

**PENGARUH HIPERGLEMI TERHADAP PERAN SITOSKELETON (*CYTOSKELETON*)
SEBAGAI JALUR TRANSDUKSI SIGNAL (*SIGNAL TRANSDUCTION*)**

Achmad Rudijanto, Handono Kalim

Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK Universitas Brawijaya Malang

SUMMARY

EFFECT OF HYPERGLYCEMIA TO THE ROLE OF CYTOSKELETON AS
A SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY

Intracellular signal transduction occurs through cascades of reactions involving dozens of proteins that transmit signals from the cell surface, through a crowded cellular environment filled with organelles and a filamentous cytoskeleton, to specific target. For most characterized signal transduction pathway, the initial signaling event and the end point are well known. In order to fully understand intracellular signal transduction, it is essential to know the intermediate signaling molecules and to understand how information flows from one to the next. The cytoskeleton, an interconnected assembly of actin (microfilament), intermediate filament and microtubule networks that extend throughout the entire cell, is involved in intracellular signal transduction. Individual proteins of the cytoskeleton might participate directly in signal transduction by linking two or more signaling protein and might also provide a macromolecular scaffold, which spatially organizes components of a signal transduction cascade. Diabetes mellitus is an increasingly common disease. Absolute or relative deficiencies of insulin are common in this disease. Insulin has been suggested to play a key regulatory role in the functional organization of actin filaments. The microtubules are also the targets of insulin. A chronic insulin deficiency may could lead to impairment in the organization of the cytoskeleton. This could entail a compromised or slower action of some activated enzymes in cells, affect to intracellular signal transduction.

Key words: hyperglycemia, cytoskeleton, signal transduction

PENDAHULUAN

Tulang pada tubuh manusia ataupun binatang merupakan suatu sistim yang sudah sangat dikenal. Sifat padat dan keras dari tulang mampu melindungi dan menyokong keberadaan jaringan lunak tubuh. Jaringan ini memegang peran yang sangat penting untuk mengatur pergerakan tubuh. Eukariotik sel juga memiliki suatu sistim tulang yang disebut sebagai sitoskeleton yang mempunyai peran yang sangat mirip dengan tulang pada tubuh manusia.

Sitoskeleton diketahui mempunyai peran pada pengaturan mekanika sel. Disamping hal tersebut dipercaya bahwa jaringan ini mempunyai peran yang jauh lebih besar, yakni ikut mengatur berbagai organela maupun molekul yang tersebar didalam sel. Sitoskeleton membentuk suatu jaringan terpadu, menghubungkan secara dianmis hampir semua struktur sel, serta memiliki permukaan yang sangat luas yang memungkinkan berbagai protein dan komponen sitoplasma dapat terikat pada permukaannya¹.

Setiap sel melakukan komunikasi dengan lingkungan sekelilingnya. Pada tingkat seluler suatu komunikasi antar sel akan berguna bagi kelangsungan kehidupan sel itu sendiri. Terminologi transduksi signal (*signal transduction*) yang sering pula disebut sebagai signal sel (*cell signaling*) merupakan suatu proses komunikasi yang meliputi konsep tentang tanggapan sel terhadap rangsangan dari sekelilingnya yang disusul dengan timbulnya reaksi didalam sel. Transduksi signal dalam sel mungkin akan melibatkan proses fisik seperti proses difusi, perubahan kimiawi seperti peristiwa fosforilasi dari berbagai signal antara (*intermediate signaling*), atau keduanya. Pada sebagian besar peristiwa hantaran signal, awal dan akhir dari peristiwa hantaran pada umumnya telah diketahui secara baik. Namun proses diantara awal dan akhir peristiwa hantaran, merupakan proses antara yang masih banyak belum diketahui secara menyeluruh. Untuk dapat memahami dengan baik proses antara awal dan akhir suatu transduksi signal diperlukan pemahaman tentang molekul yang berperan pada proses antara tersebut serta proses hantaran signal dari satu tempat ketempat yang lainnya².

