\sigma 1$  και  $\sigma 2$  υποδοχείς, οι περισσότερες από αυτές, δεσμεύονται εκλεκτικά με τον  $\sigma 1$  υποδοχέα ή έχουν παρόμοια συνάφεια τόσο με τους  $\sigma 1$  όσο και με τους  $\sigma 2$

υποδοχείς. Η ανάπτυξη προσδετών που έχουν υψηλή εκλεκτικότητα στους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων, υπήρξε πρόκληση, και σε ορισμένες περιπτώσεις, ο προσδιορισμός της εκλεκτικότητας στους  $\sigma_2$  υποδοχείς προσδέτη, αποτελούσε ένα απροσδόκητο γεγονός, που ερχόταν όταν προσδέτες σχεδιασμένοι για άλλες λειτουργίες υποβάλλονταν σε διαλογή για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι μιας ομάδας υποδοχέων του ΚΝΣ, και βρέθηκε ότι ήταν  $\sigma_2$  προσδέτες [Robert H. et al (2013)].

**A11.1. Διαμορφωτικοί περιορισμοί των αναλόγων αμίνης:** Η πρώτη τάξη των  $\sigma_2$  εκλεκτικοί προσδετών που αναφέρθηκε, ήταν εκείνης των αναλόγων της βενζομορφάνης-7-όνη που παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Αυτές οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν ως μέρος μιας σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) σε μια μελέτη για τη βελτίωση της συνάφειας του (-) - 2-μεθυλ-5-(3-υδροξυφαινυλ) morphan-7-όνη για τους  $\mu$  versus  $\kappa$  οπιοειδών υποδοχέων. Η ενσωμάτωση ενός (E) -βενζυλιδενο κατά το ήμισυ στη θέση 8 του συστήματος δακτυλίου με αυξημένη συνάφεια για τους  $\sigma$  υποδοχείς ,μαζί με το (+) - 1 R, 5R ισομερές CB-64D [Εικόνα 10 το (1)] που παρουσιάζει 185-φορές υψηλότερη εκλεκτικότητα για τους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων, ενώ το (-) - 1 S, 5R ισομερές CB-64L[Εικόνα 10 το (2)], έδειχνε μεγαλύτερη προτίμηση για τους  $\sigma_1$  σε σχέση με τους  $\sigma_2$  υποδοχείς (Εικόνα 10). Το αντίστοιχο 3,4dichloro ανάλογο, CB-184[Εικόνα 10 το (3)], είχε μια ακόμη υψηλότερη συνάφεια και εκλεκτικότητα για τους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων, ενώ το αντίστοιχο (+) - ισομερές, CB-182 [Εικόνα 10 το (4)], εμφάνιζε μια παρόμοια συνάφεια και για τους δύο υποδοχείς. In vitro μελέτες με το ισομερές (1), έχουν δείξει μια ενδοκυτταρική αύξηση στα επίπεδα των  $Ca^{2+}$  μέσω της απελευθέρωσης από δημιουργία θαψιγαργινικής-ευαισθησίας στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και ίσως αυτός ο  $\sigma_2$  προσδέτης να επάγει τον κυτταρικό θάνατο, μέσω μιας κασπάσης-ανεξάρτητης του αποπτωτικού μονοπατιού [Robert H. et al (2013)].



**Εικόνα 10:** [Robert H. et al (2013)].

Άλλοι διαμορφωτικοί περιορισμοί των αναλόγων της αμίνης, που δείχνουν μια υψηλότερη συνάφεια για τους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων είναι: 1) το παραισθησιογόνο, ιβογαΐνης [Εικόνα 10 το (5)], του οποίου οι νευροτοξικές επιδράσεις συνδέονται με την συνάφεια στους  $\sigma_2$ , με εκείνες του αλκαλοειδούς της ινδόλης, 2) το σύμπλοκο ανταγωνιστή 5HT<sub>3</sub> / 5-HT<sub>4</sub> αγωνιστή BIMU-1 της σεροτονίνης [Εικόνα 10 το (6)] 3) το ανάλογο του τροπανίου SM-21 [Εικόνα 10 το (7)] (ένας  $\sigma_2$  ανταγωνιστής), μια ένωση που βοηθά στην αποδέσμευση της ακετυλοχολίνης και έχει χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας στην θεραπεία του πόνου, 4) το ανάλογο του trishomocubane ANSTO-19 [Εικόνα 10 το (8)] και το 7-αζαδικυκλο [2.2.1] επτάνιο αναλόγου [Εικόνα 10 το (9)], τα οποία έχουν μέτρια συνάφεια με τους  $\sigma_2$  υποδοχείς, και 5) το ανάλογο του τροπανίου [Εικόνα 10 το (10)] το οποίο παρουσιάζει επίσης μέτρια συνάφεια για τους  $\sigma_2$  υποδοχείς, αλλά 20 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η  $\sigma_2$ -εκλεκτικότητα, έγκειται στην παρουσία του (-) - ισομερούς του τροπανικού αναλόγου, ενώ το (+) - εναντιομερές (trans μορφή), προσδένεται με

σχεδόν ίδιου βαθμού συνάφεια σε αμφοτέρους τους σ1 και σ2 υποδοχείς [Robert H. et al (2013)].

Η ένωση (**6**) έχει θεωρηθεί ως επικεφαλής ένωση σε μια σειρά μελετών SAR, που είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολλών υψηλής συνάφειας και εκλεκτικότητας σ2 προσδετών. Η ένωση (**6**) επίσης, είναι ιδανική για μελέτες SAR, διότι παρέχει μια ποικιλία περιοχών, όπου δομικές τροποποιήσεις μπορούν να βελτιστοποιήσουν την συνάφεια του σ2 υποδοχέα, και να μειώσουν αυτήν για την σεροτονίνη 5-HT3 και των υποδοχέων 5-HT4 [Robert H. et al (2013)].

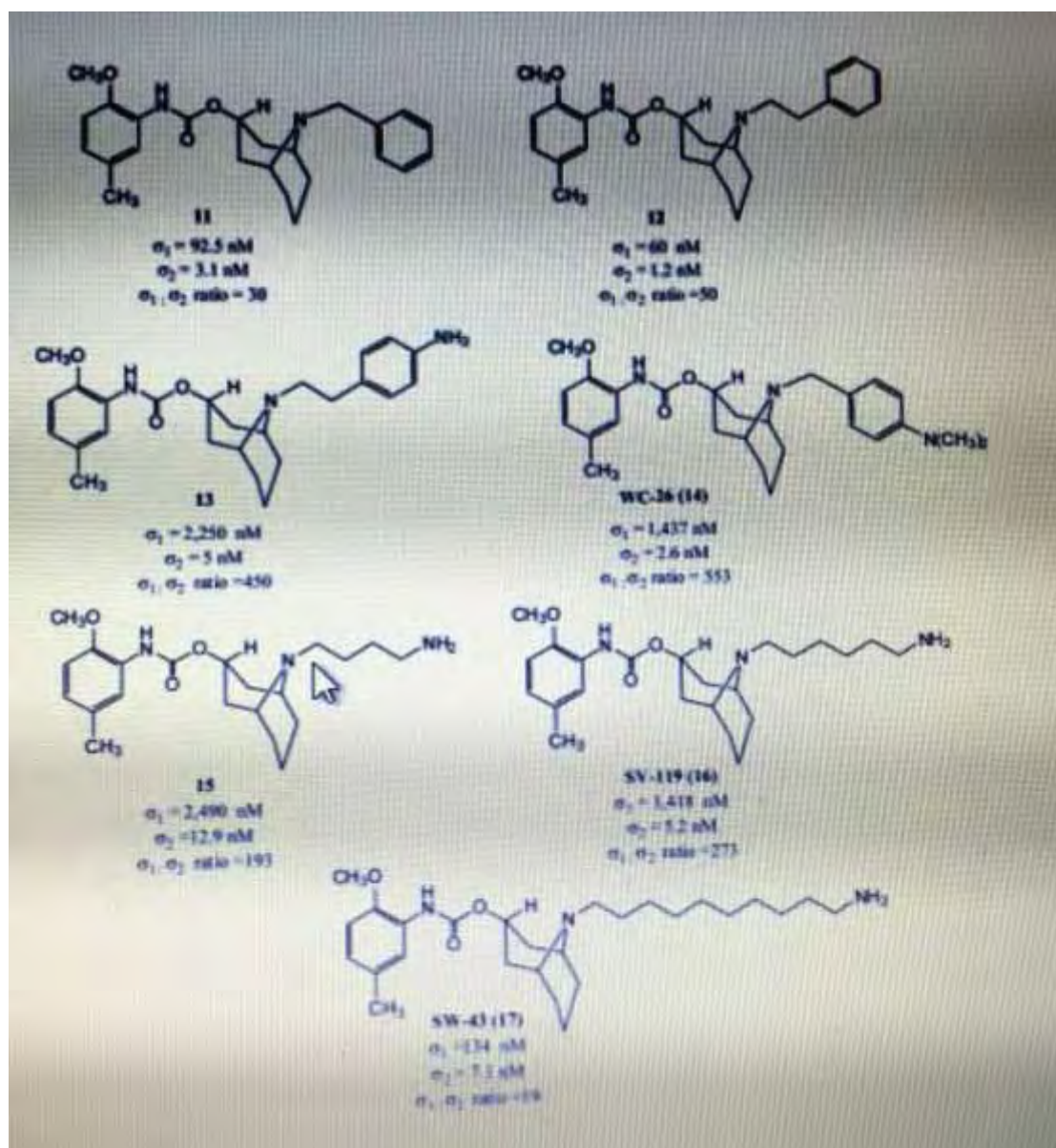
Η αντικατάσταση της ομάδας N-μεθυλ στο προγεφύρωμα αζώτου, με μία ομάδα βενζυλίου και αντικατάσταση του δεσμού της ουρίας στην ένωση (**6**) με ένα καρβουνικό δεσμό, οδηγεί σε δραματική αύξηση της συνάφειας, τόσο για τους σ2 όσο και για τους σ1 υποδοχείς, ενώ την απώλεια συνάφειας για τους υποδοχείς 5-HT3, αλλά και μέτριας για τους 5-HT4 υποδοχείς. Η επέκταση του 8-αζαδικυκλο [3.2.1] οκταν-3β-υλ συστήματος δακτυλίου (δηλαδή, η προσθήκη ενός δακτυλίου τροπανίου), προς την αντίστοιχη 9-αζαδικυκλο [3.3.1] εννεαν-3β-ικού συστήματος δακτυλίου (δηλαδή, προσθήκης δακτυλίου granatane), δεν μεταβάλλει την συνάφεια για τους σ1 και σ2 υποδοχείς, σε σχέση με τα ανάλογα του τροπανίου (tropane), αλλά η επέκταση του δακτυλίου εξαλείφει την συνάφεια για τον υποδοχέα 5-HT4 [Robert H. et al (2013)].

Το πιο ενδιαφέρον ανάλογο από αυτή την αρχική μελέτη SAR ήταν η ένωση (**11**) (Εικόνα 11), η οποία παρουσιάζει μια συνάφεια με τους σ2 υποδοχείς της τάξεως του ~ 3 nM και ένα λόγο σ1: σ2 εκλεκτικότητας των ~ 30 (Εικόνα 11). Η ένωση (**11**) έχει χρησιμοποιηθεί και ως δευτερεύουσα ένωση οδηγός σε μια σειρά μελετών που οδήγησαν στα granatane ανάλογα δεύτερης γενιάς, που δείχνουν βελτιωμένη συνάφεια στον σ2 υποδοχέα και υψηλή σ1: σ2 αναλογία επιλεκτικότητας [Robert H. et al (2013)].

Η αντικατάσταση της βενζυλομάδας από την (**11**) με ένα 2-φαιλαιθυλ ομάδα, δίνει την ένωση (**12**), που έχει μία ελαφρώς καλύτερη συνάφεια με τον σ2 υποδοχέα και σ1: σ2 αναλογία επιλεκτικότητας (~ 50) (Εικόνα 11). Με αντικατάσταση του παρά της θέσεως του βενζυλικού τμήματος της (**11**), με μία ομάδα διμεθυλαμινικού (ένωση **14**) και παρά την θέση της χαρακτηριστικής ομάδας 2-φαιλαιθυλ της (**12**), με μια αμινομάδα (ένωση **13**), προκύπτει μία περαιτέρω αύξηση της εκλεκτικότητας για

τους  $\sigma_2$  υποδοχείς, και σε μεγάλο βαθμό μειώνεται την συνάφεια για τους  $\sigma_1$  υποδοχείς [Robert H. et al (2013)].

Η αμινομάδα φαίνεται να είναι μία προτιμώμενη αντικαταστάτη για τη διασφάλιση μιας υψηλής συνάφειας για τους  $\sigma_2$  υποδοχείς και υψηλής  $\sigma_1$ :  $\sigma_2$  αναλογίας εκλεκτικότητας, με βάση τις *in vitro* ιδιότητες πρόσδεσης των αμινοαλκυλικών αναλόγων (**15**), SV-119 (**16**), και SW-43 (**17**). Τα WC-26 (**14**) και (**16**) παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, τόσο ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες όσο και ως μοντέλα καρκίνου του παγκρέατος *in vitro* και *in vivo* [Robert H. et al (2013)].



**Εικόνα 11:** [Robert H. et al (2013)].

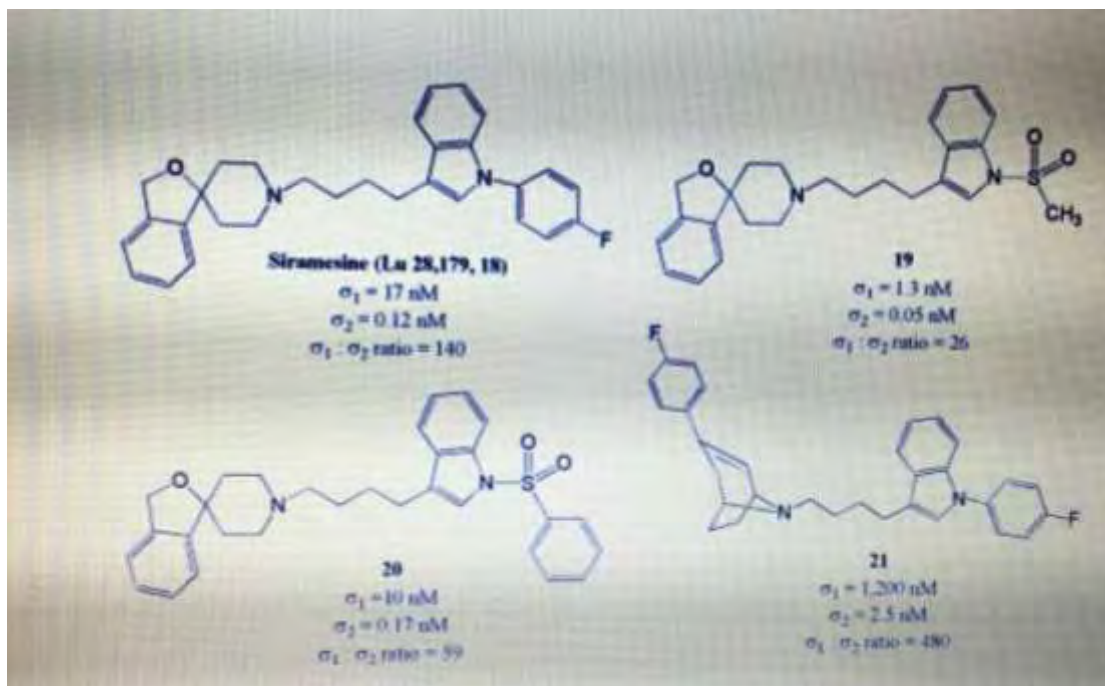
**A11.2. Τα ανάλογα του Siramesine:** Το Siramesine (γνωστό και ως Lu 28-179) (**18**) (Εικόνα 12), ένα 3- (ω-αμινοαλκυλ) -1 H-ινδόλη ανάλογο, είχε αρχικά σχεδιαστεί ως

ένας χαμηλής-αποτελεσματικότητας της σεροτονίνης 5-HT<sub>1A</sub> αγωνιστής, για τη θεραπεία της κατάθλιψης και τις διαταραχές στο άγχος. Μετέπειτα μελέτες αποκάλυψαν ότι έχει μια υποναογραμμομοριακή συνάφεια (IC<sub>50</sub>) για τους σ<sub>2</sub> υποδοχείς και μια 140-πλάσια εκλεκτικότητα για τους σ<sub>2</sub> έναντι των σ<sub>1</sub> υποδοχέων, που οδήγησε στην ανάπτυξη των αναλόγων (Εικόνα 12) [Robert H. et al (2013)].

Αντικατάσταση της ομάδας N-4-φθοροφαινυλ από την **(18)**, με μία ομάδα μεθανοσουλφονυλίου, δίνει την **(19)**, ενώ αυξάνει την συνάφεια του σ<sub>2</sub> υποδοχέα στο 50 pM. Ωστόσο αυτή η αλλαγή αυξάνει επίσης την συνάφεια του σ<sub>1</sub> υποδοχέα, έτσι ώστε η σ<sub>1</sub>: σ<sub>2</sub> αναλογία εκλεκτικότητας της **(19)** είναι μόνο 26 pM.

Η αντικατάσταση της ομάδας μεθανοσουλφονυλίου με μια ομάδα βενζολοσουλφονυλίου, δημιουργεί την **(20)**, η οποία παρουσιάζει μια μέτρια βελτίωση στην σ<sub>1</sub>: σ<sub>2</sub> αναλογία εκλεκτικότητας, ενώ διατηρεί την υποναογραμμομοριακή συνάφεια με τον σ<sub>2</sub> υποδοχέα. Είναι ενδιαφέρον ότι, η **(21)**, το τροπάνιο με βάση το ανάλογο της **(18)**, εμφανίζει την καλύτερη σ<sub>1</sub>: σ<sub>2</sub> αναλογία εκλεκτικότητας από αυτήν την σειρά ενώσεων, αν και το IC<sub>50</sub> για τους σ<sub>2</sub> είναι 2, 5 nM [Robert H. et al (2013)].

Παρά το γεγονός ότι η **(18)** εμφανίζει ισχυρή αγχολυτική δράση σε μοντέλα τρωκτικών, μετέπειτα κλινικές δοκιμές απέδειξαν ότι είναι αναποτελεσματική στην αντιμετώπιση του άγχους. Εγκαταλείφθηκε ως αγχολυτικό από την Δανική φαρμακευτική εταιρεία H. Lundbeck το 2002. Όπως περιγράφεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω, το ενδιαφέρον για την ένωση αυτή επανεμφανίστηκε τα τελευταία χρόνια, όταν καταδείχθηκε ότι η **(18)** μπορούσε να υποσχεθεί πολλά ως αντικαρκινικός παράγοντας, με την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου μέσω του μονοπατιού της λυσοσωμικής διαρροής [Robert H. et al (2013)].



**Εικόνα 12:** [Robert H. et al (2013)].

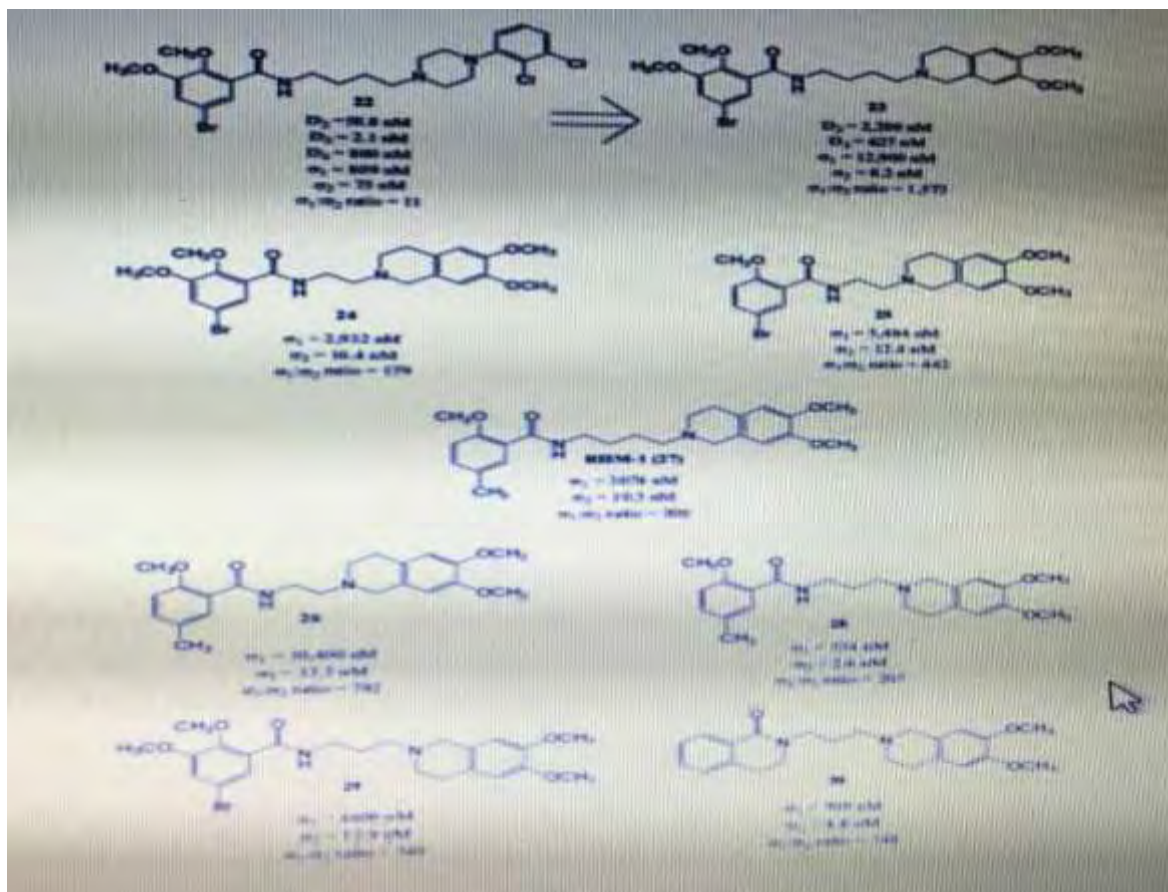
**A11.3. Διαμορφωτικά-εύκαμπτα αναλόγων της αμίνης:** Μια δεύτερη σειρά ενώσεων που έχουν υψηλή συνάφεια με τους  $\sigma_2$  υποδοχείς, είναι τα διαμορφωτικά-εύκαμπτα ανάλογα που παρουσιάζεται στην Εικόνα 13. Αυτές οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν αρχικά σε μελέτες σχέσης δομής-δραστηριότητας (SAR) που στόχευαν στην ανάπτυξη εκλεκτικών ανταγωνιστών της ντοπαμίνης D3 και μερικούς άλλους αγωνιστές, που αντιπροσωπεύονται από την **(22)** (Εικόνα 13). Η σχετικά υψηλή λιποφιλία της **(22)** ( $\log P = 5.76$ ), πιθανόν την καθιστά αδύναμη να διέλθει στον εγκέφαλο μέσα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, και να παρουσιάσει δραστηριότητα σε διάφορες μελέτες συμπεριφοράς. Προκειμένου να μειωθεί η λιποφιλικότητα της, ο δακτύλιος 4- (2,3dichlorophenyl) πιπεραζίνης, αντικαταστάθηκε με άλλες αρωματικές ομάδες αμίνης, οι οποίες μπόρεσαν να μειώσουν την συνολική  $\log P$  της ένωσης, χωρίς να μεταβληθεί η συνάφεια για τους υποδοχείς D3 της ντοπαμίνης. Αυτή η στρατηγική οδήγησε σε έναν αριθμό χρήσιμων προσδετών του υποδοχέα D3 της ντοπαμίνης [Robert H. et al (2013)].

Με την αντικατάσταση της μονάδος 4-φαινυλπιπεραζίνης, με έναν δακτύλιο 6,7dimethoxy-1,2,3,4-τετραϋδροϊσοκινολίνης, προκύπτει η ένωση **(23)**, η οποία έχει μια υψηλή συνάφεια και εξαιρετική εκλεκτικότητα στους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων, και μια δραματική μείωση της συνάφειας για τους υποδοχείς της ντοπαμίνης (Εικόνα 13).



Πρόσθετες μελέτες σχέσης δομής-δραστηκότητας (SAR) εντός αυτής της κατηγορίας ενώσεων, αποκάλυψε: 1) ότι η μείωση του εύρους των ομάδων των διαστημάτων που βρίσκονται μεταξύ του αζώτου του αμιδίου και των ατόμων του αζώτου στην 1,2,3,4-τετραϋδροϊσοκινολινικής γραμμής (tetrahydroisoquinol), κατά το ήμισυ - από 4 στους 2 άνθρακες (δηλαδή η ένωση **24**) και 2) η απομάκρυνση της 3-μεθοξυ ομάδας από τον βενζαμιδικό αρωματικό δακτύλιο (δηλαδή η ένωση **25**), δεν μετέβαλε την συνάφεια πρόσδεσης με τον σ2 υποδοχέα (Εικόνα 13) [Robert H. et al (2013)].

Η αντικατάσταση της ομάδας 5-βρωμο στην (**25**), από μία ομάδα μεθυλίου (ένωση **26**), δεν αλλάζει την συνάφεια για τον σ2 υποδοχέα, αλλά μειώνει την συνάφεια με τον σ1. Η προσθήκη 2 ατόμων άνθρακα στην (**26**), προς το αντίστοιχο 4-άνθρακικό διάστημα, δημιουργεί την RHM-1 (**27**), η οποία εξακολουθεί να διατηρεί την υψηλή συνάφεια για τους σ2 υποδοχείς. Τα ανάλογα με την προσθήκη 3-ανθράκων των ενώσεων (**27**) και (**23**) (όπου προκύπτουν οι ενώσεις **28** και **29**), έχει δειχθεί ότι έχουν υψηλή συνάφεια και εκλεκτικότητα για τους σ2 έναντι των σ1 υποδοχέων. Αντικατάσταση της ομάδας των αναλόγων του βενζαμιδίου, με την προσθήκη 3-ανθράκων, από έναν διαμορφωτικό περιορισμό 1,2,3,4-τετραϋδροϊσοκινολίνη-1-όνη, δίνει την ένωση (**30**), που επίσης έχει ως αποτέλεσμα μια υψηλή συνάφεια για τον σ2 υποδοχέα και καλή εκλεκτικότητα για τους σ2 έναντι των σ1 υποδοχέων [Robert H. et al (2013)].