Transportasi berbagai macam protein dalam sel yang melibatkan sitoskeleton merupakan salah satu bagian dari transduksi signal. Sitoskeleton yang terdapat dalam sel terdiri dari tiga macam filamen, tersusun saling berkaitan satu dengan lainnya. Jaringan ini memungkinkan adanya jalur hubungan antara dinding sel, inti ataupun berbagai organela yang ada didalam sel. Beberapa penelitian menunjukkan adanya peran masing-masing jenis filamen sitoskeleton pada berbagai hantaran mekanik yang dipergunakan sebagai jalur pergerakan organela maupun protein dalam sel. Jalur ini memungkinkan pergerakan organela, protein ataupun molekul lemak bergerak menuju tempat yang dituju^{1,3}. Hal ini memungkinkan pula sitoskeleton terlibat pada transduksi signal didalam sel⁴.

Pengaruh struktur sitoskeleton terhadap transduksi signal dapat diidentifikasi melalui cara penrusakan dari salah satu filamen dengan menggunakan berbagai bahan. Sitokalsin (*cytochalasin*) mampu merusak filamen aktin yang merupakan unsur utama mikrofilamen, kolkisin (*colchicine*) akan merusak mikrotubulus, sedangkan akrilamid (*acrylamide*) mampu merusak filamen antara. Penggunaan metode biokimia maupun manipulasi genetik dapat pula dipergunakan untuk mempelajari proses ikatan antara berbagai elemen yang terlibat pada transduksi signal, termasuk reseptor dan protein sitoplasma dengan protein sitoskeleton spesifik¹. Ditinjau dari struktur fisik maupun kimia, sangat mungkin sitoskeleton mempunyai pengaruh penting pada hantaran signal sehingga informasi dapat terkirim dari satu titik di sel membrane sehingga mencapai tempat yang jauh didalam sitoplasma atau dalam inti sel^{5,6}.

Diabetes Mellitus (DM) merupakan kelainan metabolik yang ditandai dengan adanya gangguan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak. Hiperglikemi yang terdapat pada DM tidak hanya mampu menimbulkan kerusakan sitoskeleton⁷, namun juga akan mempengaruhi aktifitas berbagai macam protein sel antara lain protein kinase-C⁸. Sangat mungkin bahwa keadaan tersebut akan berpengaruh pada fungsi sitoskeleton sebagai jalur transduksi signal.

Pada tinjauan pustaka berikut akan dibahas tentang peran sitoskeleton pada transduksi signal, pengaruh hiperglikemi pada struktur dan fungsi sitoskeleton dengan berbagai akibatnya, serta perubahan transduksi signal khususnya yang terkait dengan protein kinase-C.

JARINGAN SITOSKELETON

STRUKTUR SITOSKELETON

Sitoskeleton tersusun dari tiga macam filamen yang terstruktur dengan baik, disebut mikrotubulus (*microtubules*), mikrofilamen (*microfilament*) yang disebut juga sebagai filamen

aktin (*actin filament = F-actin*), dan filamen antara (*intermediate filament = IF*)⁹. Ketiga macam filamen menyusun suatu jaringan kerjasama yang sangat rumit. Modulasi jaringan sitoskeleton akan merubah fungsi mekanika sel yang mempunyai peran penting pada sitokinesis (*cytokinesis*), ataupun pergerakan sel^{9,10}, mengemukakan adanya empat fungsi sitoskeleton, seperti: penyangga struktur sel, transportasi dalam sel, kontraktilitas dan pergerakan sel, serta pembelahan sel.

Terdapat berbagai macam protein yang berasosiasi dengan masing-masing filamen. *Microtubule-associated protein (MAPs)* merupakan protein jembatan penghubung mikrotubulus dengan sekitarnya, baik antar filamen mikrotubulus maupun dengan filamen yang lain⁹. Berbagai protein lain seperti, sindapin (*syndapin*), *F-actin binding protein Abpi* dan kortaktin (*cortactin*) merupakan protein pengikat antara filamen aktin (mikrofilamen) dengan membran trafficking¹¹. IF juga memiliki berbagai protein yang berasosiasi dengannya. Protein-protein tersebut antara lain: plektin (*plectin*), fimbrin, filamin, kinesin, transglutaminase dan beberapa protein lainnya¹². Melihat posisi dari masing-masing protein yang berasosiasi dengan berbagai filamen, tampaknya bahwa fungsi protein tersebut bukan hanya sebagai penghubung melainkan juga membantu stabilitas dari jaringan sitoskeleton.