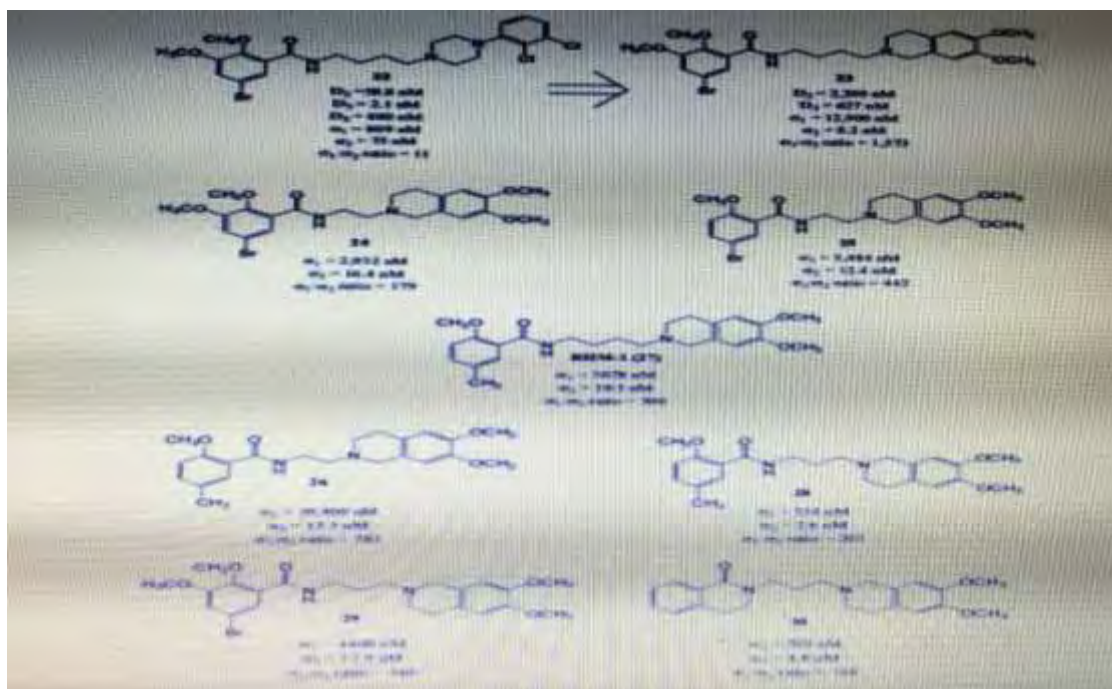
**Εικόνα 13:** [Robert H. et al (2013)].

Σε επόμενες μελέτες σχέσης δομής-δραστηκότητας (SAR), δείχθηκε η σημασία των 6,7-διμεθοξυ ομάδων, στο εναπομείναντα μισό τμήμα της 1,2,3,4 τετραυδροϊσοκινολινικής γραμμής, για τη διατήρηση της υψηλής συνάφειας με τους  $\sigma_2$  υποδοχείς. Απομάκρυνση αυτών των δύο μεθόξυ ομάδων ή αντικατάσταση με μεθυλένο-, αιθυλένο- και προπυλενοδιοξυκούς δακτυλίους ( ενώσεις **31-33**), είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συνάφειας και της εκλεκτικότητας για τους  $\sigma_2$  υποδοχείς (Εικόνα 14) [Robert H. et al (2013)].

Τέλος, προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητός ο χαρακτήρας της ομάδας 1,2,3,4 τετραυδροϊσοκινολινικής γραμμής, για την συνάφεια και την εκλεκτικότητα που υποδεικνύει για τους  $\sigma_2$  υποδοχείς, μελετήθηκε η τροποποίηση στο τμήμα της αμίνης αυτής της τάξης των ενώσεων. Ανοίγοντας τον δακτύλιο του τετραυδροϊσοκινολινυλίου στην (**23**), ελαττώθηκε σημαντικά η συνάφεια για τους  $\sigma_2$  έναντι των  $\sigma_1$  υποδοχέων, όπως φαίνεται στην ένωση (**34**). Η αλλαγή στην πλευρά που περιέχει τον δακτύλιο με την προστιθέμενη αμίνη στον αρωματικό δακτύλιο (6-μελής δακτύλιος), σε 5-μελή ή 7-μελή, προκαλεί μια δραματική μείωση στην συνάφεια και την εκλεκτικότητα για τους  $\sigma_2$  υποδοχείς. Μια εξαίρεση σε αυτό αποτελεί η ένωση (**35**), μια 5-μελής ουσία με όμοιο δακτύλιο με της (**23**), η οποία

παρουσιάζει υψηλή συνάφεια και εκλεκτικότητα με τους  $\sigma_2$  υποδοχείς. Τέλος, από το τρι-μεθόξυ βενζαμιδικό ανάλογο, του οποίου η 6,7-διμεθόξυ ομάδα του δακτυλίου της τετραϋδροϊσοκινολίνης αντικαταθίσταται από μία ομάδα 7-νιτρο, προκύπτει η ένωση (**36**), που βρέθηκε ότι έχει καλή εκλεκτικότητα, αλλά μέτρια συνάφεια με τους  $\sigma_2$  υποδοχείς [Robert H. et al (2013)].

Όπως συζητείται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω, τα διαμορφωτικά-εύκαμπτα των αναλόγων του βενζαμιδίου με ένα τμήμα της ομάδα 4-άνθρακα, έχουν αποδειχθεί ότι είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία  $\sigma_2$ -εκλεκτικών ενώσεων για την παρασκευή των ραδιοσημασμένων ανιχνευτών, για την απεικόνιση αυτού του υποδοχέα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. [Robert H. et al (2013)]



**Εικόνα 14:** [Robert H. et al (2013)].

## A12. ( $\pm$ )-PB28 (**37**) ανάλογο και άλλα πιπεραζινικά προερχόμενα ανάλογα

Το παράγωγο N-κυκλοεξυλιπεραζίνης, η ένωση (**37**), έχει αναφερθεί ότι είναι ένας ισχυρός προσδέτης με υπονανογραμμομοριακή συνάφεια για τον  $\sigma_2$  υποδοχέα, αλλά επίσης και υψηλή συνάφεια για τους  $\sigma_1$  υποδοχείς και  $\sigma_1: \sigma_2 < 1$  αναλογία επιλεκτικότητας (Εικόνα 15). Η χρησιμότητα της (**37**) είναι επίσης περιορισμένη λόγω της σχετικά υψηλής λιποφιλικότητας ( $\log D_{7.4} = 3,99$ ). Ως εκ τούτου, ένας αριθμός μελετών σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR), έχουν γίνει με στόχο την ταυτοποίηση ενός αναλόγου που να έχει μια υψηλή συνάφεια και βελτιωμένη

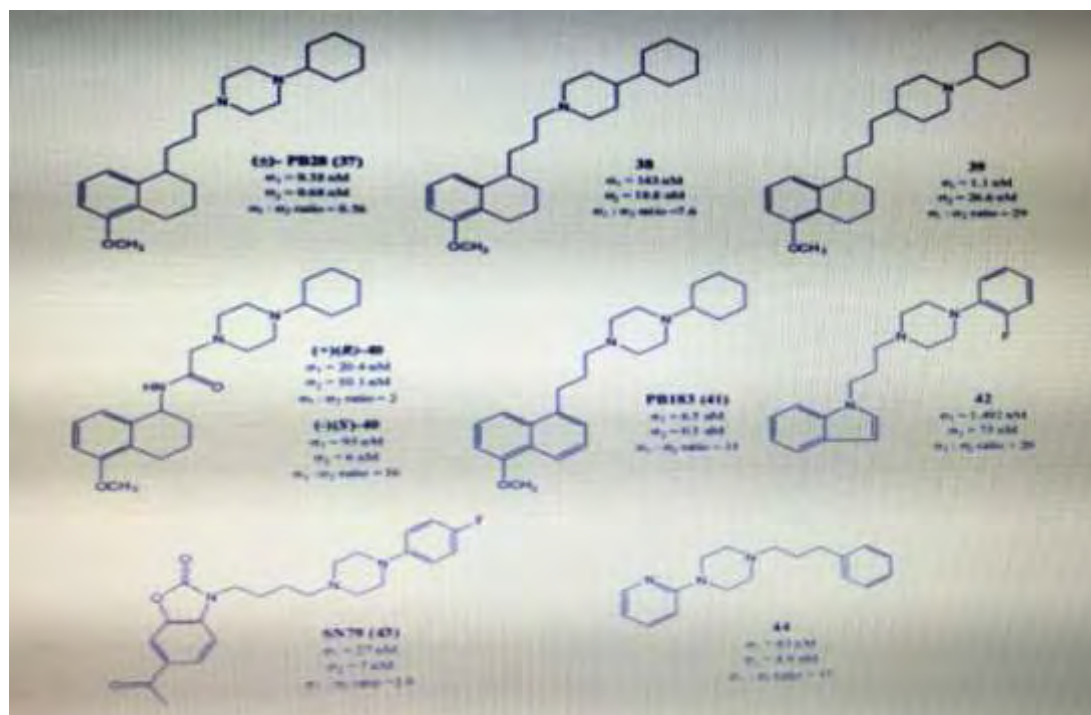
εκλεκτικότητα για τους σ2 έναντι των σ1 υποδοχέων και της (37), καθώς και λιποφιλικότητας που να βοηθά τις in vivo μελέτες.

Αντικατάσταση του 4-αζώτου με μία ομάδα μεθανίου (δηλαδή, την ένωση 38), είχε ως αποτέλεσμα μια ένωση με μέτρια συνάφεια και εκλεκτικότητα για σ2 έναντι των σ1 υποδοχέων (Εικόνα 16), ενώ η αντικατάσταση της 1-άζωτο στην (37), από μια ομάδα μεθανίου, κατέληξε στην παρασκευή ενός ισχυρού σ1 προσδέτη (την ένωση 39)- Εικόνα 15. Η αντικατάσταση της ομάδας του τμήματος του προπυλίου στην (37), με έναν δεσμό αμιδίου (ένωση 40), οδήγησε σε εναντιομερή (cis & trans), τα οποία ήταν εκλεκτικά για τους σ2 έναντι των σ1 υποδοχέων, με το (-) - (S) -40 να έχει μια υψηλότερη συνάφεια και εκλεκτικότητα για τους σ2 υποδοχείς σε σχέση με το άλλο (+) - (R) -ισομερές. Αυτή η παρατήρηση ήταν σε πλήρη αντίθεση με τις in vitro συνάφειες πρόσδεσης για τους σ1 και σ2 υποδοχείς, των οπτικών ισομερών της (37). Δηλαδή, το ισομερές (37) (-) - (R) - ήταν ισοδύναμης ισχύος για τους σ1 και σ2 υποδοχείς, ενώ το αντίστοιχο S-ισομερές είχε 10-πλάσια υψηλότερη συνάφεια για τους σ1 έναντι των σ2 υποδοχέων.

Τέλος, η PB183 (ένωση 41), το ναφθυλικό ανάλογο της (37), εμφανίζει μια υποναογραμμομοριακή συνάφεια για τους σ2 υποδοχείς και 13 φορές υψηλότερη εκλεκτικότητα για τους σ2 έναντι των σ1. Ωστόσο, το υψηλό log P αυτής της ένωσης (cLogP = 4,77) και η παρατήρηση ότι αποτελεί ένα υπόστρωμα για την P γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), δείχνουν ότι η χρησιμότητά της (41), μπορεί να περιορίζεται στην απεικόνιση όγκων και χημειοθεραπευτικών εφαρμογών. Συμπληρωματικές μελέτες σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR), έχουν επίσης πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό ενός κατάλληλου σ2 εκλεκτικού προσδέτη με βάση την (37) και τα άλλα παράγωγά της. Μια ανασκόπηση των μελετών σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) για την (37) πρόσφατα δημοσιεύθηκε [Berardi F, et al (2009)].

Ο ανταγωνιστής της κοκαΐνης SN79 (6-ακετυλο-3- (4- (4- (4-φθοροφαινυλ) πιπεραζιν-1-υλ) βουτυλο) βενζο [d] οξαζολ-2 (3H) -όνη), (ένωση 43), αρχικά είχε αναφερθεί ότι είναι ένας εξαιρετικά εκλεκτικός σ2 έναντι των σ1 προσδέτης. Ωστόσο, μια in vitro αντιγραφή των προσδιορισμών πρόσδεσης, αποκάλυψε ότι αυτή η ένωση είχε μια πολύ υψηλότερη συνάφεια για τους σ1 από ότι αρχικά είχε μετρηθεί, και η σ1: σ2 αναλογία εκλεκτικότητας της (43) είναι μέτρια στην καλύτερη περίπτωση. Το N-2-πυριδινό ανάλογο (η ένωση 44), αναφέρθηκε πρόσφατα ότι έχει μια καλή συνάφεια για τους σ2 και λογική σ1: σ2 αναλογία εκλεκτικότητας [Stavitskaya L, et al (2010)]. Αυτή η ένωση αντιπροσωπεύει μια ενδιαφέρουσα νέα ένωση του

μολύβδου και θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός εξαιρετικά εκλεκτικού N-φαινυλ πιπεραζινικού αναλόγου, που θα έχει μια υψηλότερη λιπόφιλη αποδοτικότητα, όπως και άλλων εκπρόσωπων που απεικονίζονται στην Εικόνα 15 [Robert H. et al (2013)].



**Εικόνα 15:** [Robert H. et al (2013)].

## **B. Σκοπός**

Με την έναρξη του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η συγκέντρωση των  $\sigma_1$  και των  $\sigma_2$  αυξάνεται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως πνεύμονα/ ορθοκολικού/ μαστού/ παγκρέατος, ενώ οι προσδέτες τους αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και οδηγούν σε απόπτωση πιθανά μέσω των κασπασών. Αντίθετα σε φυσιολογικά και αδρανή κύτταρα δεν παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής τους.

Ο συνδυασμός τους με τα ήδη υπάρχοντα αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να αυξήσει τη δράση των δεύτερων. Οι  $\sigma_2$  προσδέτες ήδη χρησιμοποιούνται σε απεικονιστικές μεθόδους για διάγνωση.

Σκοπός λοιπόν αυτού του μεταπτυχιακού, είναι με την βοήθεια της βιβλιογραφίας, να συγκεντρωθούν προσεκτικά όλα τα μέχρι στιγμής στοιχεία, που αφορούν την μορφολογία, την θέση τους μέσα στο κύτταρο και την λειτουργία των  $\sigma$  υποδοχέων. Να περιγραφούν τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια, η δράση τους στους φυσιολογικούς αλλά και τους καρκινικούς ιστούς, καθώς και να γίνει μια καλύτερη ταξινόμηση των  $\sigma$  προσδετών και της συνάφειάς τους, μιας και οι τελευταίοι αποτελούν πιο καλά τεκμηριωμένες μοριακές δομές.

Η μελέτη λοιπόν της δυνητικής χρήσης των εκλεκτικών προσδετών των  $\sigma_1$  και  $\sigma_2$  υποδοχέων (επειδή τα μοριακά χαρακτηριστικά των ίδιων των  $\sigma$  υποδοχέων και ειδικότερα των  $\sigma_2$ , δεν είναι πλήρως σαφή) ως αντικαρκινικοί παράγοντες, αλλά και η μεγάλη χρησιμότητα τους στην απεικόνιση των όγκων, αποτελεί μέχρι και σήμερα αντικείμενο μελέτης σε πάρα πολλές έρευνες.

## Γ.Ειδικό Μέρος

### Γ1. σ υποδοχείς

**Γ1.1. Επιδράσεις των σ ουσιών/φαρμάκων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο και τον κυτταρικό θάνατο:** Αρκετές μελέτες έχουν δοκιμάσει την πιθανή αποτελεσματικότητα των σ φάρμακων επί του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Οι Brent PJ και Pang G (1995), μελέτησαν τις επιδράσεις των διαφόρων σ φάρμακων (π.χ., αλοπεριδόλη, DTG,SKF 10047, πενταζοκίνη, και ριμκαζόλη) στην ανάπτυξη *in vitro*, σε αδενοκαρκίνωμα του μαστού στον άνθρωπο, σε καρκίνο του παχέος εντέρου, και στο μελάνωμα, λεπτομερώς. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστάληκε, και παρατηρήθηκε μια κυτταρική αποστασιοποίηση και στρογγυλοποίηση μετά τον κυτταρικό θάνατο με το οπτικό μικροσκόπιο. Από τα φάρμακα που δοκιμάστηκαν, η σ1- και σ2-μη ειδική ριμκαζόλη, και η *μειωμένη αλοπεριδόλη*, η οποία είναι ο κύριος μεταβολίτης της αλοπεριδόλης στον άνθρωπο, είναι οι πιο ισχυροί αναστολείς του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [Brent PJ και Pang G (1995)]. Παρόμοιες ανασταλτικές επιδράσεις των σ φάρμακων [π.χ., του N- [2- (πιπεριδινό) αιθυλο] -2-ιωδοβενζαμίδιο(2-AEΣ), της αλοπεριδόλη, και του 2-πιπεριδινυλο (αμινοαιθυλο) -4-ιωδοβενζαμίδης (IPAB)], έχουν παρατηρηθεί στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε NCI-H209 και NOI-N417 κύτταρα. Είναι σημαντικό, ότι η IPAB ή 2-AEΣ αναστέλλει επίσης σε *in vivo* ξενομόσχευμα (xenograft), τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων NCI-N417 [Moody TW, et al (2000)].

Η κατανόηση του μηχανισμού (ων) στον οποίο βασίζεται η ανασταλτική επίδραση των σ φάρμακων για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων είναι σημαντική. Η μορφολογική επίδραση της κατεργασίας κυττάρων γλοιώματος C6, με διάφορα σ φάρμακα (γενικά σ1- και σ2-μη ειδικά) έχει ερευνηθεί [Vilner BJ, et al (1995)]. Αυτά τα φάρμακα προκαλούν απώλεια των κυτταρικών διεργασιών, της υπόθεσης του σφαιρικού σχήματος, και την διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης? Φυσικά ο χρόνος και το μέγεθος αυτών των επιδράσεων εξαρτώνται από την συγκέντρωση των διαφόρων σ φαρμάκων που χρησιμοποιούνται. Η συνεχής έκθεση σε σ φάρμακα για 3-24 ώρες, οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, αν και οι μορφολογικές επιδράσεις είναι αναστρέψιμες εάν το φάρμακο απομακρυνθεί αμέσως μετά τη στρογγυλοποίηση [Vilner BJ, et al (1995)]. Η *μειωμένη αλοπεριδόλη* επίσης αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών γραμμών σε WIDr του εντέρου και

MCF-7αδενοκαρκινώματος του μαστού. Σε αυτά τα κύτταρα, τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  αυξήθηκαν, και παρατηρήθηκε απόπτωση [Brent PJ, et al (1996)], αν και μια άμεση σύνδεση μεταξύ τους δεν παρατηρήθηκε. Οι Crawford KW και Bowen WD (2002), κατέδειξαν επίσης την ικανότητα των  $\sigma 2$  φαρμάκων να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο σε κυτταρικές σειρές MCF-7, MCF-7 / ADR<sup>r</sup>, T47D, και SKBR3, στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο. Και τα δύο  $\sigma 2$  υποτύπου-ειδικά και  $\sigma 2$  μη εκλεκτικά φάρμακα, οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο με έναν μηχανισμό που εμπλέκεται η απόπτωση. Προτάθηκε να ληφθούν σαν μια νέα p53- και κασπάσης-ανεξάρτητης αποπτωτικής παθολογικής οδού. Οι επιδράσεις των  $\sigma$  φαρμάκων στην ανάπτυξη των κυττάρων και την απόπτωση, έχει προταθεί ότι γίνεται μέσω της οδού των σφιγγολιπιδίων. Κατά συνέπεια, τα  $\sigma 2$  φάρμακα έχουν χορηγηθεί σε MCF-7 / ADR<sup>r</sup> και T47D κύτταρα από όγκο του στήθους που προκαλείται από δοσοεξαρτώμενες αυξήσεις σε κεραμίδιο, με ταυτόχρονη μείωση σε σφιγγομυελίνη [Crawford KW, et al (2002)].

**Γ1.2. Πιθανοί μηχανισμοί Μεταγωγής σήματος των  $\sigma$  υποδοχέων και Συνάφεια με την κυτταρική βιολογία του Καρκίνου:** Αν και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την εμπλοκή των  $\sigma$  υποδοχέων στη βιολογία του καρκινικού κυττάρου, ο μηχανισμός (-οί) μέσω των οποίων γίνονται αυτές οι επιδράσεις δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί. Οι  $\sigma$  υποδοχείς εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, και η διατύπωση μιας ενοποιημένης υπόθεσης για την μοριακή φυσιολογία τους, όπου θα περιλαμβάνει όλες τις ποικίλες λειτουργίες τους, είναι μια μεγάλη πρόκληση.

Ελάχιστες αναφορές υπάρχουν που ασχολούνται άμεσα με τον τρόπο δράσης των  $\sigma$  υποδοχέων. Η ομοιότητα μεταξύ των  $\sigma 1$  υποδοχέων και την ισομεράση της στερόλης (ERG2) του ζυμομύκητα είναι ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι και οι δύο έχουν υψηλή συνάφεια για τους  $\sigma 1$  προσδέτες.

Ωστόσο, για τους  $\sigma 1$  δεν έχει ποτέ αποδειχθεί ότι διαθέτουν την δράση της ισομεράσης της στερόλης. Από την άλλη πλευρά, η emopamil-δεσμευόμενη πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύει επίσης τους  $\sigma 1$  προσδέτες, βρέθηκε να συμπληρώνει ένα στέλεχος ζύμης που περιέχει μία απαλοιφή του γονιδίου ERG2 και είναι μια ισομεράση της στερόλης όπως η ERG2 [Jbilo O, et al (1997)].

**Γ1.3. Διαμόρφωση από τα ιοντικά κανάλια:** Μελέτες για την διαμόρφωση των ιοντικών καναλιών των  $\sigma 1$  υποδοχέων έχουν σημειώσει πρόοδο σε συνάρτηση με την φύση του μηχανισμού μεταγωγής σήματος [Palmer CP, et al 20004)].



Έχει προταθεί, παρά την έλλειψη κοινής ομολογίας μεταξύ των σ1 υποδοχέων και των κλασικών G-πρωτεϊνικών υποδοχέων, ότι οι σ1 υποδοχείς χρησιμοποιούν τις G-πρωτεΐνες [ Soriani O, et al (1998)]. Κατά συνέπεια, οι σ1 υποδοχείς θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν λειτουργικά με τις G-πρωτεΐνες, μέσω ενός μηχανισμού που διαφέρει από εκείνον των κλασικών υποδοχέων τις G-πρωτεΐνης [Palmer CP, et al 2004)].

Ωστόσο, τα περισσότερα πειράματα δείχνουν ότι η μεταγωγή σήματος των σ1 δεν εμπλέκει και κάθε G-πρωτεΐνη. Οι Morio Y et al. (1994) έδειξαν ότι η αναστολή των ιοντικών καναλιών καλίου, από ένα σ φάρμακο/ουσία, σε NCB-20 κύτταρα, δεν επηρεάζεται από την προεπεξεργασία με A23187 φορσκολίνο-φορβόλης-12,13-διβουτυρική τοξίνη της χολέρας ή την τοξίνη του κοκκύτη. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τη γνωστά ενδοκυτταρικά δευτεροβάθμια αγγελιοφόρα συστήματα, όπου δεν είναι απαραίτητη η συμμετοχή των σ1 για τη ρύθμιση της τασεοελεγχόμενων ιοντικών καναλιών καλίου.

Σε συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς νευρώνες σε ποντίκια, οι σ υποδοχείς φαίνεται να διαμορφώνουν τα υψηλής τάσης ιοντικά κανάλια που ενεργοποιούνται από τα ιόντα ασβεστίου, συμπεριλαμβανομένων N-, L, P / Q- και R-τύπου καναλιών  $Ca^{2+}$  [Zhang H, et al (2002)]. Αν και σ2-επιλεκτικά φάρμακα δεν έχουν χρησιμοποιηθεί, η ισχύς κατά σειρά κατάταξης που έχει παρατηρηθεί είναι: αλοπεριδόλη > ibogaine > (+) – Πενταζοκίνη > DTG, θα έλεγε κανείς ότι αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην διαμεσολάβηση των σ2 υποδοχέων. Εκτός από τη μείωση του πλάτους κορυφής του ρεύματος των  $Ca^{2+}$ , οι σ υποδοχείς αλλάζουν τις κινητικές ιδιότητες αυτών των καναλιών.

Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν επίσης, ότι ούτε ο διαχεόμενος δεύτερος αγγελιοφόρος του κυτταροπλάσματος, ούτε η G-πρωτεΐνη εμπλέκονται. Πειράματα στην νευροπόφυση (neurohypophysis) σε ποντίκια, έχουν επίσης αρνητικά αποτελέσματα για την διαμεσολάβηση του δευτεροβάθμιου αγγελιοφόρου (messenger) ή της G-πρωτεΐνης, στην σηματοδότηση του σ1 υποδοχέα [Lupardus PJ, et al (2000)]. Η διαμόρφωση των καναλιών καλίου με πενταζοκίνη ή SKF10047, συνεχίζεται, αν και οι νευρικές απολήξεις έχουν εσωτερικά διαποτιστεί με GTP –free διάλυμα, ή με τον G-πρωτεϊνικό αναστολέα GDPβS, ή τον G-πρωτεϊνικό ενεργοποιητή GDPγS. Σε DMS-114 κύτταρα (κυτταρική γραμμή όγκου που απομονώνονεται από μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα), η αιμάτωση με το GDPβS απέτυχε επίσης να αλλάξει την απόκριση σε SKF10047 [Wilke RA, et al

(1999)]. Παρόμοια αρνητικά αποτελέσματα ελήφθησαν σε δοκιμές με την συμμετοχή της πρωτεϊνικής κινάσης.

Η εσωτερική αιμάτωση των νευρικών απολήξεων με το μη-υδρολύμενο ATP ανάλογο του AMPPcP, δεν είχε καμία επίδραση στην  $K^+$  τρέχουσα αναστολή από τα σ1 φάρμακα/ουσίες. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση ότι τα κανάλια  $K^+$  που υπάρχουν στα αποκομμένα από την έξω πλευρά, επιθέματα, ρυθμίζονται από την SKF10047 [Wilke RA, et al (1999)]. Αυτή η επίδραση αποκλείει κάθε ρόλο για οποιονδήποτε διαλυτό κυτταροπλασματικό παράγοντα. Σε αντίθεση, τα κανάλια  $K^+$  που υπάρχουν στα κύτταρο-προσκολλώμενα επιθέματα, δεν ρυθμίζονται από τα σ1 φάρμακα/ουσίες που εφαρμόζονται έξω από το επίθεμα, υποδεικνύοντας ότι οι σ1 υποδοχείς και τα κανάλια  $K^+$ , μετά από διερεύνηση, πρέπει να είναι πολύ κοντά για οποιαδήποτε λειτουργική αλληλεπίδραση συμβεί [Lupardus PJ, et al (2000)]. Οι Aydar E, et al. (2002) αναπαράστησαν την ρύθμιση του σ1 υποδοχέα από  $K_v$  1.4 και  $K_v$  1.5 καναλιών σε ωκύτταρα από ετερόλογη έκφραση των καναλιών  $K^+$  με τους σ1 υποδοχείς. Η διαμόρφωση των διαύλων ιόντων σε ωκύτταρα *Xenopus*, παρατηρήθηκε παρουσία ή απουσία των σ1 φαρμάκων/ουσιών, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο σ1 υποδοχέας μπορεί να σχηματίζει ένα λειτουργικό σύμπλεγμα με τα εκφραζόμενα ιοντικά κανάλια [Aydar E, et al. (2002)]. Πράγματι, δείχθηκε ότι ο σ1 υποδοχέας σχηματίζει ένα ανοσοκαθιζάμενο συγκρότημα με τα κανάλια ιόντων, τόσο στην νευροπόφυση σε ποντίκια, όσο και όταν συν-εκφράζονται σε ωκύτταρα *Xenopus* (20).

Συνοψίζοντας, μελέτες σχετικά με την διαμόρφωση των σ1 υποδοχέων από τα κανάλια  $K^+$ , μέχρι σήμερα, έχουν δημιουργήσει έναν μηχανισμό μεταγωγής σήματος των σ1 υποδοχών που: (α) είναι μεμβράνη οριοθετημένος [Lupardus PJ, et al (2000), Wilke RA, et al (1999)], (β) ανεξάρτητος από G-πρωτεΐνη ζεύξης και την πρωτεϊνική φωσφορυλίωση [Lupardus PJ, et al (2000), Wilke RA, et al (1999)], (γ) να μπορεί να ανασυσταθεί σε ένα ετερόλογο σύστημα [Aydar E, et al. (2002)], (δ) να μην απαιτεί κυτταροπλασματικούς παράγοντες [Lupardus PJ, et al (2000)], και (ε) να θέλει τον σ1 υποδοχέα και τα κανάλια  $K^+$  να είναι σε στενή γειτνίαση [Lupardus PJ, et al (2000)], πιθανώς για να σχηματιστεί ένα σταθερό μακρο-μοριακό συγκρότημα [Aydar E, et al. (2002)].

Πρόσθετες μελέτες, ωστόσο απαιτούνται για να καθοριστεί εάν η διαμόρφωση των σ1 από τα κανάλια  $K^+$  πραγματοποιείται μέσω άμεσης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης ή μέσω ενδιάμεσων μορίων σηματοδότησης. Δεδομένης της

μεγάλης ποικιλίας λειτουργιών που αναφέρονται για τον  $\sigma 1$ , είναι πιθανότερος ένας μηχανισμός σηματοδότησης του  $\sigma 1$  υποδοχέα, που περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα μόρια ενδιάμεσης σηματοδότησης (τα οποία εντοπίζονται πάνω ή μέσα στην πλασματική μεμβράνη) και όχι μια άμεση αλληλεπίδραση. Επιπλέον, τα υπολείμματα αμινοξέων σε διαύλους  $K_v$  ιόντων, που εμπλέκονται σε αυτή την αλληλεπίδραση (άμεση ή έμμεση) με τους  $\sigma 1$  υποδοχείς, δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. Η διαλεύκανση αυτών των θεμάτων θα ρίξει περισσότερο φως στο μηχανισμό σηματοδότησης των  $\sigma 1$  υποδοχέων.

Οι διαύλοι ιόντων που εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους καρκίνου, μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάσταση, αναπόσπαστο στοιχείο της οποίας είναι ο έλεγχος της κυτταρικής ανάπτυξης και ο πολλαπλασιασμός [Fraser SP, et al (2002)]. Η διπλή παρατήρηση ότι η έκφραση του  $\sigma$  υποδοχέα αυξάνεται σε κυτταρικές γραμμές όγκου / ιστών, και ότι οι υποδοχείς  $\sigma 1$  δρουν ως δευτεροβάθμιες υπομονάδες για ορισμένα κανάλια ιόντων, είναι ενδιαφέρουσα, δεδομένου των συσσωρευμένων αποδείξεων για την εμπλοκή των διαύλων διαφόρων τύπου ιόντων στον πολλαπλασιασμό [Fraser SP, et al (2002)], και την μεταστατική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων [Yao X, et al (1999)]. Επειδή η μείωση του εύρους των καναλιών  $K^+$ , έχει συσχετισθεί με τον μεταστατικό φαινότυπο του προστάτη και τον καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο [Fraser SP, et al (2003)], μια τέτοια επίδραση θα μπορούσε να διέπει και την προτεινόμενη σχέση μεταξύ της εξέλιξης του καρκίνου και των φαρμάκων/ουσιών των  $\sigma 1$  υποδοχέων. Όπως επίσης και στον πολλαπλασιασμό [Nilius B, et al (1992)], υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους η δράση των διαύλων ιόντων μπορεί να συνεισφέρει στην συμπεριφορά των κυττάρων του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της μετανάστευσης [Schwab A, et al (1999)], της απόπτωσης [Wang H, et al (2002)], της πρόσφυσης και της οργάνωσης του κυτταροσκελετού και της έκκρισης [Cantiello HF, et al (1993)]. Μένει να διαπιστωθεί αν τα κανάλια ιόντων, εκτός από τα  $K_v$ , συμπεριλαμβανομένων εκείνων όπως των τασεοελεγχόμενων  $Na^+$  καναλιού [Smith P, et al (1998)], που επίσης διαμορφώνονται από  $\sigma$  φάρμακα/ουσίες, παίζουν κάποιο ρόλο στον μεταστατικό καταρράκτη, και, αν ναι, κατά πόσο αυτό θα μπορούσε να αφορά την διαδικασία του καρκίνου.

**Γ1.4. Διαμόρφωση από την ανκυρίνη:** Οι Hayashi T & Su Tr (2001) έδειξαν ότι οι  $\sigma 1$  υποδοχείς μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στον έλεγχο της λειτουργίας των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές,

έδειξαν ότι ο  $\sigma_1$  υποδοχέας, η ανκυρίνη B και η IP3R-3, εντοπίζονται επίσης στην περιπυρηνική περιοχή και σε περιοχές διακυτταρικής επικοινωνίας, και προτάθηκε ότι αυτό το τριμερές σύμπλεγμα μπορεί να ρυθμίζει την σηματοδότηση των  $Ca^{2+}$  [Hayashi T & Su Tr (2001)]. Παρόλο που ο ακριβής υποκείμενος μοριακός μηχανισμός δεν έχει ακόμη περιγραφεί, είναι καλά γνωστό ότι η προσκόλληση και η οργάνωση του κυτταροσκελετού, είναι σημαντικοί παράγοντες στην κυτταρική βιολογία του καρκίνου [Cairns RA, et al (2003)]

**Γ1.5. Διαμόρφωση από το ενδοκυττάριο  $Ca^{2+}$  :** Οι Vilner BJ και Bowen WD (2000) απέδειξαν ότι οι  $\sigma$  υποδοχείς σε κύτταρα νευροβλαστώματος, μπορούν να χρησιμοποιούν τα σήματα των  $Ca^{2+}$  ώστε να προξενούν κυτταρικές επιδράσεις. Με την χρήση: 1) των  $\sigma$ -inactive (αδρανοποίησης) (και άλλων παρόμοιων δομικών) φαρμάκων/ουσιών, 2)  $\sigma_2$ -εκλεκτικών παραγόντων όπως ο CB-64D, και οι  $\sigma_1$ -εκλεκτικοί παράγοντες δείχθηκε, ότι η γρήγορη και πρόσκαιρη απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο, προκαλείται συγκεκριμένα με την δράση των  $\sigma_1$  υποδοχέων. Και με τη σειρά του αυτό, αποδεικνύει ότι η διαμόρφωση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  μπορεί να επηρεάζει την δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Πράγματι, σε συνάψεις εγκεφάλου σε ποντίκια, η δραστηριότητα του μεταφορέα ντοπαμίνης, βρέθηκε να ρυθμίζεται από  $\sigma_2$  φάρμακα/ουσίες, μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C [Derbez AE, et al (2002)]. Επειδή η ενδοκυττάρια σηματοδότηση των  $Ca^{2+}$  είναι πολύ σημαντική για πολλές κυτταρικές διεργασίες, μπορεί να αποτελεί μηχανισμό μέσω του οποίου, τα  $\sigma_2$  φάρμακα/ουσίες πραγματοποιούν τις επιδράσεις τους στα καρκινικά κύτταρα.

**Γ1.6. Διαμόρφωση από τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων:** Τα σφιγγολιπιδικά επίπεδα σε MCF-7 / Adr- και T47D κυτταρικές σειρές σε καρκίνο του μαστού, διερευνήθηκαν μετά την εφαρμογή του  $\sigma_2$  ειδικών αγωνιστών για την περαιτέρω κατανόηση του μοριακού μηχανισμού, με τον οποίο τα  $\sigma_2$  φάρμακα, μπορούν να προκαλέσουν τα μορφολογικά και αποπτωτικά αποτελέσματα, σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές γραμμές, όπως έχει παρατηρηθεί. Ο CB-184 προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση στα επίπεδα του κεραμιδικού (ceramide) και ταυτόχρονη μείωση στην σφιγγομυελίνη μέσα στις MCF-7 / ADR<sup>-</sup> και T47D σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού. Αυτή η επίδραση μειώνεται μετά την χρήση της N-φαιαιθυλ πιπεριδίνης, ενός μη ειδικού ανταγωνιστή του  $\sigma$  υποδοχέα. Με αυτήν την επίδραση, έχει προταθεί ότι οι  $\sigma_2$  υποδοχείς, μπορούν να χρησιμοποιούν το

σφιγγολιπιδικό προϊόν, για να επηρεάσουν την σηματοδότηση των  $Ca^{2+}$ , τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση [Crawford KW, et al (2002)].

## **Γ2. Σηματοδοτικά μονοπάτια των $\sigma 2$ υποδοχέων**

Παρά τις εντατικές προσπάθειες που έχουν εστιαστεί πάνω στους  $\sigma 2$  υποδοχείς κατά τα τελευταία χρόνια, εξακολουθεί να παραμένει μυστήριο η αλληλουχία και οι δομικές τους πληροφορίες. Η πρόσφατη αναφορά ότι οι  $\sigma 2$  υποδοχείς και η PGRMC1, βρίσκονται και οι δύο ενδοκυτταρίως και ανταγωνίζονται από τους ίδιους προσδέτες των  $\sigma 2$  υποδοχέων ή των προσδετών της PGRMC1, φανερώνει μια σχέση μεταξύ των σχετικά άγνωστων  $\sigma 2$  υποδοχέων και της πολύ γνωστής PGRMC1 πρωτεΐνης [Huang YS, et al. (2014)].

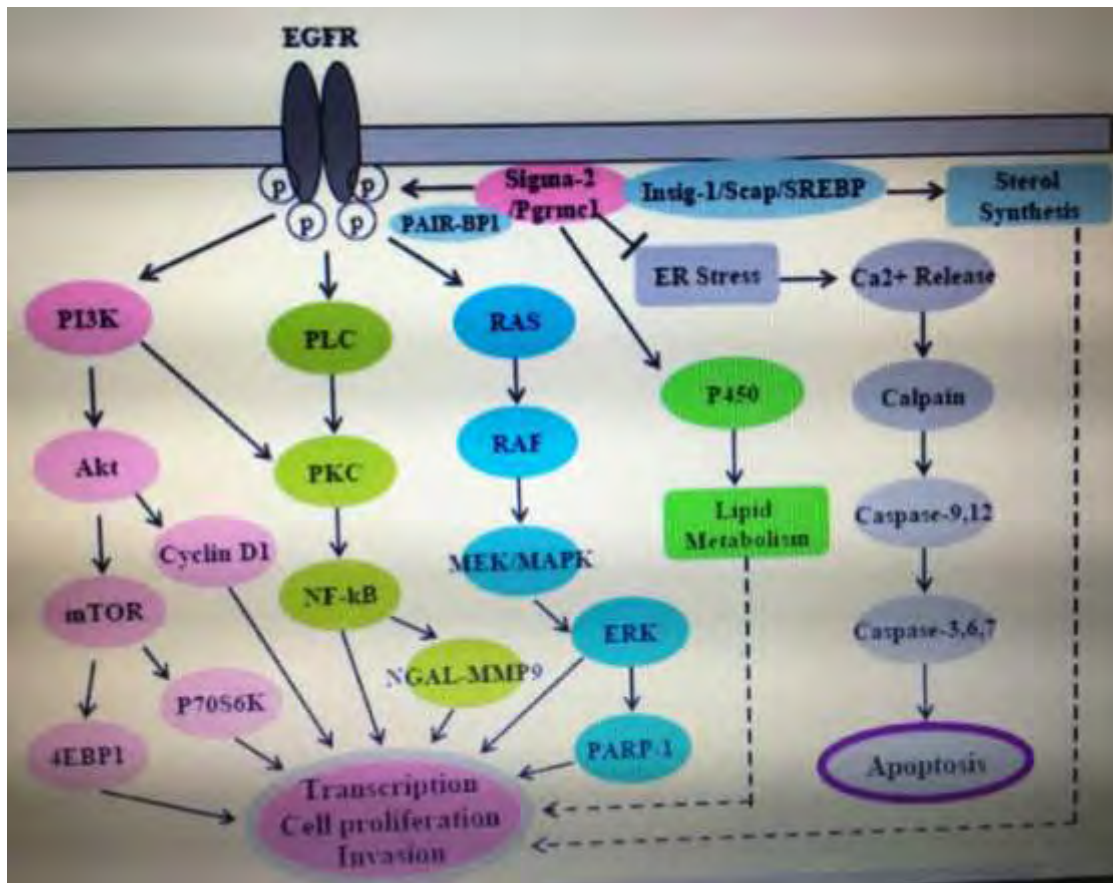
Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι ακόμα σαφής, η PGRMC1 πρωτεΐνη έχει ενοχοποιηθεί για την δράση της στην ρύθμιση της σηματοδότησης των στεροειδών, της ενεργοποίησης του P450, στις αντιαποπτωτικές διεργασίες, την διέγερση της ανάπτυξης του όγκου, της διείσδυσης, και την μετάσταση. Η πρωτεΐνη PGRMC1 έχει επίσης δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον EGFR (επιδερμικός αυξητικό παράγοντα του υποδοχέα), το 100 NGAL (ουδετερόφιλη ζελατινάση που σχετίζεται με την λιποκαλίνη), τα 101 ζεύγη BP1 (ενεργοποιητής πλασμινογόνου αναστολέας της RNA-προσδεμένης πρωτεΐνης 1), και το σύμπλοκο INSIG-1 / Scap/ SREBP (ινσουλινο-επαγώμενο γονίδιο/ SREBP αποκοπής της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης / στερόλικό ρυθμιστικό στοιχείο δεσμευτική πρωτεΐνη) [Huang YS, et al. (2014)].

Παρά τις προσπάθειες που έχουν καταβληθεί για τον ακριβή μηχανισμό της λειτουργίας των  $\sigma 2$  υποδοχέων, τα σηματοδοτικά μονοπάτια τους δεν είναι ακόμα εντελώς γνωστά. Ωστόσο σε κάποια αποτελέσματα αναφέρεται ότι οι προσδέτες των  $\sigma 2$  υποδοχέων για την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, μειώνουν την έκφραση της p70S6K και 4EBP1 (και τα δύο αποτελούν μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού της mTOR), καταστέλλουν την έκφραση της κυκλίνης D1, και επάγουν την PARP-1 (πολυ [ADP-ριβόζη] πολυμεράσης 1), την διάσπαση και την κατάτμηση του DNA fragmentation [Huang YS, et al. (2014)]. Ορισμένοι άλλοι επίσης  $\sigma 2$  προσδέτες, βρέθηκαν ότι προκαλούν οξειδωτικό στρες, κινητοποιούν τα ενδοκυτταρικά ιόντα ασβεστίου και μεσολαβούν στα κανάλια ιόντων καλίου.

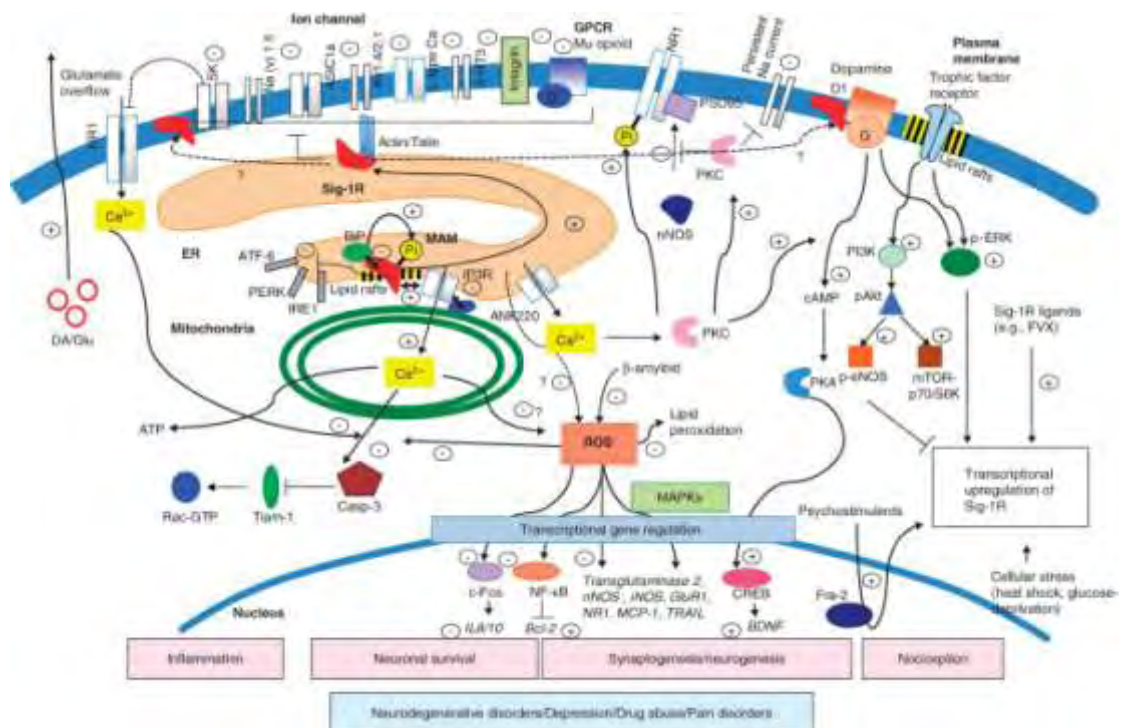
Μια πιο πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη από τους Iniguez MA et al (2013), έδειξε ότι οι αγωνιστές των  $\sigma 2$  υποδοχέων, καταστέλλουν σημαντικά την παραγωγή της IL-2 (ιντερλευκίνη 1), τον TNF- $\alpha$  (ογκονεκρωτικός παράγοντας), την COX-2

(κυκλοοξυγενάσης-2), και τον NF-κB (πυρηνικός παράγοντας) σε T λεμφοκύτταρα. Η πρόσφατη σύγκλιση μεταξύ της πρωτεΐνης PGRMC1 και του  $\sigma 2$  υποδοχέα, έχει ανοίξει την πόρτα για τους ερευνητές να αρχίσουν να αποκαλύπτουν τον μηχανισμό της δράσης  $\sigma 2$  / PGRMC1, ή  $S2R^{Pgrmc1}$  σηματοδότησης. Δύο υποθετικά μοντέλα έχουν δημοσιευθεί: ενός του  $S2R^{Pgrmc1}$  της NGAL σηματοδότησης, και του  $S2R^{Pgrmc1}$  σε διάφορα μονοπάτια τελεστών [Huang YS, et al. (2014)].

Με βάση τα διαθέσιμα αποδεικτικά στοιχεία που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, όπως η ανασταλτική επίδραση των  $\sigma 2$  προσδετών επί των: p70S6K, 4EBP1, κυκλίνη D1, PARP-1, NGAL-MMP9, και την ενεργοποίηση επί της κασπάσης-3/7, πιστεύεται ότι οι  $\sigma 2$  υποδοχείς ή / και η PGRMC1 πρωτεΐνη, έχουν τουλάχιστον τέσσερις οδούς σηματοδότησης, στους οποίους ασκούν τις ρυθμιστικές τους ιδιότητες. (Εικόνα 16,17). Το πρώτο μονοπάτι αποτελεί την σηματοδότηση του EGFR, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ η αναστολή του οδηγεί σε καρκινική κυτταρική απόπτωση. Το δεύτερο, αλληλεπιδρά με την PAIR-BP1 και Insig-1/Scap/ SREBP, ρυθμίζοντας την σύνθεση των στερολών και την σηματοδότηση της προγεστερόνης. Το τρίτο μονοπάτι, ενεργοποιεί την P450 και ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων. Ενώ το τέταρτο, ίσως αναστέλλει το στρες του ER, ενώ η δράση των  $\sigma 2$  προσδετών έγκειται στο να εμφανίζουν τον ανασταλτικό τους ρόλο οι  $\sigma 2$  υποδοχείς, ώστε να προκαλούν την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου, την επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών, και τον ενδεχόμενο θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Στον καρκίνο, ο  $\sigma 2$  υποδοχέας υπερεκφράζεται, ενεργοποιώντας τον EGFR καθώς και πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένου των: α) το PI3K / Akt / mTOR μονοπάτι, β) το PLC / PKC / NF-κB μονοπάτι, γ) το μονοπάτι RAS / RAF / ERK, και άλλων, για την προώθηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την διείσδυση. Επίσης, οι  $\sigma 2$  υποδοχείς μπορούν να διεγείρουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, με την ενεργοποίηση του P450 μεταβολικού μονοπατιού, ενεργοποιώντας το Insig-1/Scap / SREBP μονοπάτι, και την αναστολή της οδού των κασπασών. Όταν ο  $\sigma 2$  υποδοχέας δεσμεύεται με τον προσδέτη, η αλληλεπίδραση μεταξύ του  $\sigma 2$  υποδοχέα και άλλων τελεστών, διακόπτεται ή αναστέλλεται, με αποτέλεσμα την αντιστροφή της πολλαπλασιαστικής τους δράσης και την προαγωγή της απόπτωσης [Huang YS, et al. (2014)].



Εικόνα 16: [Huang YS, et al. (2014)].



Εικόνα 17: Τελευταία δεδομένα [Huang YS, et al. (2014)].

### **Γ3. Ο ρόλος των σ υποδοχέων στην θεραπεία και την απεικόνιση των όγκων**

**Γ3.1. Οι σ1 υποδοχείς ως θεραπευτικοί στόχοι:** Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), οι σ1 παίζουν ρόλο σε πολύπλοκες βιολογικές διεργασίες, που περιλαμβάνουν τον εθισμό στην κοκαΐνη ή μεθαμφεταμίνη [Hayashi, T. et al. (2010), Hiranita, T. et al. (2010)], την μάθηση, την μνήμη, και την κατάθλιψη.

Μερικές μελέτες χρησιμοποιώντας τη μοριακή βιολογική προσέγγιση αποσιώπησης, έχουν ενοχοποιήσει αυτούς τους υποδοχείς, σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος Alzheimer (AD) [Villard, V. et al. (2009), Villard, V. et al. (2010) ], τα εγκεφαλικά επεισόδια και τον νευρικό εκφυλισμό που οφείλεται σε λοίμωξη από τον ιό HIV. Τα ευρήματα αυτά έχουν αυξημένο ενδιαφέρον στην χρήση των σ1 ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους σε πολλαπλά νοσήματα του ΚΝΣ, τα παραδείγματα των οποίων περιγράφονται παρακάτω. Η AD χαρακτηρίζεται από προοδευτικές νευροεκφυλιστικές διαδικασίες που σχετίζονται με την παρουσία : (i) εξωκυτταρικής γεροντικής πλάκας που αποτελείται από αδιάλυτα εξωκυτταρικά συσσωματώματα Ab πεπτιδίων, που προέρχονται από την πρωτεολυτική διάσπαση της αμυλοειδούς πρόδρομης πρωτεΐνης, ή / και (ii) από νευροϊνιδιακά μπερδεμένα ενδοκυτταρικά υπολείμματα, που απαρτίζονται τα διπλά ελικοειδή νημάτια της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau. Οι ασθενείς με AD εμφανίζουν επιλεκτική συναπτική και νευρωνική απώλεια, σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη μάθηση και τη μνήμη [ Selkoe, D.J. (1991)]. Η πιθανή νευροπροστατευτική επίδραση των σ1, είχε αρχικά προταθεί με την παρατήρηση ότι ο γενετικός πολυμορφισμός, μπορεί να αποτελεί έναν προστατευτικό παράγοντα έναντι στην AD [Uchida,N. et al. (2005)].

Πρόσφατες παρατηρήσεις σε προκλινικά μοντέλα AD, επιβεβαίωσαν πράγματι το ρόλο των σ1 ως ενδογενή νευροπροστατευτικό σύστημα στην AD. Σε *In vitro* δοκιμασίες, οι σ1 ανταγωνιστές PRE-084 ή MR-22, περιορίζουν την Ab25-35 επαγόμενη έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και τον θάνατο των νευρώνων σε καλλιέργειες εγκεφαλικού φλοιού σε ποντίκια [Marrazzo, A. et al. (2005)]. *In vivo*, η PRE-084 εμπόδισε την εμφάνιση οξειδωτικού στρες και των



μαθησιακών βλαβών που προκαλούνται σε ποντίκια σε διάφορες ημέρες μετά την ενδοεγκεφαλική έγχυση ενός ολιγομερούς, του αμυλοειδούς-b25-35 παρασκευασμένου πεπτιδίου, σε ένα μη διαγονιδιακό μοντέλο ποντικίου με AD [Meunier, J. et al. (2006)].

Είναι ενδιαφέρον, ότι αυτή η  $\sigma 1$  επαγόμενη επίδραση ήταν μοιρασμένη με την δράση της δονεπεξίλης, τον αναστολέα της χολινεστεράσης, σε κλινική δοκιμές ασθενών με AD, η οποία διαθέτει επίσης ναυτομοριακή συνάφεια με τους  $\sigma 1$  [Li, L. et al. (2010)]. Πιο πρόσφατα, το μικτό σύμπλοκο μουσκαρινικών /  $\sigma 1$  αγωνιστών, ANAVEX1-41 και ANAVEX2-73, φάνηκε να δρα νευροπροστατευτικά σε πολύ χαμηλές δόσεις (sub mg / kg), ενάντια στις μορφολογικές βλάβες που προκαλούνται από τον Ab25-35, συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού θανάτου στον ιππόκαμπο, την αστροκυτταρική ενεργοποίηση, τις βιοχημικές μεταβολές (Κασπάση-3, -9, -12 ενεργοποίηση, οξειδωτικό στρες) και των ελλειμμάτων της μάθησης και της μνήμης [Villard, V. et al. (2009) (2010)].

Ο ακριβής μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο οι  $\sigma 1$  αγωνιστές μπορούν και μετριάζουν το μνημονικό έλλειμμα, παραμένει άγνωστος προς το παρόν. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι αυτή η δράση των  $\sigma 1$  θα μπορούσε να περιλαμβάνει τον νευρωνικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση.

Οι Tsai et al. έδειξαν ότι ο  $\sigma 1$ , προωθεί τον δενδριτικό σχηματισμό στηλών στον ιππόκαμπο, πιθανόν μέσω της αναστολής του τονικού σχηματισμού ελευθέρων ριζών στο ΕΔ [Tsai, S-Y. et al. (2009)]. Οι Li et al. πρώτοι απέδειξαν ότι η ενδοεγκεφαλική έγχυση του Ab25-35 σε ποντίκια, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου (DG) [Li, L. et al. (2010)]. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού των νεογέννητων κυττάρων πεθαίνουν δύο εβδομάδες μετά, σε μια φάση που είναι κρίσιμη για την νευρωνική τους ανάπτυξη. Η ομάδα στη συνέχεια έδειξε ότι η δοσοεξαρτώμενη νευροστεροειδική δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), εξασθενίζει την Ab25-35- επαγόμενη νευρωνική απώλεια, με την ενεργοποίηση των  $\sigma 1$ . Έδειξαν επίσης, ότι η επίδραση της DHEA θα μπορούσε να μιμηθεί τον αγωνιστή των  $\sigma 1$  PRE-084 και ότι η δράση της DHEA μπλοκάρεται από τον  $\sigma 1$  ανταγωνιστή NE-100 [Li, L. et al. (2010)]. Είναι ενδιαφέρον ότι η Ab25-35 προκαλούμενη μείωση της πυκνότητας των δενδριτικών στηλών και το μήκος του διπλού φλοιού-θετικών κύτταρων στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου (DG), επίσης εξασθενούν μετά την θεραπεία με DHEA [Li, L. et al. (2010)]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τη φαρμακολογική δυναμική των  $\sigma 1$

αγωνιστών σαν παράγοντες αύξησης της γνωστικής λειτουργίας και αποδεικνύουν ότι οι σ1 αγωνιστές το κατορθώνουν αυτό, ίσως με την ικανότητά τους να αυξάνουν τους δενδρίτες και τους δενδριτικούς σχηματισμούς στηλών, που είναι ζωτικής σημασίας για την νευρωνική επικοινωνία στον εγκέφαλο.