Jaringan sitoskeleton terdiri dari tiga macam filamen yang berbeda yang menempati posisi yang berbeda pula didalam sel namun masih berhubungan satu dengan yang lainnya. Jaringan tersebut menjadi suatu susunan yang unik dan memungkinkan terbentuknya struktur elastik tiga dimensi. Struktur elastik demikian tampaknya akan sangat menunjang peran sitoskeleton sebagai penerus signal mekanik yang diterima oleh sel¹³.

PROTEIN MOTOR

Protein motor berperan sebagai penggerak berbagai organela maupun protein dalam sel dari

suatu tempat dalam sel menuju titik tujuan. Protein motor mampu merubah enersi kimiawi menjadi enersi mekanik sehingga proses pergerakan organela atau protein dapat berlangsung. Fesikel, mitokondria, lisosom, kromosom dan beberapa filamen sitoskeleton yang pergerakannya dalam sel memanfaatkan peran protein motor tersebut⁹. Protein motor memanfaatkan sitoskeleton sebagai jalur pergerakannya. Dalam satu sel terdapat beberapa puluh protein motor yang berbeda. Setiap protein motor mempunyai peran spesifik untuk satu fungsi pada suatu daerah kerja tertentu. Terdapat tiga grup famili protein motor, yakni miosin, kinesin dan dinein. Kinesin dan dinein bergerak sepanjang mikrotubulus, sedangkan miosin merupakan motor penggerak disepanjang filamen aktin. Sejauh ini filamen antara tak memiliki protein motor⁹.

Diperlukan adanya enersi untuk menjalankan fungsi protein motor. Terdapat dua proses yang berkelanjutan untuk membantu protein motor mampu menjalankan fungsinya. Kedua siklus tersebut adalah siklus kimiawi dan mekanik. Tahap proses kimiawi dimulai dengan terjadinya ikatan ATP pada protein motor yang disusul dengan hidrolisis ATP, melepaskan ADP dan Pi dari motor serta terikatnya kembali satu molekul ATP baru keprotein motor. Hidrolisis ATP akan menyediakan enersi yang diperlukan untuk pergerakan protein motor tersebut⁹.

KOMUNIKASI SEL

TRANSDUKSI SIGNAL

Transduksi signal merupakan suatu peristiwa yang sangat kompleks. Signal (rangsang) dapat berupa suatu protein yang dihasilkan oleh sel lain yang kemudian berikatan dengan reseptor spesifik pada dinding sel, atau suatu substrat lain non protein. Demikian juga adanya kontak langsung antar sel dapat pula menimbulkan signal. Transduksi signal meliputi berbagai aktifitas seperti⁹:

- Pengenalan berbagai signal dari luar terhadap reseptor spesifik yang terdapat pada permukaan sel membrane.
- Penghantaran signal melalui sel membrane kedalam sitoplasma.
- Penghantaran signal kepada molekul efektor spesifik pada bagian sel membran atau efektor spesifik dalam sitoplasma. Hantaran signal ini kemudian akan menimbulkan respon spesifik terhadap signal tersebut. Respon spesifik yang timbul tergantung pada jenis signal yang diterima. Respon dapat berupa peningkatan atau penurunan aktifitas ensim-ensim metabolik, rekonfigurasi sitoskeleton, perubahan permeabilitas sel membran, aktivasi sintesa DNA, perubahan ekspresi genetic atupun program apoptosis.
- Perputusnya rangkaian signal. Terjadi apabila rangsangan dari luar mulai berkurang atau terputus. Terputusnya signal juga terjadi apabila terdapat kerusakan atau tidak aktifnya sebagian atau seluruh molekul penghantar signal. Informasi yang terjadi akan melewati jalur rangsang (signal transduction pathway) yang terdiri dari berbagai protein berbeda atau molekul tertentu seperti berbagai ion dan kanalnya, berbagai faktor transkripsi, atupun berbagai tipe subunit regulator. Setiap protein yang terlibat pada jalur ini mampu menghambat atau mengaktifasi protein yang berada dibawah pengaruhnya (down stream). Protein utama yang terlibat dalam jalur rangsang pada umumnya adalah kinase dan pospatase, yang beberapa diantaranya merupakan protein yang terdapat/larut dalam sitoplasma. Kedua protein ini mampu melepaskan atau menerima grup pospat dari protein lain sehingga proses penghantaran atau penghentian signal dapat berlangsung.

Ikatan ligand dengan reseptor spesifik akan memicu pelepasan *second messenger* yang akan menimbulkan reaksi berantai dan membawa perubahan didalam sel. Reseptor spesifik, yang terdapat pada membran sel dapat berupa: *GTP-*

binding protein (G-protein)-coupled receptors, receptor tyrosine kinase, cytokine receptor-link kinase atupun *serine kinase*¹⁴. Signal yang terjadi bukan hanya oleh adanya ikatan ligand dengan reseptor spesifik saja, melainkan juga akibat adanya paparan langsung dengan tekanan mekanik maupun perubahan kimiawi disekitar sel dengan melibatkan integrin.

Disamping reseptor, terdapat pula berbagai kanal ion yang ikut berperan pada transduksi signal. Aktifitas kanal ion (khususnya ion-Ca) atupun reseptor kalsium seperti *calcium sensing receptor (CaSR)* yang termasuk dalam kelompok *C-family of G-protein coupled receptor* dapat mempengaruhi keseimbangan kalsium dengan merubah konsentrasi ion sitosolik¹⁵. Ion-Ca dalam sitoplasma akan bekerja sebagai *second messenger* dan dapat memicu timbulnya transduksi signal yang berkelanjutan.

RESEPTOR PADA MEMBRAN SEL (CELL-SURFACE RECEPTORS)

G-protein (GTP-binding protein)-coupled receptors.

G-protein coupled receptors merupakan suatu reseptor pada sel membrane yang mempunyai tujuh helix transmembran. Penyaluran signal yang timbul setelah *G-protein coupled receptors* berikatan dengan ligand, baru mungkin terjadi bila G-protein ikut berperan aktif untuk mempengaruhi efektor yang berada dibawah pengaruhnya.

G-protein merupakan suatu protein integral yang terdapat pada membran sitoplasma. Bekerja seakan sebagai penyambung atau pemutus arus sehingga suatu proses transduksi menjadi aktif atau terhenti. Berperan sebagai penyambung dan pemutus arus dari lebih dari 1000 reseptor keberbagai efektor dalam sel, termasuk sejumlah ensim dan kanal ion^{16,17}. G-protein terdiri dari subunit-alfa, beta dan gama.

Aktivasi G-protein terjadi apabila ligand berikatan dengan reseptor spesifik, selanjutnya

aktifasi G-protein akan menimbulkan aktifasi protein efektor pada jalur berikutnya. G-protein terdapat dalam keadaan inaktif apabila subunit-alfa berikatan dengan GDP (guanine diphosphate). Apabila G-protein bereaksi dengan GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor), pelepasan dan perubahan GDP menjadi GTP (guanine triphosphate) akan dihambat dan G-protein tetap dalam keadaan inaktif. Sedangkan apabila berinteraksi dengan GEF (guanine nucleotide exchange factor), protein tersebut akan merubah GDP menjadi GTP yang akan memicu timbulnya aktifasi G-protein. Pada umumnya aktifasi akan terjadi apabila telah terjadi ikatan antara protein dengan reseptor spesifik. Subunit-beta dan gamma dari G-protein akan berikatan dengan reseptor spesifik, sedangkan subunit-alpha akan berikatan dengan GTP yang akan mengaktifkan G-protein dan menimbulkan reaksi *downstream* selanjutnya. GTP akan dihidrolisis oleh GTP-ase, yang aktifitasnya dipengaruhi oleh GAP (GTP-ase activating protein). Tingkat pengaruh oleh GAP terhadap aktifitas GTP-ase ini akan mempengaruhi lamanya aktifitas G-protein⁹. Siklus aktif-inaktif G-protein dipengaruhi oleh keberadaan protein lain yakni GDI yang menghambat pelepasan GDP dari ikatannya dengan G-protein, GEF yang terikat dengan G-protein inaktif dan memicu pelepasan GDP dari G-protein dan GAP yang memicu terjadinya hidrolisis dari GTP menjadi GDP. Apabila GTP telah dihidrolisis secara sempurna menjadi GDP, maka G-protein akan kembali menjadi inaktif¹⁸.