Οι σ1 ενώσεις θα μπορούσαν επίσης να έχουν θεραπευτικές δυνατότητες σε άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Πολυάριθμες σ1 προσδέτες έχουν δοκιμαστεί σε μοντέλα με εγκεφαλικό επεισόδιο και εμφάνισαν νευροπροστατευτική δράση. Για παράδειγμα, ο σ1 προσδέτης 4-φαινυλ-1- (4-φαινυλβουτυλ) πιπεριδίνη (PPBP), εξετάστηκε για την νευροπροστατευτική δράση του σε ποντίκια, χρησιμοποιώντας την τεχνική απόφραξης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (MCAO) [Harukuni, I. et al. (2000)].

Το PPBP μειώνει σημαντικά τον όγκο του εμφράγματος στον φλοιό [Harukuni, I. et al. (2000)] και η νευροπροστατευτική του δράση, είχε σχέση με εξασθένηση της παραγωγής νιτρικού οξειδίου στον εγκέφαλο [Goyagi, T. et al. (2001)]. Το περισσότερο εντυπωσιακό παράδειγμα ενός σ1 προσδέτη που ενεργεί ως νευροπροστατευτικός παράγοντας, προήλθε από μια μελέτη των Ajmo et al. [Ajmo, C.T., Jr et al. (2006)] όπου ανέφεραν πως υποδόρια έκχυση του σ1 αγωνιστή DTG (15 mg / kg) που δίδεται 24 ώρες μετά την MCAO σε ποντικούς, μειώνει τις περιοχές εμφράγματος, τόσο σε περιοχές του φλοιού / ραβδωτού σώματος όσο και του φλοιού / ιπποκάμπου κατά περισσότερο από 80% σε σύγκριση με τα πειραματόζωα ελέγχου [Ajmo, C.T., Jr et al. (2006)].

Η DTG βρέθηκε να μετριάζει την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου  $Ca^{2+}$ , που προκαλείται από την ισχαιμία μέσω των σ1, επειδή ο ανταγωνιστής των σ1 BD1047 μπλοκάρει αυτή την προστατευτική επίδραση της DTG [Katnik, C. et al. (2006)]. Η αποτελεσματικότητα της DTG, μπορεί επίσης να οφείλεται στην ικανότητά του να μειώνει την φλεγμονώδη απόκριση στον εγκέφαλο [96]. Άλλοι σ1 προσδέτες έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχουν νευροπροστατευτική δράση.

Ο PRE-084 και η αντιαποχρεμπτικός σ1 παράγοντας διμεμορφάνη, δρουν νευροπροστατευτικά σε MCAO στα ποντίκια [Shen, Y.C. et al. (2008)]. Και τα δύο φάρμακα, βελτιώνουν το έμφραγμα κατά 50% και 70% αντίστοιχα, και τα προστατευτικά τους αποτελέσματα, μπορούν να μπλοκαριστούν από τον BD1047 [Shen, Y.C. et al. (2008)].

Περαιτέρω ενίσχυση του ρόλου των σ1 στην νευροπροστασία, ήρθε από την μελέτη των εγκεφαλικών παρασκευασμάτων. Κατά την εξέταση του αποτελέσματος των φαρμάκων στην εξάπλωση της κατάθλιψης, η οποία είναι μια βαθιά αλλά παροδική νευρωνική /νευρογλοιακή εκπόλωση, που εκπέμπεται σε όλον τον φλοιό και την υποφλοιώδη φαιά ουσία κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, οι Anderson και ο Andrew [Anderson, T.R. and Andrew, R.D. (2002)] διαπίστωσαν ότι η προεπεξεργασία των παρασκευασμάτων του εγκεφάλου, με τον σ1 αγωνιστή δεξτρομεθορφάνη ή καρβαταπεντάνη, σημαντικά μπλοκάρει την εξάπλωση της κατάθλιψης και ότι ο σ1 ανταγωνιστής BD1063, ακυρώνει την κατασταλτική δράση εκείνων των προσδετών [Anderson, T.R. and Andrew, R.D. (2002)] .

Οι σ1 προσδέτες θα μπορούσαν επίσης να έχουν θεραπευτικά αποτελέσματα και στην σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), αν και απαιτούνται περισσότερα πειραματικά αποδεικτικά στοιχεία. Ο Haiman et al. [100] εξέτασαν τη δραστηριότητα του εγκεφάλου και συναφών του φλοιού δομών που εμπλέκονται στην ψευδοπρομηκική δράση, που συχνά παρατηρείται σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας και χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτα επεισόδια συναισθηματικής αστάθειας (γέλιο ή / και κλάμα). Αυτοί βρήκαν ότι μια συνδυασμένη φαρμακευτική αγωγή της κινιδίνης και του σ1 προσδέτη δεξτρομεθορφάνη, είχε ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της ψευδοπρομηκικής δράσης, καθώς και μια εξομάλυνση των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών σε αυτούς τους ασθενείς [Haiman, G. et al. (2009)]. Αυτή η μελέτη παρέχει τα πρώτα στοιχεία για την πιθανή εμπλοκή των σ1 στην MS.

Οι σ1 προσδέτες ενδέχεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή του νευρικού ιστού, ειδικά στην κοκαΐνο-HIV-σχετιζόμενη φλεγμονή στο ΚΝΣ. Οι πρόσφατες προσπάθειες έχουν στόχο την διαλεύκανση του ρόλου των σ1 σε HIV-1, που σχετίζεται με τις νευρολογικές διαταραχές (HAND) μεταξύ των χρηστών κοκαΐνης, και έτσι την διερεύνηση της επίδραση της κοκαΐνης στα ιό-παραγόμενα κύτταρα του ΚΝΣ, και την μικρογλοία [Yao, H. et al. (2010), Gekker, G. et al. (2006), Roth, M.D. et al. (2005)]. Νευροπαθολογική συσχέτιση με το HAND, περιλαμβάνει: 1) η νευρογλοιακή ενεργοποίηση, 2) η φλεγμονή των νευρών, 3) η επαγωγή των χημειοκινών, 4) η αυξημένη εξαγγείωση μονοκυττάρων και 5) ο θάνατος / απώλεια. Έρευνα σε αυτόν τον τομέα για την επίπτωση της μόλυνσης με ιό HIV-1 σε χρήστες κοκαΐνης, έκανε γνωστό ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου στο ΚΝΣ που σχετίζεται με την φλεγμονή.

Επιπλέον, ο ρόλος των σ1 στην ανοσοποιητική αλλοίωση που προκαλείται από την κοκαΐνη και τον ιό HIV-1 έχει επίσης εξεταστεί σε αρκετά μοντελικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ανθρωποποιημένων ποντικών. Σε αυτά τα μοντέλα ποντικών με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, η έκθεση στην κοκαΐνη απεδείχθη, ότι αυξάνει την έκφραση του HIV προσδέτη C-C υποδοχέα χημειοκίνης τύπου 5 και χημειοκίνης υποδοχέα 4, σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, και με τον τρόπο αυτό διευκολύνει την αυξημένη συγκέντρωση ιών στο αίμα. Είναι ενδιαφέρον, πως η προεπεξεργασία αυτών των πειραματόζων με τον σ1 ανταγωνιστή BD1047, σημαντικά μετριάζει την ιογενή λοίμωξη που προκαλείται από την κοκαΐνη [Yao, H. et al. (2010), Gekker, G. et al. (2006), Roth, M.D. et al. (2005)].

Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, είναι ότι με την μεσολάβηση της κοκαΐνης, παρατηρείται αύξηση της αντιγραφής του HIV από τα μικρογλοιακά κύτταρα; η οποία όμως, καταργείται σημαντικά από τον BD1047 [Yao, H. et al. (2010)]. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι σ1 ανταγωνιστές μπορούν να μειώσουν την κοκαΐνη-HIV-σχετιζόμενη φλεγμονή των νεύρων και την άνοια.

Ο σ1 έχει επίσης γίνει στόχος για τη ρύθμιση των κυττάρων ανάπτυξης και ανοσοαπόκρισης, επειδή ο SR31747, ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό, βρέθηκε να δεσμεύει τον σ1 [Berthois, Y. et al. (2003)]. Πράγματι, ένα σημαντικό εύρημα είναι ότι ο σ1 (αλλά και ο σ2 υποδοχέας) υπερεκφράζονται σε πολλούς όγκους στον άνθρωπο ή και αλλού [Palmer, C.P. et al. (2007), Vilner, B.J. et al. (1995), Wang, B. et al. (2004)].

Ως αποτέλεσμα, της φαρμακολογικής μελέτης του μικρού μορίου των σ1 προσδετών, για πιθανές εφαρμογές στην κλινική θεραπεία και απεικόνιση, έχει εξελιχθεί σε μια ενεργή περιοχή έρευνας για τον καρκίνο [Spruce, B.A. et al. (2004)]. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά δίνουν νέους και αναδυόμενους ρόλους των σ1, στην παθογένεια της νόσου. Περιέργως, οι περισσότερες από αυτές τις λειτουργίες των σ1, γίνεται προφανώς με την διαμεσολάβηση από έναν περίπλοκο μηχανισμό που συνεπάγεται τη μετατόπιση τους προς την μεμβράνη του πλάσματος [Yao, H. et al. (2010), Gekker, G. et al. (2006), Roth, M.D. et al. (2005)] ή με την μετατόπιση προς την μοναδική cisternae (δεξαμενή) του ΕΔ, που είναι εγγύς της μεμβράνης του πλάσματος, για παράδειγμα, όπως έχει ανακαλυφθεί από το εργαστήριο Ruoho σε κύτταρα κινητικού νευρώνα στο κοιλιακό κέρασ σε ποντίκια, που εμπλέκονται στην

πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS) [Mavlyutov, T.A. et al. (2010)]. Ωστόσο, η συμμετοχή των σ1 στο ALS δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα.

**Γ3.2. Ουσίες σ υποδοχέων ως βοηθοί στην απεικόνιση Όγκων:** Οι υψηλές συγκεντρώσεις των θέσεων πρόσδεσης των σ1 και σ2 υποδοχέων σε κυτταρικές γραμμές όγκων και ιστών, είναι ενδεικτικό της συμμετοχής τους στην κυτταρική παθοφυσιολογία του καρκίνου και θα μπορούσε να έχει διαγνωστικό δυναμικό στην απεικόνιση του όγκου. Πολλές προκλινικές μελέτες έχουν εκτιμήσει την χρησιμότητα των ραδιοσημασμένων σ ουσιών, όπως παράγοντες απεικόνισης όγκου σε μελάνωμα [Everaert H, et al (1997)], στον καρκίνο του μαστού [Caveliers V, et al (2002)], του προστάτη [John CS, et al (1998)], και στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε μοντέλα όγκων σε ποντίκια [Everaert H, et al (1997)].

Γενικά, αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι σ ουσίες θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικοί προσδέτες για την απεικόνιση του όγκου, σε συνδυασμό με τεχνικές όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων ή αξονική τομογραφία εκπομπής μονού φωτονίου [Wheeler KT et al. (2000), Zamora PO, et al. (1998), John CS, et al (1998)]. Οι περισσότερες από αυτές τις σ ουσίες, είναι μη εκλεκτικοί για τους σ1 και σ2 υποδοχείς, αλλά, πιο πρόσφατα, σ2-εκλεκτικοί παράγοντες έχουν βρεθεί και υπόσχονται πολλά σε αυτόν τον τομέα [Shiue C, et al (2000)].

**Γ3.2. Η έκφραση των σ υποδοχέων στις κυτταρικές γραμμές του όγκου και των ιστών (ανθρώπινες ή/και άλλες):** Και οι δύο υπότυποι του σ υποδοχέα είναι εντόνως εκφρασμένοι σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, σε διάφορους ιστούς με καρκίνο στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων του μικροκυτταρικού και μη καρκίνου του πνεύμονα [JohnnCS, et al (1995), Vilner BJ, et al (1995)], των νεφρών, του παχέος εντέρου, το σάρκωμα, σε όγκους του εγκεφάλου, σε καρκίνο του μαστού, το μελάνωμα, το γλοιοβλάστωμα ,το νευροβλάστωμα, και τον καρκίνο του προστάτη [Vilner BJ, et al (1995), Bem W, et al (1991)]. Συγκρίσιμα ευρήματα διατίθενται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές σε ποντίκια, όπως του C6 γλοιώματος, του N1E-115 [Vilner BJ, et al (1995)] και NO108-15 νευροβλαστώματος, που γενικά συμφωνούν με τα δεδομένα πάνω σε ανθρώπινο ιστό.

Πολλές από αυτές τις παρατηρήσεις έχουν γίνει με βάση μη ειδικής δέσμευσης του σεσημασμένου με φάρμακα σ1 ή σ2-υποδοχέα. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι σ1 θέσεις καλύπτονταν με dextrallophan έτσι ώστε να καθοριστούν οι περιοχές με τις σχετικές ποσότητες σ1 και σ2 στις προετοιμασίες των κυττάρων.

Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά περιμένουν επιβεβαίωση με Western blot ανάλυση και με την αντίστροφη μεταγραφή με PCR (RT-PCR). Μια συγκριτική μελέτη από τον Wheeler KT et al. (2000) σε αδενοκαρκίνωμα μαστού σε ποντίκια, αποκάλυψε ότι τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κατείχαν 10 φορές περισσότερο  $\sigma 2$  υποδοχείς, από ότι τα αδρανή κύτταρα. Ο Zamora PO, et al. (1998) αξιολόγησε την πυκνότητα των  $\sigma$  θέσεων, μετά την διέγερση της μίτωσης και την ανάπτυξη τους, μέσω του κυτταρικού κύκλου σε κυτταρικές γραμμές από όγκο του μαστού T47D και MCF-7 σε άνθρωπο, καθώς και στην κυτταρική γραμμή όγκου του προστάτη DU-145. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι: (α) υπήρχε άμεση συσχέτιση μεταξύ της δέσμευσης του σ φάρμακου {[N- [1' (2-πιπεριδινυλ) αιθυλ] -4-[I<sup>125</sup>] ιωδοβενζαμίδης (<sup>125</sup>I-PAB)}, μετρίως επιλεκτικό για τους  $\sigma 1$  υποδοχείς, και τον πολλαπλασιασμό και ότι (β) μια αύξηση των  $\sigma$  θέσεων πρόσδεσης λαμβάνει χώρα πριν από τη μίτωση. Χρησιμοποιώντας το N- [2- (1-πιπεριδινυλο;) -αιθυλ] -3-<sup>123</sup>I-ιωδο-4 μεθοξυβενζαμίδιο, επίσης μετρίως εκλεκτικό για τους  $\sigma 1$  υποδοχείς, μια άλλη μελέτη διαπίστωσε επίσης ότι  $\sigma$  και κυρίως  $\sigma 1$  υποδοχείς υπάρχουν σε υψηλή πυκνότητα σε βιοψίες των όγκων του μαστού σε άνθρωπο, αλλά ουσιαστικά απουσιάζουν στους φυσιολογικούς ιστούς [Caveliers V, et al (2002)]. Η έκφραση του  $\sigma 1$  υποδοχέα, έχει παρακολουθηθεί ανοσοκυτταροχημικώς, και έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης για την πρόβλεψη της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων σε όγκους του μαστού, ιδιαίτερα, όπου υπήρξε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ  $\sigma 1$  έκφρασης του υποδοχέα και της κατάστασης του υποδοχέα της προγεστερόνης [Simony-Lafontaine J, et al (2000)].

#### **Γ4. $\sigma$ υποδοχείς ως ρυθμιστές της ηλεκτρικής πλαστικότητας σε καρκινικά κύτταρα**

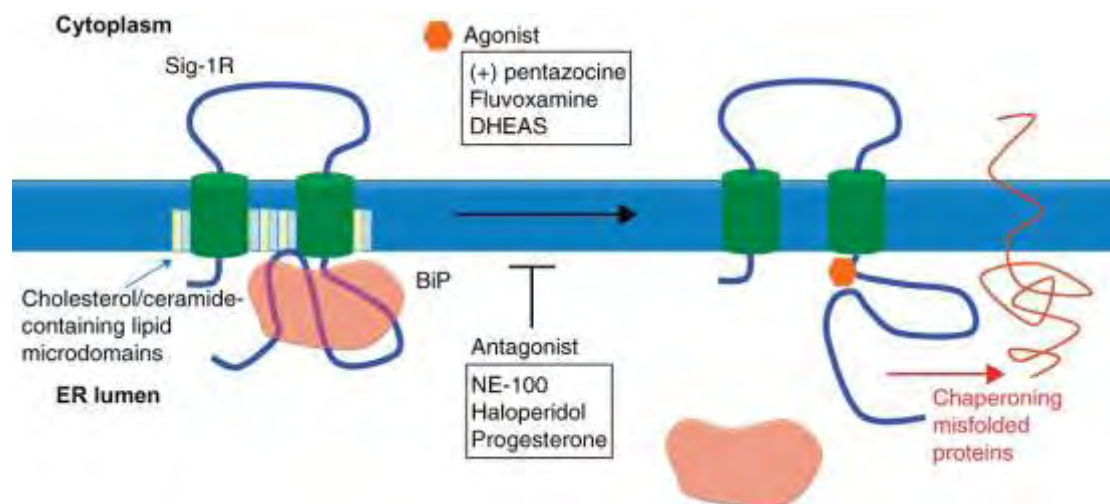
Η ιδέα γύρω από τους  $\sigma$  υποδοχείς έχει ξεκινήσει τα τελευταία 40 χρόνια από μια φαρμακολογική έρευνα που διατύπωσε πως υπάρχουν 3 τύποι οπιοειδών υποδοχέων ( $\mu$ ,  $\kappa$  και  $\sigma$  υποδοχείς) που έχει ήδη αναφερθεί στο γενικό μέρος αυτού του συγγράμματος, σε μια βάση από αρκετούς οπιοειδείς παράγοντες, που προκαλούν μια ψυχομιμητική επίδραση, παρόμοιας με εκείνης που παράγεται από την bymorphine, ketacyclazocine και του SKF 10,047 ,αντίστοιχα [Martin et al., (1976)]. Περαιτέρω φαρμακολογικές μελέτες, αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο θέσεων δέσμευσης, δηλαδή τον  $\sigma 1$  (Sig1R) και τον  $\sigma 2$  υποδοχέα (Sig2R) [Quirion et al et al.,(1992)]. Ο  $\sigma 1$  κλωνοποιήθηκε το 1996 (gene names: SIGMAR1 ή OPRS1) και το γονίδιο βρίσκεται στη θέση on 9p13 [Hanner et al., (1996); Prasad et al., (1998)].

Ο σ1 υποδοχέας κατέχει 2 διαμεμβρανικές περιοχές και 2 πεδία πρόσδεσης με στεροειδή. Αυτά δημιουργούν μια εσοχή που είναι η περιοχή πρόσδεσης με την χοληστερόλη, τα στεροειδή, τα σφυγγολιπίδια [Palmer et al., 2007; Fontanilla et al., 2008], καθώς επίσης και ενός ευρέος πάνελ συνθετικών ή φυσικών σύμπλοκων (σ προσδετών-ligands, που ανήκουν σε διάφορες ομάδες όπως τα οπιοειδή, τα αντιψυχωσικά, ψυχοτρόπα, αλκαλοειδή ή αντικαταθλιπτικά [Pal et al., 2008; Maurice and Su, 2009] (Εικόνα 3). *In vivo*, η ενδογενής δυμεθίλ-τριπταμίνη (DMT) αλληλεπιδρά με τους σ1 υποδοχείς στον εγκέφαλο, αλλά αυτό δεν είναι τόσο σημαντικό, μιας και κανένας ενδογενής σ1 προσδέτης δεν έχει ακόμη πιστοποιηθεί [Fontanilla et al., 2009; Mavlyutov et al., 2012]. Η μοριακή φύση των σ2 υποδοχέων βρίσκεται εδώ και καιρό υπό αμφισβήτηση. Σε πρόσφατη εργασία προτάθηκε το μεμβρανικό σύμπλοκο του υποδοχέα της προγεστερόνης 1 (Pgrmc1) ως υποτιθέμενο στους σ2 σημείο πρόσδεσης [Xu et al., 2011].

Αυτός ο υποτιθέμενος σ2 υποδοχέας που στην ουσία είναι μια πρωτεΐνη, και πιθανόν να σχετίζεται με το κυτόχρωμα, προσδένει αρκετές P450 πρωτεΐνες και διάφορα χημικά σύμπλοκα και συμμετέχει στην σύνθεση της χοληστερίνης. Ωστόσο ο σ2 υποδοχέας, μοιράζεται κάποιες φαρμακολογικές ιδιότητες με τον σ1, και οι δύο πρωτεΐνες (αφού πρόκειται για υποδοχείς πάντα πρόκειται για πρωτεΐνες), ανήκουν σε διακριτές οικογένειες.

Ο σ1 υποδοχέας σχετίζεται με πολλές παθήσεις, όπως: το έμφραγμα, την εξάρτηση στην κοκαΐνη, την νόσο Alzheimer, την αμνησία, την πλάγια μυατροφική σκλήρυνση και τον καρκίνο [Romieu et al., 2004; Aydar et al., 2006; Renaudo et al., 2007; Maurice and Su, 2009; Luty et al., 2010; Mavlyutov et al., 2011; Ruscher et al., 2011; Kourrich et al., 2013]. Παρόλα αυτά ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί ο σ1 υποδοχέας, παραμένει ελάχιστα κατανοητός. Ο Su et al μελετώντας τους νευρώνες και τα CHO κύτταρα, έριξε φως στον μοριακό μηχανισμό με τον οποίο λειτουργούν αυτοί οι υποδοχείς. Ο σ1 βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, σε στενή επαφή με τα μιτοχόνδρια, σε μια περιοχή που καλείται μιτοχόνδριο σχετιζόμενη ενδοπλασματική μεμβράνη (MAM). Σε κατάσταση ηρεμίας, εντοπίζεται μέσα στην κεραμινική και χοληστερονική πλούσια σε λιπίδια μικροπεριοχή, που σχετίζεται με την ενδοπλασματικού δικτύου περιοχή GRP78 (BiP) [Hayashi and Su, 2007; Hayashi and Fujimoto, 2010]. Μια κατάσταση στρές οδηγεί το ΕΔ σε βλάβες, και ο σ1 διασπάται από τον BiP και συνδέει τους IP3 υποδοχείς, ενισχύοντας με την σειρά του την κυτταρική επιβίωση, μέσω ελέγχου των σηματοδοτήσεων των ιόντων Ca, μεταξύ μιτοχονδρίων και ΕΔ.

Επιπλέον, ο  $\sigma 1$  μετατίθεται σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα και προσδένεται σε διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση με τους  $\sigma$  αγωνιστές, μιμείται την στρεσογόνα αυτή διάσπαση των  $\sigma 1$  από τους BiP και την  $\sigma 1$  μετάθεση, ενώ οι  $\sigma$  προσδέτες κατατάσσονται ως ανταγωνιστές, εμποδίζοντας αυτήν την διαδικασία. [Hayashi and Su, 2007]. Έτσι, αυτά τα αποτελέσματα έχουν οδηγήσει στην δημιουργία ενός μοντέλου, όπου οι  $\sigma 1$  υποδοχείς τηρούν μια σιγή υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά σε περιπτώσεις παθήσεων, συμπεριφέρονται σαν συνοδοί που προσδένονται οι πρωτεϊνικοί στόχοι, προς όφελος της επιβίωσης του κυττάρου [Su et al., 2010] (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18:** Ο  $\sigma 1$  υποδοχέας αποτελεί αναπόσπαστη πρωτεΐνη της μεμβράνης και περιέχει δύο διαμεμβρανικές περιοχές και ένα μακρή O-τελικό άκρο, που παραμένουν εντός του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Οι  $\sigma 1$  είναι κυρίως συγκεντρωμένοι στην χοληστερόλη και σε κεραμιδικά πλούσιες μικροεπικράτειες λιπιδίων στο εξειδικευμένο υπό-ER (π.χ., μιτοχόνδρια που σχετίζονται με την μεμβράνη ER: MAM). Σε λανθάνουσα κατάσταση, ο  $\sigma 1R$  σχηματίζει ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης με άλλον ER συνοδό, την ανοσοσφαιρίνη βαρέων αλυσίδων δεσμευόμενη πρωτεΐνη (BiP). Οι  $\sigma 1R$  αγωνιστές ή η εξάντληση των  $Ca^{2+}$  του ER προωθεί την αποσύνδεση του  $\sigma 1R$  από την BiP, μεγιστοποιώντας έτσι τη δραστηριότητα του συνοδού των  $\sigma 1$ . Οι  $\sigma 1$  ανταγωνιστές ενισχύουν την σύνδεση, εμποδίζοντας έτσι την δράση των  $\sigma 1$  αγωνιστών. Η δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή και η περιοχή που βρίσκεται το O-τελικό άκρο, αντιπαρατίθενται για να σχηματίσουν μία θέση πρόσδεσης για τον  $\sigma 1$  προσδέτη, DHEAS: θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη. [Su et al., 2010]

Αυτή η υπόθεση έχει κερδίσει έδαφος από νέες μελέτες, που παρουσιάζουν ότι η σιγή που επιδεικνύει η μοριακή μορφή του  $\sigma 1$  υποδοχέα, βοηθά τον εγκέφαλο να ανάκαμψη μετά από ένα έμφραγμα σε πειραματικό επίπεδο (Ruscher et al., 2011) και προωθεί την εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς, μετά από μια οξεία βλάβη στο οπτικό νεύρο (Mavlyutov et al., 2011). Το πώς η πρωτεΐνη στόχος, επιλέγεται από τον  $\sigma 1$  υποδοχέα, είναι πολύ σημαντικό. Πίσω από την σύζευξη με τους IP3 υποδοχείς, ένας μεγάλος αριθμός μελετών κυρίως βασισμένες πάνω στην επίδραση από εξωγενείς  $\sigma$  προσδέτες, έχουν δείξει ότι οι  $\sigma 1$  υποδοχείς, παρεμβαίνουν στο ντοπαμινικό και το



ακετυλοχολινικό σύστημα και μεταβάλλουν την λειτουργία των ιοντικών καναλιών και ότι ανήκουν σε διάφορες οικογένειες.

Πρόσφατες έρευνες έχουν περιγράψει μια μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των  $\sigma_1$  υποδοχέων και των ιοντικών καναλιών, προτείνοντας πως τα τελευταία αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνικών στόχων ως συνοδοί των  $\sigma_1$  [Carnally et al., 2010; Crottes et al., 2011; Balasuriya et al., 2012; Kourrich et al., 2012].