Reseptor tirosin-kinase (RTK)

Reseptor yang terdapat pada membrane sel, terkadang bukan hanya suatu protein yang bekerja sebagai reseptor saja, namun juga merupakan suatu enzim yang mampu menambah group fosfat kepada residu tirosin spesifik dari protein itu sendiri. Terdapat dua macam tirosin kinase (TK) yakni: pertama, RTK yang merupakan protein transmembran yang memiliki

domain diluar membrane sel yang mampu berikatan dengan ligand serta domain didalam membrane sel yang merupakan suatu katalitik-kinase. Jenis kedua, merupakan non-RTK yang tak memiliki protein transmembran serta terdapat dalam sitoplasma, inti dan bagian dalam dari membran sel¹⁹. Pada *G-proteincoupled receptors* terdapat tujuh helix transmembran, sedangkan reseptor tirosin kinase hanya mempunyai satu segmen transmembran meskipun reseptor tipe ini dapat berupa monomer, dimer ataupun tetramer.

Data *human genome* menunjukkan adanya 90 gen yang menyandi tirosin kinase (TK) dan 43 gen yang menyandi protein menyerupai tirosin kinase. Lebih dari lima puluh macam RTK yang telah teridentifikasi. Protein yang disandi oleh gen TK berperan pada proses pembelahan, diferensiasi, fungsi, pergerakan dan ketahanan hidup dari sel¹⁹.

Reseptor insulin merupakan RTK tetramerik yang terdiri dari 2 subunit alfa dan 2 subunit beta. Subunit alfa terdapat dibagian luar membran sel yang mampu berikatan dengan hormon insulin, sedangkan subunit beta merupakan bagian transmembran yang meneruskan signal kedalam sel. Disamping reseptor insulin yang merupakan RTK tetramerik, terdapat pula RTK yang merupakan suatu monomer, misalnya RTK untuk *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), serta *fibroblast growth factor* (FGF)⁹. RTK meneruskan transduksi signal insulin dan berbagai faktor pertumbuhan seperti *Insulin growth factor-1 (IGF-1)*, *epidermal growth factor (EDGF)*, *nerve growth factor (NGF)*, *PDGF* dan *FGF*¹⁴.

Pada saat tidak berikatan dengan ligand, RTK dalam keadaan inaktif sebagai monomer dan tidak terfosforilasi. Pada sejumlah RTK bagian *extramembrane* dalam sitoplasma lebih lanjut menghambat aktifitas protein itu sendiri melalui ikatannya dengan domain kinase²⁰. Aktifasi RTK baru terjadi apabila bagian luar reseptor berikatan dengan ligand dan menghasilkan oligomerisasi,

gangguan pada interaksi otoinhibisi *junxtamembrane* dan posporilasi dari tirosin regulator pada jalur aktifitas kinase²¹. Aktifasi reseptor insulin akan mendorong terjadinya proses posporilasi dengan terjadinya tranfer group pospat kepada residu tirosin spesifik dari subunit beta dan residu tirosin lain yang disebut sebagai *insulin receptor substrate (IRS)*. Posporilasi oleh RTK tidak terjadi pada setiap tirosin, posporilasi hanya akan terjadi pada tirosin yang akan berikatan dengan protein lain yang memiliki domain SH2. IRS yang telah mengalami posporilasi akan bekerja sebagai *docking unit*, mengikat dan mengaktifkan berbagai protein dengan domain SH2 yang akan menimbulkan rangkaian transduksi signal selanjutnya. Protein tirosin pospatase akan melakukan deposporilasi reseptor insulin maupun substrat dibawahnya yang telah mengalami posporilasi sehingga transduksi signal terhenti²². Protein dengan domain SH2 dapat pula disebut sebagai efektor dari RTK seperti layaknya adenil siklase sebagai efektor dari *G-proteincoupled receptors*.