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα κανάλια ιόντων έχουν ενσωματωθεί στις κύριες κυτταρικές διεργασίες που εξηγούν τα χαρακτηριστικά του καρκίνου: όγκοι συχνά εκφράζουν κανάλια ιόντων και μεταφορείς που απουσιάζουν από τον αντίστοιχο ιστό. Πιστεύεται ότι αυτά τα κανάλια και οι μεταφορείς, ενισχύουν την ικανότητα του κυττάρου να προσαρμοστεί στις μεταβολικές συνθήκες που συναντώνται μέσα στον ιστό του όγκου (χαμηλό pH και PO<sub>2</sub>, την κακή παροχή θρεπτικών συστατικών, κλπ...) [Wulff et al., 2009; Prevarskaya et al., 2010; Arcangeli, 2011]. Ως εκ τούτου, πρωτεϊνικοί μεταφορείς, συμμετέχουν στην αντίδραση της προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων σε στρεσογόνο περιβάλλον, πράγμα που τους προσδίδει μεγαλύτερη επιθετικότητα.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο  $\sigma$  υποδοχέας συμμετέχει επίσης στον πόνο, στην αντίδραση του ανοσοποιητικού, την προστασία του ήπατος και του πολλαπλασιασμού του καρκίνου [Yao H, et al.(2010), Palmer CP, et al.(2007), Hayashi T, et al.(2008), Su TP, et al.(2010), Yoon SY, et al.(2010), Fu Y, et al.(2010)]

## **Γ5. $\sigma_2$ και καρκίνος παγκρέατος. Διαφοροποίηση των $\sigma_1$ από τους $\sigma_2$ υποδοχείς**

Ο  $\sigma_2$  υποδοχέας μπορεί να διεγείρει την απόπτωση επιλεκτικά στον καρκίνο του παγκρέατος, αυξάνοντας την επίδραση του προτύπου θεραπείας [Hornick JR et al., 2012].

Οι  $\sigma_1$  και  $\sigma_2$  υποδοχείς έχουν ταυτοποιηθεί κλασικά με βάση την συνάφεια πρόσδεσης τους με την [<sup>3</sup>H] - (+) - πενταζοκίνη και [<sup>3</sup>H] -1,3-δι (2-τολυλο) γουανιδίνη ([<sup>3</sup>H] -DTG). Και οι δύο  $\sigma$  υποδοχείς δεσμεύουν την πενταζοκίνη, ενώ μόνο ο  $\sigma_2$  δεσμεύει την DTG [Walker JM, et al., 1990]. Αρχικά οι θέσεις πρόσδεσης των  $\sigma$  υποδοχέων, προσδιορίστηκαν επί των κυττάρων του όγκου, με (+) - [<sup>3</sup>H] -N-allylnormetazocine (SKF 10047) και (+) - [<sup>3</sup>H] 3- (3-υδροξυφαινυλ) -N-(1-προπυλ) πιπεριδίνη (3-PPP) στις αρχές του 1980, κατά τη διάρκεια απόπειρας χαρακτηρισμού

αυτών των πρωτεϊνών σε κύτταρα NCD20 [Largent BL, et al., 1986], η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη ενώσεων που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των θέσεων πρόσδεσης στα κύτταρα του όγκου [John CS, et al 1994, Vilner BJ, et al. 1995]. Λίγο αργότερα, οι σ2 υποδοχείς ταυτοποιήθηκαν ως πιθανοί δείκτες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε στερεούς όγκους [Wheeler KT, et al. 2000]. Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές στον καρκίνο του μαστού, που καλλιεργήθηκαν in vitro, αξιολογήθηκαν απευθείας από τον πολλαπλασιασμό με BrdU χρώση, ενώ τα κύτταρα που αυξήθηκαν σε γυμνά ποντίκια, αξιολογήθηκαν έμμεσα με προσδιορισμό της αναλογίας των πολλαπλασιαζόμενων αδρανών κυττάρων, που αναφέρεται ως P: Q αναλογία. Η συγκέντρωση του σ2 υποδοχέα εκτιμήθηκε με την πρόσδεση του [3H]-DTG σε ομογενοποιημένα κυτταρικής μεμβράνης, και με την (+) – Πενταζοκίνη, να συγκαλύπτουν τις σ1 θέσεις. Χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο, προσδιορίστηκε ότι η συγκέντρωση του σ2 υποδοχέα είναι 10 φορές μεγαλύτερη σε πολλαπλασιαζόμενα από ότι σε αδρανή κύτταρα. Έτσι γίνεται εμφανές ότι υποδοχείς σ2 είναι εντόνως εκφραζόμενοι σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ενώ η έκφρασή τους μειώνεται όταν τα κύτταρα καθίστανται αδρανή [Damaskos C, et al (2014)]

Το εύρημα πως οι προσδέτες των σ2 υποδοχέων συσσωρεύονται στις κακοήθειες και ότι έχουν αυξάνουν την πυκνότητα τους σε πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, δικαιολογεί την λογική πολλών εργαστηρίων, να συνεχίζουν τις έρευνες σε αυτήν την κατηγορία μορίων, για την απεικόνιση του καρκίνου με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων ή τομογραφία εκπομπής απλού φωτονίου, όπως αναθεωρήθηκε από τους Mach και Wheeler 2009. Πρόσφατα στοιχεία για τη συμμετοχή του ανθρώπινου προγεστερονικού υποδοχέα μεμβρανικού δεσμευτικού συστατικού 1 (PGRMC1), στο δεσμευτικό σύμπλοκο του σ2 υποδοχέα, βοηθούν στην ταυτοποίηση του σ2 υποδοχέα [Xu, J., et al., 2011]. Η ταυτοποίηση και η κλωνοποίηση του υποδοχέα σ2 είχε παραμείνει απίθανη για πολλά χρόνια, παρά την μια δεκαετία έρευνας.

Πρόσφατα, ο PGRMC1 αναγνωρίστηκε ως η πιθανότερη θέση πρόσδεσης των σ2 υποδοχέων, μετά από φωτοσυγγενική δέσμευση με ένα νέο προσδέτη τον WC-21, όπως συγκριτικά και με το γνωστό προσδέτη του PGRMC1, τον AG-205 [Xu, J., et al., 2011, Ahmed IS et al. 2010]. Το σημαντικό αυτό εύρημα έθεσε το βήμα για την επικύρωση των μελετών της υπερέκφρασης του PGRMC1 /σ 2 υποδοχέα και για την λειτουργία του στον καρκίνο του παγκρέατος, επειδή έχει δειχθεί προηγουμένως πως ο PGRMC1 μπορεί να στοχευθεί με μικρού -μορίου αναστολείς [Ahmed IS et al. 2010]. Κατά τον ίδιο τρόπο, έχει στοχευθεί ο σ2 με μικρού μορίου αναστολείς στον

καρκίνο του παγκρέατος [Hornick JR, et al. 2010, Crudden G, et al. 2005]. Παραδοσιακά, ο PGRMC1 έχει διερευνηθεί για την υπερέκφραση σε καρκίνους με ευαισθησία στην προγεστερόνη, όπως των ωοθηκών και του μαστού [Crudden G, et al. 2005, Hand RA, et al 2003]. Η προγεστερόνη παρουσιάζει αντιαποπτωτική δραστηριότητα στον καρκίνο των ωοθηκών? Ωστόσο, τα PGRMC1 απεμπλουτισμένα κύτταρα, παρουσίασαν απόπτωση όταν έλαβαν θεραπεία με προγεστερόνη [Peluso JJ, et al. 2009]. Πρόσφατα, αυτό το σύμπλεγμα, βρέθηκε να υπερεκφράζεται στον ορό και τα νεοπλάσματα, σε ασθενείς με καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα και adenocarcinoma [Vilner BJ, et al. 1995]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η έκφραση του PGRMC1 έχει βρεθεί πως διαμορφώνει την ευαισθησία του καρκίνου των ωοθηκών σε χημειοθεραπεία [Crudden G, et al. 2005, Peluso JJ, et al. 2011], και συσχετίζεται με τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα και την υποξία στον καρκίνο του μαστού [Neubauer H, et al 2008]. Συνοψίζοντας, οι σ προσδέτες των σ2 υποδοχέων έχουν βρεθεί να διαμεσολαβούν στην απόπτωση και, ως εκ τούτου, θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν ως ευαισθητοποιητές για πρότυπο χημειοθεραπείες. Ως εκ τούτου, οι σ2 υποδοχείς μπορούν να θεωρηθούν ως δυνητικοί στόχοι για την αγωγή του καρκίνου του πάγκρεας [Kashiwagi H, et al (2007)].

## **Γ6. Ο σ2 υποδοχέας ως βιοδείκτης της πολλαπλασιαστικής ανάπτυξης του κλάσματος των συμπαγών όγκων**

Ο σ2 υποδοχέας εντοπίστηκε για πρώτη φορά από Hellewell SB και Bowen WD (1990), μέσω μελετών σύνδεσης υποδοχέα σε κύτταρα PC12, μίας κυτταρικής γραμμής από φαιοχρωμοκύττωμα που προέρχεται από τα επινεφριδίων σε ποντίκια, όπου απέδειξαν πως υπήρχε υψηλή πυκνότητα σ2 και σ1 υποδοχέων σε μια ευρεία ποικιλία κυττάρων σε όγκους στον άνθρωπο και σε ποντίκια. Σε γενικές γραμμές, η πυκνότητα των σ2 υποδοχέων στις κυτταρικές γραμμές όγκου ήταν υψηλότερη από εκείνη των σ1. Μία εξαίρεση σε αυτό αποτελεί η κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη, τα κύτταρα LNCaP.FGC, και THP-1 στην λευχαιμία. Η πρόσθετη παρατήρηση ότι ο [3H] DTG-σεσημασμένος σ2 υποδοχέας εκφράζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς, οδηγεί στο ότι ο σ2 υποδοχέας μπορεί να είναι ένας πιθανός βιολογικός δείκτης για την απεικόνιση καρκίνου με λειτουργικές τεχνικές όπως η ενιαία τομογραφία εκπομπής φωτονίων (SPECT) και εκπομπής ποζιτρονίων (PET). Αν και η πιθανή χρησιμότητα των σ2 υποδοχέων ως βιοδείκτης για τη διαφοροποίηση

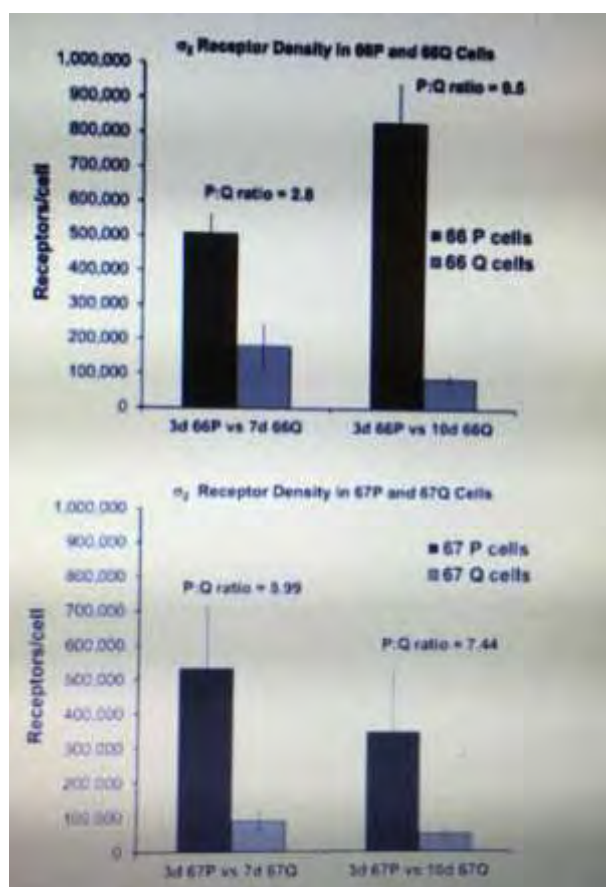
συμπαγών όγκων από τους περιβάλλοντες κανονικούς ιστούς, η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των  $\sigma^2$  υποδοχέων και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, δεν έχει εκτενώς εξεταστεί [Robert H. et al (2013)].

Ένα από τα βασικά μέτρα του πολλαπλασιασμού σε έναν συμπαγή όγκο είναι η πολλαπλασιαστική του κατάσταση (PS) όπου ορίζεται ως ο λόγος των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (P) προς εκείνων που έχουν οδηγηθεί σε κατάσταση ηρεμίας (Q), με στέρηση θρεπτικών ουσιών ή / και υποξία ( $PS=P/Q$ ). Ένα παρόμοιο μέτρο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι και το κλάσμα της ανάπτυξης (GF), το οποίο καθορίζεται από την αναλογία του αριθμού των P κυττάρων σε έναν όγκο, διά του συνολικού αριθμού των κυττάρων P και Q, ( $GF=P/P+Q$ ) [Robert H. et al (2013)].

Κάθε συμπαγής όγκος, είτε πρόκειται για έναν κακοήγη όγκο σε έναν ασθενή ή ένα μεταμοσχεύσιμο καρκινικό όγκο που καλλιεργείται σε μοντέλα τρωκτικών, περιέχει πληθυσμούς τόσο P και Q κυττάρων. Ο αριθμός των κυττάρων P και Q σε έναν όγκο είναι εξαιρετικά μεταβλητός από τον έναν ασθενή στον άλλο, και αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ζήτημα στην κλινική διαχείριση του καρκίνου. Για παράδειγμα, η ακτινοβολία και τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά, σκοτώνουν τα κύτταρα P πιο αποτελεσματικά από τα κύτταρα Q, και τα Q κλωνογόνων κυττάρων μπορούν συχνά να επιβιώσουν μετά την ολοκλήρωση της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας. Επομένως, η γνώση της GF και PS ενός όγκου μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες στους ογκολόγους, στον καθορισμό της κατάλληλης στρατηγικής για την αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνο, είτε με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Οι όγκοι που έχουν υψηλή GF και PS, συνήθως ανταποκρίνονται καλύτερα στην hyperfractionated θεραπεία με ακτινοβολία, σε σχέση με την συμβατική ακτινοβολία. Ομοίως, οι όγκοι που έχουν υψηλή GF και PS ανταποκρίνονται καλύτερα σε ειδικούς παράγοντες κυτταρικού κύκλου, όπως η Ara-C και η γεμισιταβίνη, ενώ αυτοί που έχουν χαμηλότερη πολλαπλασιαστική κατάσταση, ανταποκρίνονται καλύτερα σε ειδικούς παράγοντες μη κυτταρικού κύκλου, όπως η σισπλατίνη και η BCNU. Τέλος, GF και PS μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ασθενών, που θα λαμβάνουν το μέγιστο όφελος από τις νεότερες στρατηγικές θεραπείας του καρκίνου (π.χ., Polo-like κινάση, αναστολείς εξαρτώμενων από την κινάση της κυκλίνης και Chk-1), δεδομένου ότι αυτά τα φάρμακα στοχεύουν διάφορες πρωτεΐνες, που εκφράζονται σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται μέσα στον κυτταρικό κύκλο, αλλά τα δεν εκφράζονται σε αδρανή κύτταρα όγκου [Robert H. et al (2013)].

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο  $\sigma_2$  υποδοχέας, είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για τον καθορισμό της PS και GF συμπαγών όγκων, μέσα από τεχνικές απεικόνισης όπως PET και SPECT [Robert H. et al (2013)]. Χρησιμοποιώντας την καθιερωμένη διπλοειδή κυτταρική γραμμή αδενοκαρκινώματος του μαστού σε ποντίκια, οι Wheeler KT, et al (2000), έδειξαν ότι η συγκέντρωση των  $\sigma_2$  υποδοχέων σε πολλαπλασιαζόμενα 66P, είναι ~ 10 φορές μεγαλύτερη από αυτήν που παρατηρείται σε κατάσταση ηρεμίας σε κύτταρα 66Q (Εικόνα 19). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10, η συγκέντρωση των  $\sigma_2$  υποδοχέων σε 3-ημερών πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τόσο από την διπλοειδή 66 Q κυτταρική γραμμή όσο και από την ανευπλοειδή 67 Q κυτταρική γραμμή, βρέθηκε να είναι αρκετά υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνης που μετράται σε αδρανή κύτταρα, είτε την ημέρα 7<sup>η</sup> ή την 10<sup>η</sup> ημέρα.

Επιπλέον, από την μέτρια συγκέντρωση των  $\sigma_2$  υποδοχέων στα κύτταρα Q, έχει προταθεί ότι είναι εφικτή η απεικόνιση ενός συμπαγούς όγκου, που έχει ένα στατιστικά σημαντικό κλάσμα κυττάρων Q (δηλαδή, χαμηλή αναλογία P:Q), λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης των  $\sigma_2$  υποδοχέων στο περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό [Robert H. et al (2013)].



**Εικόνα 19:** [Robert H. et al (2013)], [Wheeler KT, et al (2000)]

Σε μια μεταγενέστερη μελέτη, η ίδια ομάδα ανέφερε πως η αυξομείωση της συγκέντρωσης των  $\sigma^2$  υποδοχέων, ακολουθεί τη μετάβαση των κυττάρων του μαστού σε ποντίκια, μεταξύ της P και Q κατάστασης. Επειδή χρειάζεται τουλάχιστον τρεις ημέρες για την μείωση της συγκέντρωσης των  $\sigma^2$  υποδοχέων, για να ολοκληρωθεί αυτό μια φορά, τα κύτταρα κάνουν την μετάβαση από την P στην Q κατάσταση, υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτός ο υποδοχέας, δεν εκφράζεται μόνο σε μία φάση του κυτταρικού κύκλου, όπως οι εξαρτώμενες από την κυκλίνη κινάσες και άλλες ειδικές πρωτεΐνες κυτταρικού κύκλου. Η παρατήρηση ότι ο λόγος P: Q της συγκέντρωσης των  $\sigma^2$  υποδοχέων σε συμπαγείς όγκους, είναι παρόμοια με εκείνης σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας, επαληθεύεται από τα αποτελέσματα σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας κυτταρικών γραμμών από καρκίνο του μαστού, ξενομοσχευμάτων συμπαγών όγκων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι ο  $\sigma^2$  υποδοχέας είναι ένας βιοδείκτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όγκους του μαστού. Ως εκ τούτου, ραδιοευαίσθητοι παράγοντες παρουσιάζουν μία υψηλή συνάφεια και εκλεκτικότητα για τους  $\sigma^2$  υποδοχείς, δίνοντας την δυνατότητα να αξιολογηθεί η PS και GF όγκων του μαστού στον άνθρωπο, με την χρήση μη επεμβατικών τεχνικών απεικόνισης όπως PET και SPECT. Είναι επίσης πιθανό, η προσέγγιση αυτή να μπορεί να επεκταθεί, για την αξιολόγηση της πολλαπλασιαστικής κατάστασης και άλλων όγκων στον άνθρωπο, όπως όγκοι της κεφαλής και τραχήλου, το μελάνωμα, και οι όγκοι του πνεύμονα, οι οποίοι είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση των  $\sigma^2$  υποδοχέων [Robert H. et al (2013)].

Η σχετικά υψηλή συγκέντρωση των  $\sigma^2$  υποδοχέων στα κύτταρα Q, υποδεικνύει επίσης ότι οι  $\sigma^2$ -εκλεκτικοί ραδιοευαίσθητοι παράγοντες, έχουν τη δυνατότητα να ξεχωρίσουν τους όγκους που βρίσκονται σε μια κατάσταση ηρεμίας, από την τελείως διαφορετική μορφή γήρανσης / ηρεμίας των φυσιολογικών ιστών. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά κύτταρα στοχεύουν τα P και όχι τα Q κύτταρα, η υψηλή συγκέντρωση των  $\sigma^2$  υποδοχέων στα κύτταρα Q, μπορεί επίσης να παρέχει μία μέθοδο για την απεικόνιση χημειοθεραπευτικά-ανθεκτικών τμημάτων ενός συμπαγούς όγκου. Ένα παράδειγμα όπου η εν λόγω στρατηγική απεικόνισης έχει χρησιμοποιηθεί, είναι σε ένα ζωικό μοντέλο καρκίνου του μαστού, που περιγράφεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω. [Robert H. et al (2013)]

## **Γ7. Οι $\sigma$ προσδέτες**

### **Γ7.1. Φαρμακολογική και θεραπευτική εκλεκτικότητα των σ1 προσδετών:**

Λαμβάνοντας υπόψη τις ευρείες επιπτώσεις της ενεργοποίησης των σ1 υποδοχέων, προκύπτει ένα σημαντικό ζήτημα σχετικά με την δυναμική στόχευση τους στη θεραπεία της νόσου. Στο MAM, ο σ1 μπορεί να έχει μόνο ένα περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών στόχων, που να αλληλεπιδρούν με την (π.χ. IP3R3). Ως εκ τούτου, επειδή ο σ1 μπορεί να είναι συνοδός του IP3R3, υπάρχει η δυνατότητα να αυξήσει την ροή των  $Ca^{2+}$  από το ΕΔ στα μιτοχόνδρια [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)], ώστε να αυξηθεί η παραγωγή ATP [Cardenas, C. et al. (2010)], αλλά και η βιοενεργητική στα κύτταρα, με την απλή προσθήκη σ1 αγωνιστή στο σύστημα.

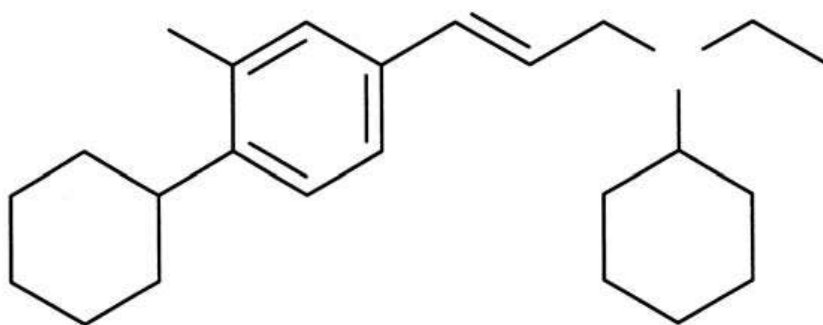
Ωστόσο, οι σ1 μετατοπίζονται, είτε με διέγερση του αγωνιστή ή με το έντονο στρες στο ΕΔ, και αλληλεπιδρούν με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες-στόχους. Αν αυτές οι πρωτεΐνες στόχοι σχετίζονται με ασθένειες, πώς μπορεί να είναι δυνατόν να ελέγχουν και την ιδιαιτερότητα των σ1, οι οποίοι σχετίζονται με την φαρμακοθεραπεία τους; Ίσως αυτή η εξειδίκευση μπορεί να επιτευχθεί λόγω της εγγενής φύσης του σ1 ως μοριακός συνοδός.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των μοριακών συνοδών είναι ότι ακόμα κι αν μπορούν να δεσμεύουν τις προσαρμοστικά σωστές πρωτεΐνες [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)], θα μπορούσαν να αυξήσουν τη συνάφεια τους και να ασκήσουν την συνοδό δραστηριότητά τους επί των πρωτεϊνών, μόνο όταν η πρωτεΐνη στόχος χωροδιατακτικά, είναι ανώμαλα διπλωμένη [Hayashi, T. and Su, T.P. (2007)] ή να είναι επιρρεπείς σ' αυτό, υπό ορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα κανάλια ιόντων-στόχοι, οι υποδοχείς ή οι κινάσες στην PM, θα μπορούσαν να επηρεάζονται από τους σ1 ή τους σ1 προσδέτες, μόνο επειδή είναι διαμορφωτικά ασταθής κάτω από πειραματικές συνθήκες, επιτρέποντας έτσι στους σ1 να ασκήσουν την ρύθμισή τους σε αυτές τις πρωτεΐνες. Με άλλα λόγια, υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, τα περισσότερα κανάλια ιόντων ή των υποδοχέων τους δεν επηρεάζονται από τους σ1 ή τους σ1 προσδέτες. Μόνο όταν από ασθένειες προκαλείται π.χ. γονιδιακή μετάλλαξη ή ενδοπρωτεϊνικό οξειδωτικό στρες, μπορεί συγκεκριμένα κανάλια ιόντων ή των υποδοχέων τους, να υποβοηθούνται από τους σ1 συνοδούς. Ως εκ τούτου, είναι δυνατόν η ίδια η φύση της ασθένειας να παρέχει την εκλεκτικότητα των σ1 στην φαρμακοθεραπεία. Η σ1-βασισόμενη φαρμακοθεραπεία θα μπορούσε να ωφελήσει ιδιαίτερα τους ασθενείς που πάσχουν από ασθένειες πρωτεϊνικής διάπλασης.

**Γ7.2. SR31747A, Περιφερικός εκλεκτικός προσδέτης των  $\sigma$  υποδοχέων ως αντικαρκινικός παράγοντας:** Ο SR31747A, N-cyclohexyl-N-ethyl-3-(3-chloro-4-cyclohexylphenyl) propen-2-ylamine hydrochloride (Εικόνα 20) είναι ένας περιφερικός εκλεκτικός στους  $\sigma$  υποδοχείς προσδέτης. Έχει διακριτές βιολογικές ιδιότητες σε σύγκριση με τους κλασικούς προσδέτες των  $\sigma$  υποδοχέων [(+)-3-PPP, pentazocine, DTG (1,3-di-o-tolylguanidine) ή αλλοπεριδόλη], και η σύνδεση στερείται οποιασδήποτε κεντρικής δραστηριότητας που σχετίζεται με τις λειτουργίες των  $\sigma$  υποδοχέων και τις βιολογικές δραστηριότητες που περιλαμβάνουν τόσο ανοσορρύθμιση όσο και αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [Casellas P, et al 2004].

Αρχικά ο SR31747A έχει κατασταλτικά αποτελέσματα επί ανοσολογικών αποκρίσεων, όπως φαίνεται in vivo σε διάφορα μοντέλα οξείας ή χρόνιας φλεγμονής. Για παράδειγμα, ο SR31747A προκαλεί συγκέντρωση και χρονοεξαρτώμενη αναστολή της πολλαπλασιαστικής απόκρισης σε μιτογόνες ενώσεις [όπως κονκαναβαλίνη A (concanavalin A), αλλογενή διέγερση ή οξική μυριστική φορβόλη (phorbol myristate acetate) συν ιντερλευκίνη (IL) -2] των λεμφοκυττάρων με  $IC_{50} = 20 \mu M$ , σε ποντίκια και στον άνθρωπο. Επιπλέον, το μόριο αναστέλλει την υπερευαισθησία καθυστερημένου τύπου σχηματισμού κοκκιώματος, που προκαλείται από μετουσιωμένη λευκωματίνη και προστατεύει τα ποντίκια από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) - ή από την σταφυλοκοκκική-εντεροτοξίνης B (SEB) επαγόμενη θνησιμότητα με  $ED_{50} = 20 \text{ mg / kg i.p.}$  [Casellas P, et al 2004].