Reseptor kinase serin

Reseptor kinase serin berperan pada aktivitas kerja dari aktivin, TGF-beta, *mulerian-inhibiting substance (MIS)*, dan *bone morphegenic protein (BMP)*. Sebagai efektor dari reseptor kinase serin adalah kinase serin sendiri. Keluarga dari reseptor ini meneruskan signal melalui suatu protein yang disebut sebagai *smads*. Protein ini dapat berperan ganda, baik berperan sebagai penerus signal (transducer) maupun sebagai faktor transkripsi¹⁴.

Integrin

Hubungan antara sel dengan substrat dimediasi dengan adanya integrin yang merupakan suatu protein transmembran yang mempunyai tempat ikatan dengan berbagai material ekstra sel seperti fibronektin, kolagen ataupun proteoglikan. Pada proses inflamasi, makrofag maupun fibroblast akan mensintesa

fibronektin yang merupakan matriks protein yang besar. Fibronektin mempunyai fungsi sebagai *chemotractant* dan fungsi mitogenik untuk fibroblast. Untuk menjalankan fungsi tersebut perlu adanya ikatan fibronektin dengan reseptor integrin pada sel mononuklear maupun fibroblast²³.

Integrin bukan hanya mampu berikatan dengan substratnya namun juga merupakan jalur hantaran yang memungkinkan perubahan diluar sel berpengaruh terhadap aktifitas didalam sel. Integrin mempunyai peran yang dinamis pada masa pertumbuhan dengan memfasilitasi proses adesi sel dan melakukan kontrol pertumbuhan²⁴.

Interaksi antara integrin dibagian luar sel dengan ligand seperti fibronektin akan memicu timbulnya berbagai signal, termasuk signal untuk pelepasan ion-kalsium kedalam sitosol, sintesa *second messenger* pospoinositid, serta posporilasi tirosin dari berbagai protein dalam sel. Adanya interaksi antara integrin dengan berbagai material ekstra sel, akan menimbulkan aktifasi sitosolik kinase, termasuk Src. Protein yang mengalami posporilasi oleh Src disebut *focal adhesion kinase (FAK)*. Setelah terjadi posporilasi FAK oleh Src akan disusul dengan pembentukan pospotirosin residu yang mampu berikatan dengan gugus SH2 dari protein adaptor Grb2. Ikatan antara FAK dengan Grb2 mengaktifasi Ras, meneruskan signal kedalam inti sel melalui jalur MAP-kinase dan mendorong timbulnya proses transkripsi oleh gene yang berperan pada pertumbuhan dan proliferasi sel⁹.

Disamping berperan pada transduksi signal, integrin ikut berperan pula dalam proses migrasi sel pada substrat spesifik melalui kemampuannya dalam melakukan ikatan maupun pelepasan diri dengan matriks ekstra sel (*extra cellular matrix = ECM*) secara bergantian²⁵. Pada pengamatan model migrasi diketahui bahwa proses ini terdiri dari beberapa langkah, termasuk ekstensi sel kedaerah baru, melakukan ikatan atau perlekatan dengan ECM, menyusun kekuatan baru

untuk melepaskan diri dari ECM dan melanjutkan siklus gerak yang baru.

EFEKTOR

Setiap reseptor pada membrane sel memiliki protein efektor dan jalur signal tertentu. Efektor berperan dalam amplifikasi (peningkatan) suatu signal yang timbul akibat adanya ikatan suatu ligan dengan reseptor spesifik pada membran sel. Berbagai reseptor, efektor dan jalur signal dapat dilihat pada tabel-1 berikut.

Tabel-1. Reseptor membran, efektor dan jalur signal¹⁴.