**Εικόνα 20:** SR31747A [Casellas P, et al 2004].

Τέτοιες αμυντικές δραστηριότητες, οι οποίες διαφέρουν από εκείνες που έχουν παρατηρηθεί με την κυκλοσπορίνη A ή την δεξαμεθαζόνη, σχετίζονται με την διπλή αρχική επίδραση, η οποία καταγράφεται από τους SR31747A με την έκφραση των



προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονώδη κυτοκίνων. Πράγματι , η LPS- ή SEB-επαγόμενη έκφραση, του προ-φλεγμονώδη IL-2, IL-4 παράγοντα διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων μακροφάγων, IL-6 και του νεκρωτικού παράγοντα του όγκου – α (TNFα), μειώνεται κατά 2 έως 4 φορές σε SR31747A θεραπευόμενα πειραματόζωα σε σύγκριση με τους μάρτυρες , ενώ η αντιφλεγμονώδη IL -10 αποδέσμευση, είναι ταυτόχρονα επαγόμενη 2 –φορές. Όταν χορηγείται σε 20 mg / kg i.p. ή 40 mg / kg p.o. σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με αυτοάνοση αρθρίτιδα, ο SR31747A, βρέθηκε να περιορίζει σημαντικά την παθολογική ανάπτυξη και να μειώνει την συχνότητα εμφάνισης των κλινικών σημείων, εξαφανίζοντας ταχύτερα αυτά τα σημεία και μειώνοντας σημαντικά το οίδημα στα πόδια. Είναι σημαντικό ότι, η διπλή προκαλούμενη από τον SR31747A επίδραση, στην παραγωγή κυτοκίνης, παρατηρείται μόνο σε φλεγμονώδεις καταστάσεις , όχι σε κανονικές συνθήκες , και ο SR31747A δεν έχει άμεσο αποτέλεσμα στις χυμικές αποκρίσεις [Casellas P,et al 2004].

Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις ιδιότητες , ο SR31747A έχει εισέλθει σε μια κλινική φάση της ανάπτυξης για τη θεραπεία φλεγμονωδών διαταραχών και βρίσκεται στην Ια κλινική φάση για την ρευματοειδή αρθρίτιδα. Εκτός από τις ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις , το μόριο έχει ισχυρές in vitro και in vivo αντιπολλαπλασιαστικές δραστηριότητες κατά κυτταρικών σειρών διαφόρων όγκων σε μοντέλα ποντικών με ξενομοσχεύματα [Casellas P,et al 2004]. Βάσει αυτών, οι SR31747A παρουσιάζουν δυνητικό ενδιαφέρον ως αντικαρκινικός παράγοντας και ως εκ τούτου προς το παρόν δοκιμάζεται στον καρκίνο του προστάτη και βρίσκεται στην Φάσης ΙΙb κλινικών δοκιμών.

**Γ7.3. σ2 προσδέτες και καρκίνος παγκρέατος:** Οι συνθετικοί σ2 προσδέτες , προσφέρουν παρατεταμένη βιοδιαθεσιμότητα στον όγκο, όπως αποδεικνύεται από την απεικόνιση με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και εσωτερικεύονται ταχέως. Ως τέτοιοι, οι σ2 προσδέτες μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια νέα μοριακή πλατφόρμα για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος και άλλων καρκίνων. [Hornick JR et al., 2012].

**Γ7.4 Οι σ2 προσδέτες επάγουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα και ο πιθανός τους ρόλος ως αντικαρκινικοί παράγοντες:** Οι σ2 υποδοχείς έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στην ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, την μορφολογία και την διαφοροποίηση. Οι εκλεκτικοί σ2 προσδέτες, είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την

ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Πιστεύεται ότι οι  $\sigma 2$  αγωνιστές αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγουν την απόπτωση, ενώ ανταγωνιστές του  $\sigma 2$  υποδοχέα προάγουν την επιβίωση των κυττάρων του όγκου. Οι Vilner BJ, et al, (1995&2000) έδειξαν για πρώτη φορά ότι οι προσδέτες των  $\sigma$  υποδοχέων επιδρούν στην μορφολογία των C6 κυττάρων του γλοιώματος, αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, και προκαλούν τον κύτταρο θάνατο. Ο βαθμός της αναστολής της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, συσχετίζεται με την συνάφεια τους για τον  $\sigma 2$  υποδοχέα, και αυτή η αναστολή εμφανίζεται να εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωσή τους, όσο και του χρόνου δράσης τους. Οι Kashiwagi H, et al (2007) ανακάλυψαν ότι οι  $\sigma 2$  προσδέτες, ενεργοποιούν την δράση της κασπάσης-3 και εμφανίζουν μια συγκέντρωσο-εξαρτώμενη και χρονο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, ενώ ένας  $\sigma 1$  προσδέτης, η πενταζοκίνη, δεν έχει τέτοια επίδραση. Μέτρηση της πυκνότητας του DNA fragmentation (κατάτμησης), της αννεξίνης V, και της χρωματίνης, έδειξαν ότι αυτό το κυτταρικό αποπτωτικό γεγονός, βρίσκεται σε απόλυτη σχέση με την συνάφεια των επιμέρους συστατικών των  $\sigma 2$  υποδοχέων. Οι  $\sigma 2$  αγωνιστές, CB-64D και CB-184, προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, έναντι τόσο της φάρμακο-ευαίσθητης MCF-7 κυτταρικής γραμμής του όγκου, όσο και σε φαρμακο-ανθεκτικές κυτταρικές γραμμές όγκου όπως: MCF7 / ADR, SKBR3, T47D, ενώ επάγουν σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα την απόπτωση με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η σιραμεσίνη (Siramesine), ένας από τους πιο ισχυρούς εκλεκτικούς  $\sigma 2$  προσδέτες διαδραματίζει μια δυνητικά αντικαρκινική δράση, εναντίων διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών: 1) σε όγκους που προέρχονται από τον μαστό, 2) τον τράχηλο, 3) τον πνεύμονα, 4) τον προστάτη, 5) τους συνδετικούς ιστούς, 6) του ινοσαρκώματος και 7) τον καρκίνο του μαστού σε μοσχεύματα στα ποντίκια. Πιο πρόσφατα, οι Jonhede S, et al (2010), βρήκαν ότι η siramesine επάγει την κασπάσης-3 εξαρτώμενη απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα, παρουσιάζοντας μια πιθανή χρήση των  $\sigma 2$  προσδετών στην θεραπεία ή την πρόληψη οπίσθιας καψικής ορακification (κατιονικής σύνδεσης).

**Γ7.5. Προαποπτωτικοί μηχανισμοί από τους  $\sigma 2$  προσδέτες:** Αν και έχει παρατηρηθεί ότι  $\sigma 2$  υποδοχείς εκφράζονται έντονα σε πολλούς τύπους συμπαγών καρκινικών κυττάρων και οι  $\sigma 2$  προσδέτες επάγουν την απόπτωση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων του όγκου, ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται σε αυτή την προαποπτωτική δράση δεν είναι απολύτως σαφής. Έχει ενοχοποιηθεί ότι τα κανάλια ιόντων, η διακίνηση των ενδοκυττάρων ιόντων, η δράση μεταξύ των

πρωτεϊνών της μεμβράνης και των σχεδιασμών των λιπιδίων, το οξειδωτικό στρες, και οι κασπάσες, ίσως εμπλέκονται σε αυτόν τον μηχανισμό. Για παράδειγμα ο  $\sigma 2$  εκλεκτικός αγωνιστής, CB-64D, έχει παρατηρηθεί ότι ενισχύει την απελευθέρωση των ιόντων  $[Ca^{2+}]$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτό γίνεται μέσω της  $\sigma 2$  μεσολάβησης, που είναι δοσοεξαρτώμενη, και μπορεί να κατασταλεί από τους  $\sigma 2$  ανταγωνιστές. Παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων στους  $\sigma 2$  προσδέτες, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας και της ενίσχυσης της απελευθέρωσης των ιόντων  $[Ca^{2+}]$ , το οποίο ίσως αποτελεί το σήμα για την απόπτωση ή για άλλες συναφείς φαρμακολογικές δράσεις. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τον F281, έναν  $\sigma 2$  αγωνιστή, σε SK-N-SH κύτταρα, αλλά όχι και με τον PB28, έναν ισχυρό μη εκλεκτικό  $\sigma$  προσδέτη. Έτσι απαιτούνται εκτενέστερες μελέτες στην διαμόρφωση των ιόντων ασβεστίου, για να διευκρινισθεί αυτό το αποτέλεσμα.

Η πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και είναι βασική πρωτεΐνη στον αντικαρκινικό έλεγχο. Μεταλλάξεις στην p53 συνήθως οδηγούν σε καρκινική ανάπτυξη και προκαλούν αντίσταση σε φάρμακα στην αντικαρκινική θεραπεία. Το γεγονός ότι οι  $\sigma 2$  προσδέτες, CB-184 και CB-64D, εμφανίζουν παρόμοια αντικαρκινική δραστηριότητα εναντίον της κυτταρικής γραμμής όγκου MCF-7 με άγριου τύπου p53, και MCF-7 / adr-, SKBR3, και T47 D κυτταρικών γραμμών με μεταλλαγμένη την p53, αποδεικνύει ότι η p53 δεν αποτελεί κλειδί για την απόπτωση μέσω της μεσολάβησης των  $\sigma 2$  υποδοχέων.

Ο αναστολέας όλων των κασπασών, ZAVD-FMK, μπλοκάρει αισθητά την δοξορουβικινική απόπτωση, αλλά αδυνατεί να αναστείλει την από τους  $\sigma 2$  προσδέτες, CB-184 και CB -64D, επαγόμενη απόπτωση, υποδεικνύοντας ότι οι κασπάσες δεν είναι τα μόνα συστατικά του προαποπτωτικού μηχανισμού των  $\sigma 2$  υποδοχέων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με την siramesine που επάγει αποτελεσματικά την απόπτωση τόσο in vitro όσο και in vivo σε κύτταρα WEHI-S (σε ινοσάρκωμα σε ποντίκια) και σε κύτταρα MCF-7 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Αυτές οι αντικαρκινικές δράσεις είναι ανεξάρτητες των κασπασών, p53, Bcl-2, και του κυττοχρώματος c, αλλά επάγονται μέσω του οξειδωτικού στρες και της αθρόας λυσοσωματικής διαπερατότητας.

Οι  $\sigma 2$  εκλεκτικοί προσδέτες και ο SW43, βρέθηκε ότι επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω αύξησης της διαπερατότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης και του κυτταρικού οξειδωτικού στρες, αλλά είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Από την άλλη πλευρά, ορισμένοι άλλοι  $\sigma 2$

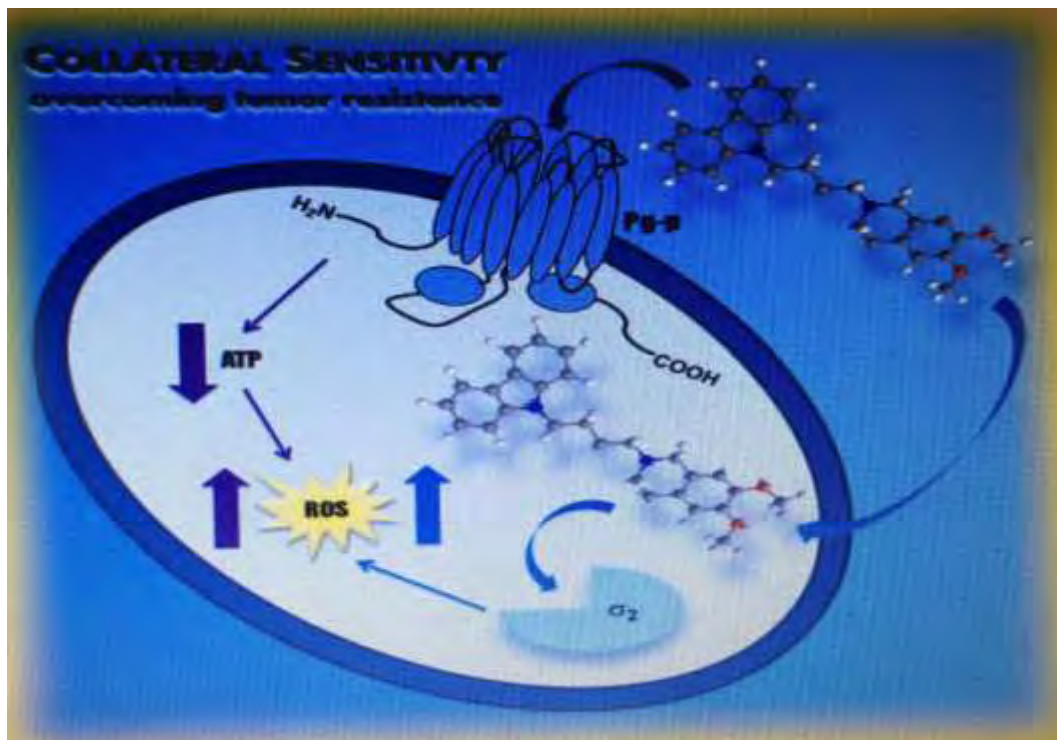
εκλεκτικοί προσδέτες όπως: WC26, SV119, και RHM -138, φάνηκε ότι παρουσιάζουν την αντικαρκινική τους δράση μέσω της αύξησης της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 (το ZAVD-FMK μπλοκάρει την κατάσπαση του DNA-fragmentation και την κυτταροτοξικότητα), προκαλώντας την αυτοφαγία, και μειώνοντας την δραστηριότητα του mTOR μονοπατιού (στόχος στα θηλαστικά της ραπαμυκίνης). Ως εκ τούτου, ίσως ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην από τους  $\sigma 2$  προσδέτες επαγόμενη απόπτωση, να αποτελείται από μονοπάτια πολλαπλής σηματοδότησης [Huang YS, et al. (2014)].

## **Γ8. Κυτταροτοξικότητα**

**Γ8.1. Οι  $\sigma 2$  προσδέτες δεν είναι επιβλαβής για τους φυσιολογικούς ιστούς:** Έχει δειχθεί ότι οι  $\sigma 2$  υποδοχείς πιθανόν εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των κυττάρων, την μορφολογία, την επιβίωση, και την ανάπτυξη. Δεδομένα ερευνών επίσης, καταδεικνύουν ότι οι  $\sigma 2$  προσδέτες παρουσιάζουν ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική και προαποπτωτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων, αλλά δεν έχουν καμία τοξική δράση στα κανονικά κύτταρα. Οι Kashiwagi H, et al (2007) μελέτησαν τον  $\sigma 2$  εκλεκτικό προσδέτη WC26, και βρήκαν ότι αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη ένωση για την διαγνωστική απεικόνιση, καθώς και έναν ισχυρό αντικαρκινικό παράγοντα. Πιο ειδικά, μελέτησαν ότι αυτός ο  $\sigma 2$  προσδέτης, ήταν τοξικός για τα καρκινικά κύτταρα, αλλά δεν είχε καμία ή πολύ ελάχιστη τοξικότητα στους φυσιολογικούς ιστούς, όπως αποδεικνύεται από τη μέτρηση του ποσοστού απόπτωσης (η δράση της κασπάσης-3) σε πολλούς οργανικούς ιστούς, την βιολογική ανάλυση του πλάσματος, την ανοσοϊστοχημεία, και τη φυσιολογική συμπεριφορά των μοντέλων. Σε ξεχωριστές έρευνες με SV119, η ίδια ομάδα διαπίστωσε ότι ανέστειλε τόσο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, όσο και την ανάπτυξη του όγκου σε ποντίκια, ενώ ενίσχυε την αποπτωτική δραστηριότητα της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης, χωρίς να υπάρχει απόδειξη κυτταρολογικής ή βιοχημικής συστηματικής τοξικότητας. Σε μια άλλη μελέτη, από τους Hornick JR et al, (2010) με  $\sigma 2$  εκλεκτικούς προσδέτες SV119, SW43, και siramesine, βρέθηκε ότι αυτοί οι προσδέτες είχαν εξαιρετική προαποπτωτική δραστηριότητα, ενίσχυαν την αντικαρκινική δράση της γεμισιταβίνης, αλλά χωρίς αισθητή τοξικότητα. Μια πιο πρόσφατη μελέτη με SV119-Bim, [Spitzeran D et al (2012)], απέδειξε ότι αυτοί οι  $\sigma 2$  προσδέτες εκδήλωναν πολύ μικρή και όχι μόνιμη τοξικότητα, όπως παρουσιάζεται από την αύξηση των επιπέδων της

κασπάσης-3, της αμυλάσης, και της ενεργοποίησης της λιπάσης στο πάγκρεας, αλλά αυτές οι αυξημένες δραστηριότητες των ενζύμων εξαφανίζονταν 2 εβδομάδες μετά την θεραπεία, χωρίς μεγάλη ή μικροσκοπική βλάβη. Τέλος, η  $\sigma 2$  εκλεκτική σιραμικίνη (siramesine), κλινικά απέτυχε ως αγχολυτικό και αντικαταθλιπτικό φάρμακο, αλλά κλινικές μελέτες και εργαστηριακά δεδομένα έδειξαν ότι αυτή η ένωση είναι ασφαλής, μη τοξική, και καλά ανεκτή στον άνθρωπο και σε ποντίκια [Spitzeran D et al (2012)].

## Γ9. Τελικές υποθέσεις και προοπτικές για τη θεραπεία του καρκίνου



1. **Εικόνα 21:** Το καρβοξυλικό άκρο αντιδρά τόσο με την P-γλυκοπρωτεΐνη όσο και με τον  $\sigma 2$  υποδοχέα. Μέσα από αυτές τις συνδυασμένες δραστηριότητες, ένας άσκοπος κύκλος του ATP ενεργοποιείται ενώ παράγονται (ROS). Η ενισχυμένη αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση παρατηρήθηκε σε πρότυπα κυττάρων MCF 7, ανθεκτικά στα φάρμακα. Το φαινόμενο αυτό, που ονομάζεται εξασφάλιση ευαισθησίας (collateral sensitivity), είναι υπό μελέτη σε ανθεκτικούς όγκους σε πολλά φάρμακα, και το σύμπλοκο, υποστρώματα  $\sigma 2$  αγωνιστών / P-gr αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία στους όγκους αυτούς [Niso M, et al 2013]

Για την παραγωγή δύο βιώσιμων θυγατρικών κυττάρων κατά τη μίτωση, ένα κύτταρο πρέπει να αντιγράψει όλα τα κυτταρικά συστατικά του, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανών, οργανιδίων, πρωτεϊνών, και νουκλεϊκά οξέα. Η ανάγκη αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα άκρως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα όπως τα καρκινικά. Αντί να καταφεύγουν σε μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν κυρίως την αερόβια γλυκόλυση, ένα φαινόμενο που ονομάζεται το « 'Warburg' » ώστε να παράξουν την ενέργεια που απαιτείται υπό

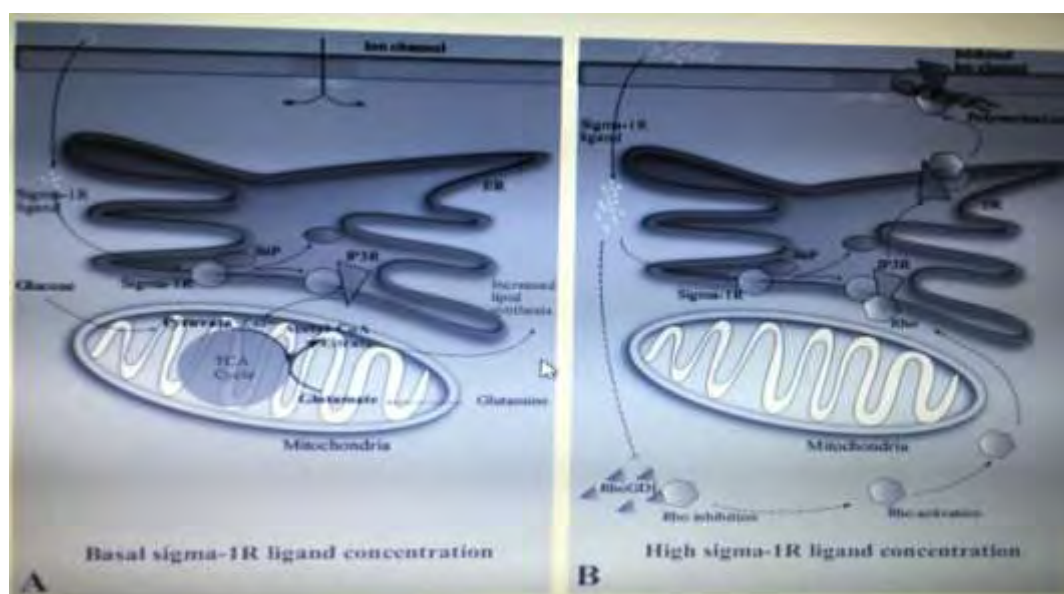
την μορφή ATP για τις κυτταρικές τους διαδικασίες που είναι ήδη αυξημένες [Véronique Megalizzi et al.(2012)]. Επιπλέον, με βάση μια μελέτη από DeBerardinis RJet al.(2007), αποδείχτηκε πώς η γλυκόλυση, η οξειδωτική φωσφορλίωση, το μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης, και ο μεταβολισμός της γλουταμίνης, διασυνδέονται σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα για την παραγωγή των λιπαρών και τα νουκλεϊκών οξέων, που απαιτούνται για την νουκλεοτίδιο- και λιπίδιο- σύνθεση.

Με αυτές τις διαδικασίες, τα καρκινικά κύτταρα έχουν μικρή μόνο εξάρτηση από την μιτοχονδριακή παραγωγή ATP και έτσι ανακατευθύνουν τον βρόγχο του καταβολισμού της γλουταμίνης του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA,) για την παραγωγή των λιπαρών και νουκλεϊκών οξέων. Για παράδειγμα, τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος μετατρέπουν το 90% της γλυκόζης και το 60% της γλουταμίνης για τις απαιτήσεις τους με την αερόβια γλυκόλυση και τον μιτοχονδριακό κύκλο TCA,αντιστοίχως. Οι μηχανισμοί αυτοί αντιπροσωπεύουν μια αποδοτική διαδικασία για την παραγωγή της υψηλής ποσότητας βιομάζας που απαιτείται από τα διαρκώς πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, ιδιαίτερα σε φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, και χοληστερίνη που σχηματίζουν το κύτταρο και τα οργανίδια των μεμβρανών.

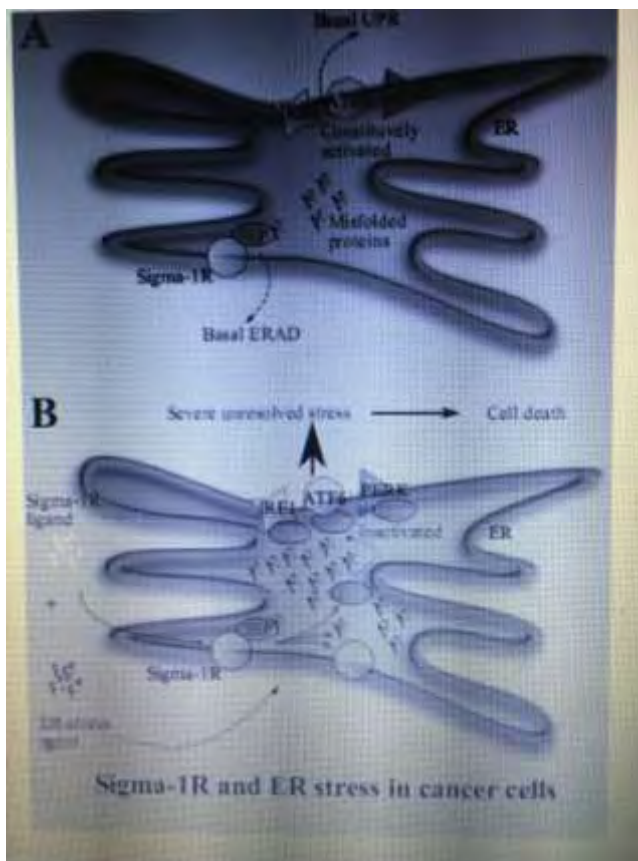
Σε αυτό το πλαίσιο, εμπλέκονται οι σ υποδοχείς, στην ρύθμιση της σφιγγομυελίνης, του γλυκοζυλ-κεραμιδίου, και της χοληστερόλης [Véronique Megalizzi et al.(2012)]. Θα μπορούσε έτσι να υποτεθεί ότι η υπερέκφραση των σ υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα είναι χρήσιμη κυρίως για την υψηλή παραγωγή λιπιδίων που απαιτείται για το σχηματισμό της πλασματικής μεμβράνης, στα έντονα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 22Α). Επιπλέον, μια απορρύθμιση της κανονικής σύνθεσης των λιπιδίων από τους σ1 προσδέτες σε έντονα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, θα παρέμβαινε και στην κυτταρική διαίρεση, όπως προτείνεται , και ότι τουλάχιστον έτσι οι σ1 προσδέτες (αγωνιστές ή ανταγωνιστές) μεταβάλλουν έντονα τη μιτωτική διαδικασία στα καρκινικά κύτταρα σε γλοίωμα, ανεξάρτητα από το επίπεδο της έκφρασης των σ1 υποδοχέων. Αντιστρόφως, ασθενώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπως οι κοκκιωματώδης νευρώνες της παρεγκεφαλίδας, ενώ είναι πλούσιοι σε θέσεις σ1 υποδοχέων, δεν εμφανίζουν καμία ευαισθησία στον ανταγωνιστή των σ1 IPAG, σε αντίθεση με τα εντόνως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του όγκου.

Όσον αφορά την θεραπεία του καρκίνου, γίνονται υποθέσεις ότι τα υψηλά επίπεδα των προσδετών των σ υποδοχέων, μπορεί να επάγουν [Véronique Megalizzi et al.(2012)] μια δραστική μείωση της έκφρασης του ρυθμιστή της οικογένειας rho την

πρωτεΐνης G - RhoGDI (modulator of family G proteins- RhoGDI) , η οποία επιτρέπει την ενεργοποίηση της Rho ΟΤΡάσης που απαιτείται για την μετάθεση των συμπλόκων σ1 / IP3R3 και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ροής των ιόντων, κυρίως του  $Ca^{2+}$  (Εικόνα 22B), και μια ταυτόχρονη απορρύθμιση της οδού βιοσύνθεσης του κεραμιδικού. Αυτές οι δύο επιδράσεις, συμβάλλουν στη διάσπαση της σύνθεσης των λιπιδίων, των κύριων συστατικών της μεμβράνης (όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, και χοληστερίνη), που οδηγεί σε διακοπή της μίτωσης των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν τους σ υποδοχείς. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν επίσης εξηγούν την ευαισθητοποίηση των σ1 υποδοχέων που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα σε ER-στρεσογόνους παράγοντες (Εικόνα 23).



**Εικόνα 22:** [Véronique Megalizzi et al.(2012)]

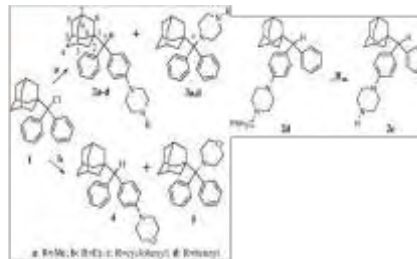
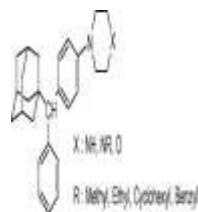


**Εικόνα 23:** [Véronique Megalizzi et al.(2012)]

## Γ10. Τελικές Παρατηρήσεις

**Γ10.1 Τα ανάλογα της αδαμαντίνης (adamantine derivatives): ένας νέος σ προσδέτης με αντικαρκινική δράση:** Μελέτες με την Κλασική SAR έδειξαν ότι η παρουσία ενός κυκλικού αλκυλίου ή αρυλίου που συνδέονται με το κατιονικό κέντρο της αμίνης, μέσω ενός προσδέτη με 3 έως 5-μελή αλυσίδα (συμπεριλαμβανομένου ενός ετεροατόμου), είναι απαραίτητη για την συνάφεια στους σ-υποδοχείς. Ο σ1 παρουσιάζει προτίμηση να προσδένεται, (με μια συνάφεια που είναι από 40 έως από 3000 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τον σ2), με τα ανάλογα 2a-c και 2e, που έχουν μια αξιοσημείωτη συνάφεια πρόσδεσης για τον σ1 και σ2-υποδοχείς και επίσης την θέση 2 των καναλιών  $\text{Na}^+$  (Εικόνα 24). Το βενζυλο-2d παράγωγο δείχνει μία πολύ χαμηλότερη συνάφεια για σ1-υποδοχείς και τους διαύλους  $\text{Na}^+$ . Καμία από αυτές τις αλληλεπιδράσεις δεν παρατηρούνται στην περίπτωση του αναλόγου μορφολίνης 4. Αυτή η διαφορά στη δραστηριότητα των 2a-e και του 4 μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία του δεύτερου πιπεραζινικού άζωτο στις 2a-e (Εικόνα 24-26).



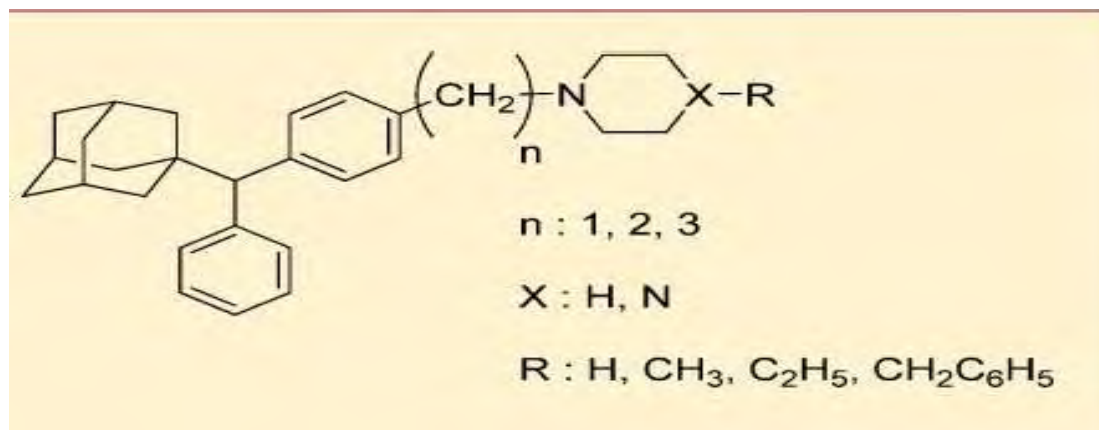


**Table 2**

Affinities of the adamantane piperazines **2** for the  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$ -receptors

Compound	$\sigma_1$ IC <sub>50</sub> ± SEM (nM)	IC <sub>50</sub> ± SEM (nM)	$\sigma_1/\sigma_2$	Na <sup>+</sup> Channels IC <sub>50</sub> ± SEM (μM)
<b>2a</b>	3.2 ± 0.7	37.6 ± 9.3	11.8	1.2 ± 0.15
<b>2b</b>	2.9 ± 0.6	4.0 ± 2.8	1.4	0.7 ± 0.1
<b>2c</b>	0.27 ± 0.2	97.0 ± 36.0	360	0.7 ± 0.1
<b>2d</b>	63.3 ± 18.9	119.0 ± 44.0	1.9	1.6 ± 0.5
<b>2e</b>	12.4 ± 2.3	>1000		1.2 ± 0.2
<b>4</b>	>100	>1000		>10.0

**Εικόνα 24:** C1-υποκατάστατα της αδαμαντίνης (substituted adamantanes) (N-{4-[a-(1-adamantyl)benzyl]phenyl}piperazines) που δείχνουν μια εκλεκτικότητα πρόσδεσης στους  $\sigma_1$  υποδοχείς



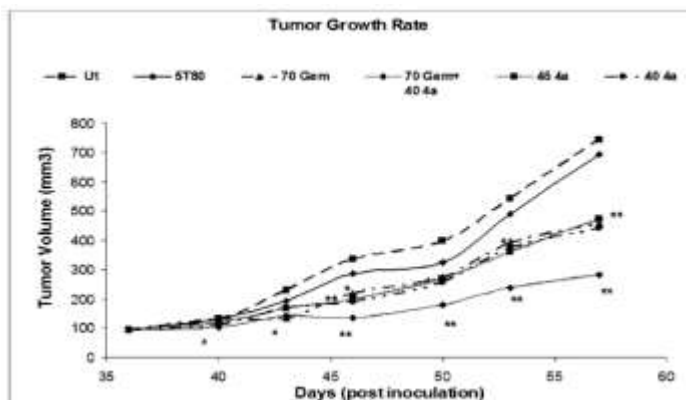
**BxPC3 xenografts**

**Table 1. Affinities of Some Adamantane Phenylalkylamines for the  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  Receptors**

compd	IC <sub>50</sub> ± SEM (nM) (n = 3)			IC <sub>50</sub> ± SEM (nM) (n = 3) Na <sup>+</sup> channels
	$\sigma_1$	$\sigma_2$	$\sigma_1/\sigma_2$	
2a	5.2 ± 1.3	110.4 ± 13.1	21.2	nd <sup>a</sup>
3a	2.9 ± 0.7	80.1 ± 9.4	27.6	nd <sup>a</sup>
4a	48.1 ± 17.7	85.0 ± 18.3	1.77	>1000
4c	36.1 ± 8.3	28.3 ± 7.2	0.78	11.5 ± 7.0
4d	42.0 ± 21.0	461.4 ± 141.7	11.0	>1000
4e	12.3 ± 4.2	13.0 ± 3.9	1.06	>100

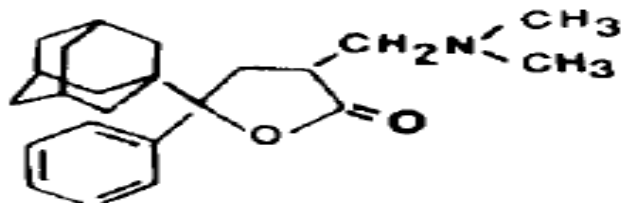
<sup>a</sup>nd: not determined.

Post mortem weight		
	Average weight (mg)±SE	% reduction
Ut	819 ± 295	
5T80	862±198	
70 Gem	507±199	38.14**
45 4a	541±247	37.18**
40 4a	674±211	21.81**
70 Gem+ 40 4a	335±165	61.10**



Ut; untreated mice 5T80;  
mice treated with 5% Tween 80 70Gem;  
mice treated with 70 mg/kg Gem Q4D345 4a;  
mice treated with 45 mg/kg (3 consecutive days  
per wk/3wks) 40 4a;  
mice treated with 40 mg/kg (3 consecutive days  
per wk/3wks) 70Gem + 40 4a;  
Coadministration of 70 mg/kg Gem and  
40mg/kg 4

**Εικόνα 25:** Οι νέες αδαμαντίνο-φαινυλακυλαμίνες, προσδεδεμένες με τον σ υποδοχέα. Η συνάφεια πρόσδεσης τους και η αντικαρκινική τους δράση [Riganas et al., 2012, Riganas et al., 2012, Riganas et al., 2012].



**Εικόνα 26:** 5-(Tricyclo[3,3,1,1<sup>3,7</sup>]dec-1-yl)-dihydro-3-(dimethylamino-methyl)-5-phenylfuran-2(3H)-one - high affinity for  $\sigma_1$  (nanomolar) - moderate affinity for  $\sigma_2$  (micromolar). Adamantane aminolactone C7 induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells

## Γ10.2 Παρατηρήσεις

Οι  $\sigma$  υποδοχείς ίσως εμπλέκονται, στην ρύθμιση της σφιγγομυελίνης, του γλυκοζυλκεραμιδίου, και της χοληστερόλης [Véronique Megalizzi et al.(2012)]. Θα μπορούσε έτσι να υποτεθεί ότι η υπερέκφραση των  $\sigma$  υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα είναι χρήσιμη κυρίως για την υψηλή παραγωγή λιπιδίων που απαιτείται για το σχηματισμό της πλασματικής μεμβράνης, στα έντονα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα

Τα κανάλια ιόντων-στόχοι, και οι υποδοχείς ή οι κινάσες στην PM, θα μπορούσαν να επηρεάζονται από τους  $\sigma_1$  υποδοχείς ή τους  $\sigma_1$  προσδέτες, επειδή είναι διαμορφωτικά ασταθής, όχι υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά σε καταστάσεις όπως π.χ. γονιδιακή μετάλλαξη ή ενδοπρωτεϊνικό οξειδωτικό στρες, και συγκεκριμένα κανάλια ιόντων ή των υποδοχέων τους, ίσως υποβοηθούνται από τους  $\sigma_1$  συνοδούς.

Οι  $\sigma_1$  μετατοπίζονται, είτε με την διέγερση του αγωνιστή ή με το έντονο στρες στο ΕΔ, και αλληλεπιδρούν με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες-στόχους. Αν όμως, αυτές οι πρωτεΐνες στόχοι σχετίζονται με ασθένειες, πώς μπορεί να είναι δυνατόν να ελέγχουν και την ιδιαιτερότητα των  $\sigma_1$ , οι οποίοι σχετίζονται με την φαρμακοθεραπεία τους; Ίσως αυτή η εξειδίκευση μπορεί να επιτυγχάνεται, λόγω της εγγενής φύσης του  $\sigma_1$  υποδοχέα ως μοριακός συνοδός.

Αν και τα ακριβή μοριακά χαρακτηριστικά του  $\sigma_2$  υποδοχέα δεν είναι σαφή, συντριπτικά δεδομένα έχουν δείξει ότι αυτός ο υποδοχέας είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη και μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής μορφολογίας, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, και την διείσδυση. Η υψηλή έκφραση αυτού του υποδοχέα σε πολλαπλασιαστικά καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά και τα αδρανή κύτταρα, αποδεικνύει ότι οι  $\sigma_2$  υποδοχείς αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες της καρκινικής εξαλλαγής και ανάπτυξης. Έτσι αυτοί οι

υποδοχείς, είναι οι ιδανικοί μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη παραγόντων, που θα βοηθούν στην απεικόνιση των όγκων και ως εκ τούτου, έχουν γίνει την τελευταία δεκαετία, μια πολλή καυτή περιοχή έρευνας, ιδιαίτερα σαν βιοδείκτες για την απεικόνιση του καρκίνου. Πάρα πολύ  $\sigma_2$  προσδέτες που έχουν την δυνατότητα να απεικονίζονται σε PET και SPECT, έχουν αναπτυχθεί και ορισμένοι παρουσιάζουν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα .

Οι προ-αποπτωτικές δραστηριότητες των  $\sigma_2$  προσδετών επίσης, μπορεί να είναι χρήσιμες για την διαχείριση του καρκίνου. Αν και ορισμένα ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι οι  $\sigma_2$  αγωνιστές αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ οι  $\sigma_2$  ανταγωνιστές επάγουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Αλλά, ο ακριβής τρόπος ταξινόμησης των αγωνιστών και των ανταγωνιστών δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Η ανάπτυξη εκλεκτικών  $\sigma_2$  προσδετών συνεχίζει να αποτελεί το 'goal standard' για πολλές προσπάθειες και παραμένει μεγάλη πρόκληση.

Όλοι οι  $\sigma_2$  προσδέτες που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις διαρθρωτικές κατηγορίες και μερικές με ακραίες τιμές όπως των αναλόγων της 6,7-δυμεθόξυ-τετρα-υδρο-ισο-κουινολ-ίνη, έχουν γίνει οι πιο εκλεκτικοί και ευρέως μελετημένοι  $\sigma_2$  προσδέτες. Βασισμένο στα δομικά χαρακτηριστικά, παρουσιάστηκε ένα υποθετικό μοντέλο πρόσδεσης, που έχει έναν τρίτο υδρόφοβο θύλακα, πράγμα που λείπει από την θέση πρόσδεσης των  $\sigma_1$  υποδοχέων [Huang YS, et al. (2014)].

Η ανακάλυψη της σχέσης μεταξύ του  $\sigma_2$  υποδοχέα και της πρωτεΐνης PGRMC1 μπορεί τελικά να αποκαλύψει την ταυτότητα και τα χαρακτηριστικά αυτού του μυστήριου υποδοχέα. Επειδή η PGRMC1 πρωτεΐνη έχει αντιαποπτωτική και προ-ογκογόνο δράση, ενώ η αναστολή της έχει προ-αποπτωτική και αντι-ογκογόνο δράση, έχει προταθεί ότι και η αναστολή του  $\sigma_2$  υποδοχέα από τους  $\sigma_2$  προσδέτες, έχει επίσης αντι-ογκογόνο και προαποπτωτική επίδραση.

Με βάση ορισμένες πρόσφατες μελέτες, έχει υποτεθεί ότι ο  $\sigma_2$  υποδοχέας διεγείρει την σηματοδότηση του EGFR, που μπορεί να είναι το κυριότερο καρκινογόνο μονοπάτι αυτού του υποδοχέα. Επιπλέον, ενεργοποιεί επίσης το P450 και προωθεί την σηματοδότηση της στερόλης, όπου επίσης μπορεί να είναι προ-ογκογόνα στάδια. Η αναστολή του  $\sigma_2$  υποδοχέα από τον  $\sigma_2$  προσδέτη, μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι της κασπάσης και να αναστείλει την σηματοδότηση EGFR μονοπατιού.

## **Δ. Επίλογος-Συμπεράσματα- Προοπτικές**

Κατά τις τελευταίες δύο με τρεις δεκαετίες, έχει σημειωθεί σημαντική έρευνα για τους σ1 προσδέτες και την δραστικότητα δέσμευσης τους. Με την κλωνοποίηση του σ1 υποδοχέα το 1996 [Hanner, M. et al. (1996)], την ανάπτυξη των σ1 σε ΚΟ στα ποντίκια το 2003 [Wilke, R.A. et al. (1999)], καθώς και τα φαρμακολογικά ευρήματα, το πεδίο έχει προετοιμαστεί, ώστε να διευκρινιστεί, μεταξύ των οργανιδίων σηματοδότησης, η ιδιότητα του σ1 στην κυτταρική ομοιόσταση και τις φυσιολογικές λειτουργίες.

Τα κανάλια ιόντων έχουν ενσωματωθεί στις κύριες κυτταρικές διεργασίες που εξηγούν τα χαρακτηριστικά του καρκίνου: όγκοι συχνά εκφράζουν κανάλια ιόντων και μεταφορείς που απουσιάζουν από τον αντίστοιχο ιστό. Πιστεύεται ότι αυτά τα κανάλια και οι μεταφορείς, ενισχύουν την ικανότητα του κυττάρου να προσαρμοστεί στις μεταβολικές συνθήκες που συναντώνται μέσα στον ιστό του όγκου (χαμηλό pH και PO<sub>2</sub>, την κακή παροχή θρεπτικών συστατικών, κλπ...) [Wulff et al., 2009; Prevarskaya et al., 2010; Arcangeli, 2011]. Ως εκ τούτου, πρωτεϊνικοί μεταφορείς, συμμετέχουν στην αντίδραση της προσαρμογής των καρκινικών κύτταρων σε στρεσογόνο περιβάλλον, πράγμα που τους προσδίδει μεγαλύτερη επιθετικότητα.

**Συμπεράσματα:** Ο σ2 υποδοχέας συνεχίζει να είναι ένας σημαντικός μοριακός στόχος στον τομέα της βιολογίας των όγκων. Η υψηλή έκφραση αυτού του υποδοχέα στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα έναντι αυτών που βρίσκονται σε ηρεμία, υποδεικνύει ότι αποτελεί έναν σημαντικό κλινικό βιοδείκτη για τον προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής κατάστασης των συμπαγών όγκων, χρησιμοποιώντας την λειτουργική τεχνική απεικόνισης PET.

Δεδομένου ότι εκλεκτικοί σ2 προσδέτες μπορούν να εξουδετερώσουν τον όγκο, μέσω των δύο αποπτωτικών και μη-αποπτωτικών οδών, προτείνεται επίσης ότι αυτός ο υποδοχέας είναι ένας πιθανός στόχος στον καρκίνο με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

Η αναγνώριση ότι η θεωρούμενη θέση πρόσδεσης του σ2 υποδοχέα βρίσκεται μέσα στο συγκρότημα της PGRMC1 πρωτεΐνης, είναι σημαντική για πολλούς λόγους. Πρώτον, παρέχει μια σύνδεση μεταξύ των μελετών σύνδεσης υποδοχέα χρησιμοποιώντας σ2 ραδιοσημασμένων προσδετών και μια γνωστή πρωτεΐνη, την PGRMC1, η οποία έχει επικυρωθεί ως βιοδείκτης του καρκίνου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δεύτερον, παρέχει ένα γονίδιο του οποίου η έκφραση μπορεί να εξεταστεί σε ένα ευρύ πάνελ καρκινικών κυττάρων. Οι γενετικές μεταλλάξεις και ο

μονο-νουκλεοτιδιακός πολυμορφισμός του PGRMC1, μπορούν επίσης να εξεταστούν εύκολα, για την αξιολόγηση των πιθανών ρόλων του γονιδίου αυτού, στην φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και στον κακοήγη μετασχηματισμό. Τα διαμορφωτικά-εύκαμπτα των αναλόγων του βενζαμιδίου με ένα τμήμα της ομάδας 4-άνθρακα, έχουν αποδειχθεί ότι είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία σ2-εκλεκτικών ενώσεων, για την παρασκευή των ραδιοσημασμένων ανιχνευτών, και για την απεικόνιση αυτού του υποδοχέα τόσο in vitro όσο και in vivo. [Robert H. et al (2013)]. Τέλος, τα αποτελέσματα που αναφέρονται παρέχουν μια σημαντική επιστημονική γέφυρα μεταξύ του σ2 υποδοχέα και του PGRMC1, και κάνουν διαθέσιμη μια μεγάλη γκάμα ραδιοσημασμένων προσδετών, φθορίζόντων ανιχνευτών και των δυνητικών μικρομοριακών προσδετών, ώστε να μελετηθεί το σύμπλοκο σ2 υποδοχέα /PGRMC1 σε συμπαγείς όγκους και καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία πειραματικών τεχνικών. Το επόμενο και εξίσου ουσιαστικό βήμα στην εξέλιξη του σ2 υποδοχέα είναι η απόδειξη ότι τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα που παράγονται σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου, μπορούν να μεταφερθούν στη διάγνωση και τη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο.

**Επίλογος και Προοπτικές:** Εν κατακλείδι, οι σ υποδοχείς παίζουν ένα ρόλο σε ένα πλήθος κυτταρικών λειτουργιών που εκδηλώνει την παθολογική συμμετοχή τους. Η ανάμειξη των σ υποδοχέων στην κυτταρική παθοφυσιολογία του καρκίνου, προκύπτει από την υψηλή συγκέντρωση σ1 και σ2 θέσεων δέσμευσης που παρατηρούνται σε διάφορες κυτταρικές σειρές όγκων και ιστών. Κατά συνέπεια, τα σ φάρμακα/ουσίες, έχει προταθεί ότι είναι δυνητικά χρήσιμοι παράγοντες απεικόνισης ενός όγκου. Η ικανότητα των σ2 φαρμάκων να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω μηχανισμών που πιθανόν εμπλέκουν την απόπτωση, το ενδοκυττάριο  $Ca^{2+}$  και τα σφυγγολιπίδια, έχει διερευνηθεί, και τέτοια ευρήματα μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη σ φαρμάκων όπως οι καρκινικοί θεραπευτικοί παράγοντες. Είναι πιθανό ότι η αύξηση της έκφρασης των σ2 υποδοχέων, να αποτελεί ένα σημαντικό γεγονός στην διαφοροποίηση ενός υγιούς, σε κακοήθες κύτταρο, αν και απαιτούνται πρόσθετες λεπτομερείς μελέτες.

Αξιοσημείωτο θα ήταν επίσης να προσδιοριστεί εάν στην μετάσταση (μια πολλαπλών σταδίων διαδικασία της οποίας ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αποτελεί ένα μέρος της) εμπλέκονται οι σ υποδοχείς, καθώς και σε άλλες μεταστατικές κυτταρικές συμπεριφορές όπως, η προσκόλληση, η έκκριση, η κινητικότητα, και η διείδυση. Το προτεινόμενο μοριακό μοντέλο των σ1 υποδοχέων (Εικ. 3), είναι πολύτιμο για την

κατανόηση των κυτταρικών τους λειτουργιών και θα μπορούσε ίσως να διευκολύνει τον προσδιορισμό της μοριακής βάσης του υποδοχέα  $\sigma_2$ . Η φύση των ενδογενών προσδετών των  $\sigma$  υποδοχέων, αποτελεί επίσης ένα σημαντικό ζήτημα που αναμένει διευκρινίσεις. Είναι πολύ πιθανό ότι οι  $\sigma$  υποδοχείς δεν αποτελούν έναν "κλασικό" υποδοχέα προσδέτη-πύλης. Είναι δελεαστική η υπόθεση ότι οι  $\sigma$  υποδοχείς θα μπορούσαν να είναι βοηθητικές υπομονάδες για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορους τομείς κυτταρικών λειτουργιών, όπως φαίνεται για τα κανάλια Kv [Aydar E, et al (2002)].

Μια απόλυτη πρόκληση για την έρευνα στον τομέα αυτό είναι να δημιουργηθεί ένα ενοποιημένο μοντέλο για την περιγραφή των μοριακών μηχανισμών των  $\sigma$  υποδοχέων, όπου θα περιλαμβάνει τον γνωστό βιολογικό και παθοφυσιολογικό τους ρόλο.

Μόνο μια λεπτομερή μοριακή διερεύνηση της δράση του  $\sigma$  υποδοχέα, θα βοηθήσει στην κατανόηση της συμμετοχής τους στην βιολογία του καρκίνου και, ενδεχομένως, στον σχεδιασμό ή να την ανακάλυψη νέων παραγόντων των  $\sigma$  υποδοχέων, οι οποίοι να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως διαγνωστικοί ή / και θεραπευτικοί παράγοντες στην διαχείριση του καρκίνου.

## E. Βιβλιογραφία

- 1) Ablordeppey, S.Y. et al. (2000) Is a nitrogen atom an important pharmacophoric element in sigma ligand binding? *Bioorg. Med.Chem.* 8, 2105–2111
- 2) Ahmed IS, et al (2010).Progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1): a heme-1 domain protein that promotes tumorigenesis and is inhibited by a small molecule. *J Pharmacol Exp Ther*;333:564-73
- 3) Ajmo, C.T., Jr et al. (2006) Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr. Neurovasc. Res.* 3, 89–98

- 4) Anderson, T.R. and Andrew, R.D. (2002) Spreading depression: imaging and blockade in the rat neocortical brain slice. *J. Neurophysiol.* 88, 2713–2725
- 5) Arcangeli, A. (2011). Ion channels and transporters in cancer. 3. Ion channels in the tumor cell-microenvironment cross talk. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C762–C771. doi: 10.1152/ajpcell.00113.2011
- 6) Aydar E, et al. (2002) Sigma receptor as a ligand-modulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* 34:399–410.
- 7) Aydar, E., et al (2006). The expression and functional characterization of sigma (sigma)1 receptors in breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* 242, 245–257. doi:10.1016/j.canlet.2005. 11.011
- 8) Balasuriya, D., et al. (2012). The sigma-1 receptor binds to the Nav1.5 voltage-gated Na<sup>+</sup> channel 4-fold symmetry. *J. Biol. Chem.* 287, 37021–37029. doi: 10.1074/jbc.M112.382077
- 9) Berardi F, et al (2009). Exploring the importance of piperazine N-atoms for sigma-2 receptor affinity and activity in a series of analogs of 1-cyclohexyl-4-[3-(5-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)propyl]piperazine (PB28). *J Med Chem.* 52:7817–7828.
- 10) Bem WT, et al. (1991). Overexpression of sigma receptors in nonneural human tumors. *Cancer Res.* 51:6558–62.
- 11) Berthois, Y. et al. (2003) SR31747A is a sigma receptor ligand exhibiting antitumoural activity both in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 88, 438–446
- 12) Booth RG, et al (1993). New cj-like receptor recognized by novel phenylaminotetralins: ligand binding and functional studies. *Mol Pharmacol* 4:1232-1239
- 13) Bouchard P, Quirion R. (1997). [<sup>3</sup>H]1,3-Di(2-tolyl)guanidine and [<sup>3</sup>H](+)-pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic



visualization of the putative sigma and sigma receptor subtypes. *Neuroscience*, 76:467-477

- 14) Bourrie B, et al. (1996). A sigma ligand, SR 31747A, potently modulates Staphylococcal enterotoxin B-induced cytokine production in mice. *Immunology*; 88:389–393.(a6)
- 15) Bourrie B, et al. (1995). Enhancement of endotoxin-induced interleukin-10 production by SR31747A, a sigma ligand. *Eur J Immunol*; 25:2882–2887. .(a7)
- 16) Brent PJ, Pang GT. (1995). Sigma binding site ligands inhibit cell proliferation in mammary and colon carcinoma cell lines and melanoma cells in culture. *Eur J Pharmacol*;278:151–60.
- 17) Brent PJ, et al (1996). The sigma receptor ligand, reduced haloperidol, induces apoptosis and increases intracellular-free calcium levels  $[Ca^{2+}]_i$  in colon and mammary adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*;219:219–26.
- 18) Cairns RA, et al (2003). Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med*;3:659–71.
- 19) Cantiello HF, et al. (1993). Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *J Biol Chem*;268:4596–9.
- 20) Carayon P, et al. (1995). The sigma ligand SR 31747 prevents the development of acute graft-versus-host disease in mice by blocking IFN-gamma and GM-CSF mRNA expression. *Int J Immunopharmacol*; 17:753–761.(a4)
- 21) Carayon P, et al (1996). In vivo effects of a new immunosuppressive sigma ligand, SR 31747, on mouse thymus. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 18:179–191.(a3)

- 22) Carnally, S.M, et al (2010). Demonstration of a direct interaction between sigma-1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys. J.* 98, 1182–1191. doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4293
- 23) Casellas P, et al. (1994). Immunopharmacological profile of SR 31747: in vitro and in vivo studies on humoral and cellular responses. *J Neuroimmunol*; 52:193–203.(a2)
- 24) Casellas P, et al. (2004). SR31747A: a peripheral sigma ligand with potent antitumor activities. *Anticancer Drugs.* 15(2):113-8. Review.(a)
- 25) Caveliers V, et al.(2002). Sigma receptor scintigraphy with N-[2-(1 piperidinyl)ethyl]-3-(123)I-iodo-4 methoxybenzamide of patients with suspected primary breast cancer: first clinical results. *J Nucl Med* 43:1647–9.
- 26) Chaki S, et al. (1994) NE-IOO, a novel potent sigma ligand, preferentially binds to CTI binding sites in guinea pig brain. *Eur J Pharmacol*, 251:R1-2.
- 27) Chen, Y. et al. (2007) Characterization of the cocaine binding site on the sigma-1 receptor. *Biochemistry* 46, 3532–3542
- 28) Chen, J. I. et al. (2009) Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J. Proteome. Res.* 8, 2032–2044.
- 29) Crawford KW, Bowen WD. (2002) Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res*;62:313–22.
- 30) Crottès D, et al. (2013) The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity? *Front Physiol* 16;4:175.(j)
- 31) Crudden G, et al. (2005) Overexpression of the cytochrome p450 activator hpr6 (heme-1 domain protein/human progesterone receptor) in tumors. *Tumour Biol*; 26:142-6.

- 32) Crudden G, et al. (2006). Hpr6 (heme-1 domain protein) regulates the susceptibility of cancer cells to chemotherapeutic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*;316:448-55
- 33) Damaskos C, et al (2014). Nuclear receptors in pancreatic tumor cells. *Anticancer Res*. 34(12):6897-911. Review
- 34) DeBerardinis RJ, et al (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*;104:19345–19350
- 35) de Costa, B.R. et al. (1989) [A] Alterations in the stereochemistry of the kappa-selective opioid agonist U50,488 result in high-affinity sigma ligands. *J. Med. Chem.* 32, 1996–2002
- 36) de Costa, B.R. et al. (1989) [B] Synthesis and evaluation of optically pure [3H]-(+)-pentazocine, a highly potent and selective radioligand for sigma receptors. *FEBS Lett.* 251, 53–58
- 37) Derbez AE, et al. (2002) Sigma(2)-receptor regulation of dopamine transporter via activation of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther*;301: 306–14.
- 38) Derocq JM, et al. (1995). In vivo inhibition of endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines production by the sigma ligand SR 31747. *J Pharmacol Exp Ther*; 272:224–230.(a5)
- 39) Eisenberg RM. (1985). Plasma corticosterone changes in response to central or peripheral administration of kappa or sigma opiate agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 223:863869.
- 40) Everaert H, et al (1997). Sigma-receptor imaging by means of I123-IDAB scintigraphy: clinical application in melanoma and non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*;17:1577–82

- 41) Fontanilla, D., et al (2008). Probing the steroid binding domain- like I (SBDLI) of the sigma-1 receptor binding site using N- substituted photoaffinity labels. *Biochemistry* 47, 7205–7217.doi: 10.1021/bi800564j
- 42) Fontanilla,D.et al (2009). The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science* 323, 934–937.doi: 10.1126/science.1166127
- 43) Fraser SP, et al (2003).Voltage-gated Kchannel expression in rat prostate cancer (MAT-LyLu and AT-2) cell lines: electrophysiological, pharmacological and molecular characterization. *Pflugers Arch*; 446:559–71
- 44) Fu Y, et al. (2010).Sigma-1 receptors amplify dopamine D1 receptor signaling at presynaptic sites in the prelimbic cortex. *Biochim Biophys Acta*;1803:1396-408
- 45) Ganapathy, M.E. et al. (1999) Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 251–260
- 46) Gekker, G. et al. (2006) Cocaine-induced HIV-1 expression in microglia involves sigma-1 receptors and transforming growth factor-beta1. *Int. Immunopharmacol.* 6, 1029–1033
- 47) Glennon, R.A. et al. (1994) Structural features important for sigma 1 receptor binding. *J. Med. Chem.* 37, 1214–1219
- 48) Glennon, R.A. (2005) Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the “deconstructionreconstruction-elaboration” approach. *Mini Rev. Med. Chem.* 5,927–940
- 49) Goyagi, T. et al. (2001) Neuroprotective effect of sigma1-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production. *Stroke* 32, 1613–1620

- 50) Grimes JA, et al. (1995). Differential expression of voltage-activated Na currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett*;369:290–4.
- 51) Gundlach AL, et al. (1986). Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+)-<sup>3</sup>H-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *J Neurosci* 6:1757-1770.
- 52) Guo, L.W. et al. (2005) Sulfhydryl-reactive, cleavable, and radioiodinatable benzophenone photoprobes for study of protein-protein interaction. *Bioconjug. Chem.* 16, 685–693
- 53) Haiman, G. et al. (2009) Effects of dextromethorphan/quinidine on auditory event-related potentials in multiple sclerosis patients with pseudobulbar affect. *J. Clin. Psychopharmacol.* 29, 444–452
- 54) Hand RA, Craven RJ. (2003). Hpr6.6 protein mediates cell death from oxidative damage in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Biochem*;90:534-47.
- 55) Hanner, M., et al. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8072–8077. doi:10.1073/pnas.93.15.8072
- 56) Harada Y, et al, (1994). Characterization of specific (+)-[<sup>3</sup>H]allylnormetazocine and [<sup>3</sup>H]1,3-di(2-tolyl)guanidine binding sites in porcine gastric fundic mucosa. *J Pharmacol Exp Ther*, 269:905-910.
- 57) Harukuni, I. et al. (2000) sigma1-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl)-piperidine affords neuroprotection from focal ischemia with prolonged reperfusion. *Stroke* 31, 976–982

- 58) Hayashi, T. et al. (1995) Modulation by sigma ligands of intracellular free Ca<sup>++</sup> mobilization by N-methyl-D-aspartate in primary culture of rat frontal cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 207–214
- 59) Hayashi, T. et al. (2000) Ca<sup>(2+)</sup> signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca<sup>(2+)</sup> concentration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 788–798
- 60) Hayashi, T. and Su, T.P. (2001) Regulating ankyrin dynamics: roles of sigma-1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 491–496
- 61) Hayashi, T. and Su, T.P. (2003) Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) in NG108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 726–733
- 62) Hayashi, T. and Su, T.P. (2003) Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 718–725
- 63) Hayashi, T. and Su, T.P. (2004) Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14949–14954
- 64) Hayashi, T. and Su, T. (2005) The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Curr. Neuropharmacol.* 3, 267–280
- 65) Hayashi, T., and Su, T.P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca<sup>(2+)</sup> signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.036
- 66) Hayashi T, Su TP. (2008). An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the sigma1 receptor ligand. *Expert Opin Ther Targets*;12:45-58

- 67) Hayashi, T., and Fujimoto, M. (2010). Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Mol. Pharmacol.* 77, 517–528. doi: 10.1124/mol.109.062539
- 68) Hayashi, T. et al. (2010) Regulation of sigma-1 receptors and endoplasmic reticulum chaperones in the brain of methamphetamine self-administering rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 1054–1063
- 69) Huang YS, et al.: Sigma-2 Receptor Ligands and Their Perspectives in Cancer Diagnosis and Therapy. *Medicinal research reviews*, 2014
- 70) Hellewell SB, Bowen WD. (1990). A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: Decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Res.*; 527:244–253.
- 71) Hellewell SB, et al. (1994) Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur J Pharmacol*; 268:9–18.
- 72) Hiranita, T. et al. (2010) Reinforcing effects of sigma-receptor agonists in rats trained to self-administer cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 515–524
- 73) Hornick JR, et al. (2010) The novel sigma-2 receptor ligand SW43 stabilizes pancreas cancer progression in combination with gemcitabine. *Mol Cancer*; 9:298.
- 74) Hornick JR, et al (2012) Therapeutic targeting of pancreatic cancer utilizing sigma-2 ligands. *Surgery.* 152(3 Suppl 1):S152-6. doi: 10.1016/j.surg.2012.05.014. Epub 2012 Jul 3. Review
- 75) Inada T, et al (2004) No association found between the type 1 sigma receptor gene polymorphisms and methamphetamine abuse in the Japanese population:

a collaborative study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann NY Acad Sci*, 1025:27-33.

- 76) Iniguez MA, et al. (2013) Inhibitory effects of sigma-2 receptor agonists on T lymphocyte activation. *Front Pharmacol*;4:23.
- 77) Jbilo O, et al. (1997) Purification and characterization of the human SR 31747A-binding protein. A nuclear membrane protein related to yeast sterol isomerase. *J Biol Chem*;272:27107–15.
- 78) Johannessen, M.A. et al. (2009) Voltage-gated sodium channel modulation by sigma receptors in cardiac myocytes and heterologous systems. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C1049–C1057
- 79) John CS, et al. (1994) Synthesis and characterization of [125I]-N-(N-benzylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide, a new sigma receptor radiopharmaceutical: high-affinity binding to MCF-7 breast tumor cells. *J Med Chem*;37:1737-9.
- 80) John CS, et al. (1995) Sigma receptors are expressed in human non-small cell lung carcinoma. *Life Sci*;56:2385–92.
- 81) John CS, et al. (1998) Synthesis, in vitro binding, and tissue distribution of radioiodinated 2-[125I]N-(N-benzylpiperidin-4-yl)-2-iodobenzamide, 2-[125I]BP: a potential sigma receptor marker for human prostate tumors. *Nucl Med Biol*;25:189–94
- 82) Jonhede S, et al. (2010) Acute effects of the sigma-2 receptor agonist siramesine on lysosomal and extra-lysosomal proteolytic systems in lens epithelial cells. *Mol Vision*;16:819–827
- 83) Kashiwagi H, et al (2007) Selective sigma-2 ligands preferentially bind to pancreatic adenocarcinomas: applications in diagnostic imaging and therapy. *Mol Cancer* 6: 48.



- 84) Katnik, C. et al. (2006) Sigma-1 receptor activation prevents intracellular calcium dysregulation in cortical neurons during in vitro ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1355–1365
- 85) Kekuda, R. et al. (1996) Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 553–558
- 86) Kennedy, C. and Henderson, G. (1990) Inhibition of potassium currents by the sigma receptor ligand (+)-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine in sympathetic neurons of the mouse isolated hypogastric ganglion. *Neuroscience* 35, 725–733
- 87) Kim, F.J. et al. (2009) Sigma 1 receptor modulation of G-proteincoupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. *Mol. Pharmacol.* 77, 695–703
- 88) Kourrich, S., et al (2012). The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 35, 762–771. doi:10.1016/j.tins.2012.09.007
- 89) Kourrich, S., et al (2013). Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine. *Cell* 152, 236–247. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.004
- 90) Kume, T. et al. (2002) Antagonism of NMDA receptors by sigma receptor ligands attenuates chemical ischemia-induced neuronal death in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 455, 91–100
- 91) Labit-Le Bouteiller C, et al. (1998) Antiproliferative effects of SR31747A in animal cell lines are mediated by inhibition of cholesterol biosynthesis at the sterol isomerase step. *Eur J Biochem*; 256:342–349.(a8)
- 92) Langa, F. et al. (2003) Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma1) knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2188–2196

- 93) Largent BL, et al (1986) Sigma receptors on NCB-20 hybrid neurotumor cells labeled with (+)[3H]SKF 10,047 and (+)[3H]3-PPP. *Eur J Pharmacol*;124:183-7.
- 94) Li, L. et al. (2010) DHEA prevents Ab25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacology* 59, 323–333.
- 95) Lupardus PJ, et al.(2000) Membrane-delimited coupling between sigma receptors and Kchannels in rat neurohypophysial terminals requires neither G-proteins nor ATP. *J Physiol (Lond)*;526:527–39
- 96) Mach RH, Wheeler KT. (2009) Development of molecular probes for imaging sigma-2 receptors in vitro and in vivo. *CentNervSystAgents Med Chem* 9:230-45.
- 97) Marrazzo, A. et al. (2005) Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against b-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport* 16, 1223–1226
- 98) Martina, M. et al. (2007) The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J. Physiol.* 578, 143–157
- 99) Martin,W.R,et al. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine- dependent chronic spinal dog *J. Pharmacol.Exp.Ther.* 197, 517–532
- 100) Matsumoto, R.R. et al. (1995) Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* 280, 301–310
- 101) Maurice, T. et al. (1994) Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res.* 647, 44–56

- 102) Maurice, T. et al. (1998) Sigma1 (s1) receptor agonists and neurosteroids attenuate b25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* 83, 413–428
- 103) Maurice,T., and Su,T.P. (2009). The pharmacology of sigma- 1receptors. *Pharmacol. Ther.* 124, 195–206. doi:10.1016/j. pharmthera.2009. 07.001
- 104) Mavlyutov, T.A. and Ruoho, A.E. (2007) Ligand-dependent localization and intracellular stability of sigma-1 receptors in CHOK1 cells. *J. Mol. Signal.* 2, 8
- 105) Mavlyutov, T.A. et al. (2010) The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* 167, 247–255
- 106) Mavlyutov,T.A., et al .(2012). Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N,N'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyltransferase. *Neuroscience* 206, 60–68.doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.040
- 107) Mavlyutov,T.A., et al. (2011). Accelerated retinal ganglion cell death in mice deficient in the Sigma-1 receptor. *Mol. Vis.* 17, 1034–1043. Mei, J. and Pasternak, G.W. (2001) Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor. *Biochem. Pharmacol.* 62, 349–355
- 108) McLean S, Weber E. (1988) Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain. *Neuroscience*, 25:259-269
- 109) Meunier, J. et al. (2006) The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid b25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the s1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 149,998–1012
- 110) Miyatake R, et al (2004) Functional polymorphisms in the sigma receptor gene associated with alcoholism. *Bio Psychiatr*, 55:85-90.

- 111) Moebius, F.F. et al. (1997) High affinity of sigma 1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1–6
- 112) Monassier, L. et al. (2007) Sigma(2)-receptor ligand-mediated inhibition of inwardly rectifying K(+) channels in the heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 341–350
- 113) Monnet, F.P. et al. (1990) N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by sigma receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 179, 441–445
- 114) Monnet FP, et al (1993) The cytochromes P-450 are not involved in the modulation of the N-methyl-D-aspartate response by sigma ligands in the rat CA3 dorsal hippocampus. *Synapse*, 13:30-38.
- 115) Monnet, F.P. et al. (2003) Protein kinase C-dependent potentiation of intracellular calcium influx by sigma1 receptor agonists in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 705–712
- 116) Moody TW, et al. (2000) Sigma ligands inhibit the growth of small cell lung cancer cells. *Life Sci*;66:1979–86.
- 117) Morio Y, et al (1994) Characterization of the currents induced by sigma ligands in NCB20 neuroblastoma cells. *Brain Res*;637: 190–6.
- 118) Neubauer H, et al. (2008) Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1. *Breast Cancer Res*;10:R85.
- 119) Niso M, et al. (2013) Sigma-2 receptor agonists as possible antitumor agents in resistant tumors: hints for collateral sensitivity. *ChemMedChem*.8(12):2026-35.

- 120) Nilius B, Wohlrab W. (1992) Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol*;445:537–48.
- 121) Novakova M, et al (1995) Ionotropic action of sigma receptor ligands in isolated cardiac myocytes from adult rats. *Eur J Pharmacol*, 286:19-30.
- 122) Okuyama, S. et al. (1995) Effect of NE-100, a novel sigma receptor ligand, on phencyclidine- induced delayed cognitive dysfunction in rats. *Neurosci. Lett.* 189, 60–62
- 123) Pal, A. et al. (2007) Identification of regions of the sigma-1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Mol. Pharmacol.* 72,921–933
- 124) Pal, A., et al.(2008).Juxta position of the steroid binding domain- like I and II regions constitutes a ligand binding site in the sigma- 1 receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 19646–19656. doi:10.1074/jbc. M802192200
- 125) Palmer CP, et al. Sigma receptor modulation of ion channels. In: Matsumoto R, editor. *Sigma receptors: chemistry, cell biology, and clinical implications.* New York: Kluwer Academic Publishers; In press 2004.
- 126) Palmer,C.P.,et al (2007). Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 67, 11166–11175.doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1771
- 127) Paul IA, et al. (1993) Sigma receptors modulate nicotinic receptor function in adrenal chromaffin cells. *FASEB J*, 7:1171-1178.
- 128) Paul R, et al. (1994) Allosteric modulation of peripheral s binding sites by a new selective ligand:SR 31747. *J Neuroimmunol*; 52:183–192.(a1)
- 129) Peluso JJ, et al (2009) Progesterone receptor membrane component-1 regulates the development and cisplatin sensitivity of human ovarian tumors in athymic nude mice. *Endocrinology*;150:4846-54.

- 130) Peluso JJ (2011). Progesterone signaling mediated through progesterone receptor membrane component-1 in ovarian cells with special emphasis on ovarian cancer. *Steroids*;76: 903-9.
- 131) Perregaard J, et al. (1995) Sigma ligands with subnanomolar affinity and preference for the sigma2 binding site. 1. 3-(omega-aminoalkyl)-1H-indoles. *J Med Chem*, 38:1998-2008.
- 132) Casellas P, et al. (2004) SR31747A: a peripheral sigma ligand with potent antitumor activities. *Anticancer Drugs*;15(2):113-8. Review.
- 133) Prasad,P.D.,etal.(1998).Exon– intron structure, analysis of pro-moter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J. Neurochem.* 70, 443–451.doi:10.1046/j.1471- 4159.1998.70020443.x
- 134) Prevarskaya,N., et al .(2010).Ion channels and the hall marks of cancer. *Trends Mol. Med.* 16, 107–121. doi:10.1016/j.molmed.2010. 01.005
- 135) Quirion,R., etal.(1992). A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 85–86.doi:10.1016/0165-6147(92)90030-A Seth, P. et al. (1998) Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *J. Neurochem.* 70, 922–931
- 136) Ramachandran, S. et al. (2007) Purification and characterization of the guinea pig sigma-1 receptor functionally expressed in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* 51, 283–292
- 137) Ramachandran, S. et al. (2009) The sigma1 receptor interacts with Nalkyl amines and endogenous sphingolipids. *Eur. J. Pharmacol.* 609,19–26
- 138) Renaudo,A., et al (2007). Cancer cell cycle modulated by a functional coupling between sigma-1 receptors and Cl-channels. *J. Biol.Chem.* 282, 2259–2267.doi: 10.1074/jbc.M607915200

- 139) Riganas S, et al (2012) New adamantane phenylalkylamines with  $\sigma$ -receptor binding affinity and anticancer activity, associated with putative antagonism of neuropathic pain. *J Med Chem.* 26;55(22):10241-61.
- 140) Riganas S, et al (2012) Synthesis,  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ -receptors binding affinity and antiproliferative action of new C1-substituted adamantanes. *Bioorg Med Chem.* 15;20(10):332331.
- 141) Riganas S, et al (2012) New adamantane derivatives with sigma affinity and antiproliferative activity. *Med Chem.*;8(4):569-86.
- 142) Robert H. Mach, et al (2013) The Sigma-2 ( $\sigma_2$ ) Receptor: A Novel Protein for the Imaging and Treatment of Cancer. *J Med Chem.* 26; 56(18): 7137–7160
- 143) Roman F, et al (1989) Autoradiographic localization of sigma opioid receptors in the gastrointestinal tract of the guinea pig. *Gastroenterology*,97:76-82
- 144) Romieu,P.,et al. (2004). The sigma1 (sigma1 )receptor activation is a key step for the reactivation of cocaine conditioned place preference by drug priming. *Psychopharmacology (Berl.)* 175, 154–162.doi: 10.1007/s00213-004-1814-x
- 145) Roth, M.D. et al. (2005) Cocaine and sigma-1 receptors modulate HIV infection, chemokine receptors, and the HPA axis in the huPBL-SCID model. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1198–1203
- 146) Ruscher,K.,et al .(2011).The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain* 134, 732–746. doi:10.1093/brain/ awq367
- 147) Rusinol, A.E. et al. (1994) A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and

- contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 269, 27494–27502
- 148) Schwab A, et al(1999) channeldependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell Physiol. Biochem*;9:126–32.
- 149) Selkoe, D.J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498
- 150) Senda T, et al. (1998) Effect of SA4503, a novel  $\sigma_1$  receptor agonist, against glutamate neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *Eur J Pharmacol*,342:105-111.
- 151) Seth, P. et al. (2001) Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1540,59–67
- 152) Shamsul Ola M, et al (2001) Expression pattern of sigma receptor 1 mRNA and protein in mammalian retina. *Brain Res Mol Brain Res*, 95:86-95.
- 153) Shen, Y.C. et al. (2008) Dimemorfan protects rats against ischemic stroke through activation of sigma-1 receptor-mediated mechanisms by decreasing glutamate accumulation. *J. Neurochem.* 104, 558–572
- 154) Shiue C, et al. (2000) N-(n-Benzylpiperidin-4-yl)-2-[<sup>18</sup>F]fluorobenzamide: a potential ligand for PET imaging of breast cancer. *Nucl Med Biol* 27:763–7.
- 155) Silve, S. et al. (1996) Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits delta8-delta7 sterol isomerase activity in yeast. *J. Biol. Chem.* 271, 22434–22440



- 156) Simony-Lafontaine J, et al. (2000) Immunocytochemical assessment of sigma-1 receptor and human sterol isomerase in breast cancer and their relationship with a series of prognostic factors. *Br J Cancer*;82:1958–66.
- 157) Smith P, et al. (1998) Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett*;423:19–24
- 158) Soriani O, et al (1998) Sigma ligands stimulate the electrical activity of frog pituitary melanotrophs through G-protein dependent inhibition of potassium conductances. *J Pharmacol Exp Ther*;286:163–71.
- 159) Soriani, O. et al. (1999) A-Current down-modulated by sigma receptor in frog pituitary melanotrope cells through a G protein-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 321–328
- 160) Soriani, O. et al. (1999) The sigma-ligand (+)-pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs. *Am. J. Physiol.* 277, E73–80
- 161) Spitzer D, et al (2012) Use of multifunctional sigma-2receptor ligand conjugates to trigger cancer selective cell death signaling. *CancerRes*;72:201–209.
- 162) Spruce, B.A. et al. (2004) Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo. *CancerRes.* 64, 4875–4886
- 163) Stavitskaya L, et al.( 2010) The effect of the pyridyl nitrogen position in pyridylpiperazine sigma ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:2564–2565. [PubMed: 20338757]
- 164) Su TP. (1982) Evidence for sigma opioid receptor: binding of [<sup>3</sup>H]SKF 10,047 to etorpliineinaccessible sites in guinea-pig brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 223:284-290.

- 165) Su T-P, et al (1988) Steroid binding at cr receptors suggest a link between endocrine, nervous and immune systems. *Science*, 240:219-221
- 166) Su, T.P. et al. (2009) When the endogenous hallucinogenic trace amine N,N-dimethyltryptamine meets the sigma-1 receptor. *Sci. Signal.* 2,pe12
- 167) Su,T.P., et al.(2010).The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 557–566. doi:10.1016/j.tips.2010.08.007
- 168) Tam, S.W. (1983) Naloxone-inaccessible sigma receptor in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6703–6707
- 169) Tam, S.W. (1985) (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]ethylketocyclazocine, mu, kappa, delta and phencyclidine binding sites in guinea pig brain membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 109, 33–41
- 170) Tam, S.W. and Cook, L. (1984) Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[3H] SKF 10,047 and [3H]haloperidol binding in guinea pig brain membranes. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5618–5621
- 171) Tran TT, et al (1998)Microinjection of sigma ligands into cranial nerve nuclei produces vacuous chewing in rats. *Psychopharmacology*, 137:191200.
- 172) Tsai, S-Y. et al. (2009) Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive Rac.GTP pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22468–22473
- 173) Uchida,N. et al. (2005) A variant of the sigma receptor type-1 gene is a protective factor for Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 13,1062–1066

- 174) van Waarde A, et al (2004) Tumor imaging with two sigma receptor ligands, <sup>18</sup>F-FE-SA5845 and <sup>11</sup>C-SA4503: a feasibility study. *J Nucl Med*, 45:1939-1945.
- 175) Véronique Megalizzi et al.(2012) Sigma receptors and their ligands in cancer biology: overview and new perspectives for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*. Vol.32, p 410–427,
- 176) Villard, V. et al. (2009) Anti-amnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative anavex1-41 against amyloid b25-35-induced toxicity in mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 1552–1566
- 177) Villard, V. et al. (2010) Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma1 (σ1) ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative. *J.Psychopharmacol*.doi:10.1177/0269881110379286; Sept 7
- 178) Vilner BJ, et al (1995) Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*;55:408-13.
- 179) Vilner BJ, Bowen WD (2000). Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*;292:900–11.
- 180) Walker JM, et al. (1990) Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol Rev*;42:355-402.
- 181) Walker JM, et al (1993) A comparison of (-)-deoxybenzomorphans devoid of opiate activity with their dextrorotatory phenolic counterparts suggest role of CT2 receptors in motor function. *Eur J Pharmacol*,231:61-68
- 182) Wang, Y. et al. (1987) Interactions of metapit with phencyclidine and sigma agonist actions in rat cerebellum: determination of specificity and selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 321–327

- 183) Wang L-M, et al (2000) Cloning and expression of an alternative splice variant of the mouse sigma-1 receptor. *Proc Am Assoc Cancer Res*;41:205–6.
- 184) Wang H, et al. (2002) HERG Kchannel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res*;62:4843–8.
- 185) Wang, B. et al. (2004) Expression of sigma 1 receptor in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 87, 205–214
- 186) Weber, E. et al. (1986) 1,3-Di(2-[5-3H]toly)guanidine: a selective ligand that labels sigma-type receptors for psychotomimetic opiates and antipsychotic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83,8784–8788
- 187) Wheeler KT, et al. (2000) Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *Br J Cancer*;82:1223-32.
- 188) Wilke, R.A. et al. (1999) Sigma receptor photolabeling and sigma receptor-mediated modulation of potassium channels in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18387–18392
- 189) Wolfe SA Jr, et al (1988),Initial identification and characterization of cr receptors on human peripheral blood leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 247:1114-1119
- 190) Wolfe SA Jr, et al. (1989) Sigma receptors in endocrine organs; identification, characterization, and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary. *Endocrinology*, 124:1160-1172
- 191) Wolfe SA Jr, et al (1997),Differential localization of three distinct binding sites for sigma receptor ligands in rat spleen. *J Neuroimmunol* 72:45-58.
- 192) Woodfork KA, et al (1995) Inhibition of ATP-sensitive potassium channels cause reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J Cell Physiol*;162:163–71

- 193) Wulff, H., et al (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 982–1001. doi: 10.1038/nrd2983
- 194) Xu, J., et al. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nat. Commun.* 2:380. doi: 10.1038/ncomms1386
- 195) Yagasaki, Y. et al. (2006) Chronic antidepressants potentiate via sigma-1 receptors the brain-derived neurotrophic factor-induced signaling for glutamate release. *J. Biol. Chem.* 281, 12941–12949
- 196) Yamamoto, H. et al. (1999) Amino acid residues in the transmembrane domain of the type 1 sigma receptor critical for ligand binding. *FEBS Lett.* 445, 19–22
- 197) Yamamoto H, et al (2002) Identification of GRP78 as a type-1 sigma receptor (SigmaR1)-associated protein. *Soc Neurosci Abst*, program #833.9.
- 198) Yao X, Kwan HY (1999). Activity of voltage-gated K channels is associated with cell proliferation and Ca<sup>2+</sup> influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci* 65:55–62
- 199) Yao H, et al. (2010) Molecular mechanisms involving sigma receptor-mediated induction of MCP-1: implication for increased monocyte transmigration. *Blood*;115:4951-62.. A study that found the involvement of Sig-1Rs in HIV-induced neuronal degeneration.
- 200) Yoon SY, et al. (2010) An increase in spinal dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances NMDA-induced pain via phosphorylation of the NR1 subunit in mice: involvement of the sigma-1 receptor. *Neuropharmacology*;59:460-7.

- 201) Zamanillo D, et al (2002) Increase of forskolin-stimulated adenylyl cyclase and AP-1 activities by sigmal receptor expression. FENS Absr, A04617
- 202) Zamora PO, et al (1998) Increased binding to sigma sites of N-[1 (2piperidiny)ethyl)-4-[I-125]-iodobenzamide (I-125-PAB) with onset of tumor cell proliferation. Life Sci;63:1611–8
- 203) Zhang, H. and Cuevas, J. (2002) Sigma receptors inhibit high-voltageactivated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. J. Neurophysiol. 87, 2867–2879
- 204) Zhang, H. and Cuevas, J. (2005) Sigma receptor activation blocks potassium channels and depresses neuroexcitability in rat intracardiac neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 313, 1387–1396