Reseptor	Efektor	Jalur signal
G-protein coupled receptors		
Beta adrenergic LH, FSH, TSH	Gs-alpha, adenylyl cyclase	Stimulation of cAMP production, PKA
Glucagon PTH, PTHrP	Ca-ion channels	Calmodulin Ca-ion dependent kinase
ACTH, MSH, GHRH, CRH		
Alpha- adrenergic Somatostatin TRH, GnRH	Gi-alpha Gq, G11	Inhibition of cAMP production Activation of K & Ca-ion channels Phospholipase C, DAG, IP3, PKC, voltage dependent Ca ion channels
Receptor tyrosine kinase		
Insulin, IGF-1 EGF, NGF	Tyrosine kinases, IRS-1 to IRS-4 Tyrosine kinases, ras	MAP kinases, PI3-kinase, RSK Raf, MAP kinases, RSK
Cytokine receptor-linked kinase		
GH, PRL	JAK, tyrosine kinases	STAT, MAP kinase, PI3 kinase, IRS-1, IRS-2
Serine Kinase		
Activin, TGF-beta, MIS	Serine kinase	Smads

SECOND MESSENGER.

Cyclic-AMP (cAMP)

Apabila terjadi ikatan antara hormon dengan reseptor spesifik selanjutnya akan diikuti dengan timbulnya perubahan didalam sel. *Cyclic-AMP (cAMP)* yang bekerja sebagai *second messenger* merupakan satu substansi yang dilepaskan oleh membran sitoplasma setelah terjadinya ikatan hormon dengan reseptor spesifiknya. Peningkatan cAMP dalam sel sangat mungkin terkait dengan adanya peningkatan ion-kalsium maupun peningkatan aktivitas *adenylyl cyclase*. Ikatan sebuah molekul hormon pada reseptornya dapat memicu aktifitas sejumlah

molekul *adenylyl cyclase*. Aktifitas *adenylyl cyclase* juga terjadi oleh adanya protein Ca-ion kalmmodulin kinase²⁶. Oleh karena memberikan pengaruh terhadap timbulnya reaksi berkelanjutan dalam sel, maka *adenylyl cyclase* disebut pula sebagai efektor. Setiap *adenylyl cyclase* dapat memproduksi cAMP dalam jumlah yang besar dalam waktu yang pendek. Dengan demikian adanya produksi secara masal dari *second messenger* akan mampu memperbesar pengaruh transduksi signal dari pesan aslinya.

Sekali cAMP terbentuk, molekul tersebut akan berdifusi kedalam sitoplasma, berikatan dengan *allosteric site* subunit regulator dari *cAMP-dependent specific protein kinase* yang disebut sebagai PKA. Pada keadaan normal subunit regulator akan mencegah aktifitas dari enzim. Adanya ikatan cAMP terhadap subunit tersebut akan menyebabkan disosiasi subunit regulator dan terlepasnya subunit katalitik dari PKA. Bentuk aktif akan berpengaruh terhadap substrat target PKA dan memicu timbulnya fosforilasi enzim target yang merupakan peristiwa penambahan satu group pospat pada residu serin spesifik pada enzim tersebut dan memicu aktifitas enzim yang bersangkutan²⁷. Meskipun pengaruh cAMP yang segera timbul terjadi dalam sitoplasma, ternyata inti sel ikut terlibat pula pada aktifitas ini. Fraksi molekul PKA yang aktif dapat bertranslokasi kedalam inti dan mampu melakukan fosforilasi protein inti kunci yang disebut sebagai CREB (cAMP response element-binding protein). Fosforilasi CREB sebagai dimer akan berikatan dengan suatu tempat di DNA yang disebut sebagai CRE (cAMP response element) yang terdapat pada regio regulator suatu gene yang berperan memberikan tanggapan terhadap peningkatan cAMP.

Untuk menjaga suatu keseimbangan siklus aktifitas, setelah suatu reaksi berlangsung maka diperlukan adanya reaksi balik. Enzim fosfatase dalam sel mampu melepaskan group pospat dari suatu enzim yang telah mengalami fosforilasi oleh protein kinase sehingga enzim menjadi

inaktif. Demikian pula dengan adanya enzim cAMP fosfodiesterase yang mampu merusak cAMP akan membantu mengakhiri reaksi berantai tersebut⁹.

Ion-kalsium

Ion-kalsium mampu bekerja sebagai *second messenger*. Reseptor hormon yang mengaktifasi siklus pospatidilinositol (PI), meneruskan transduksi signal melalui dua *second messenger* yakni DAG dan ion-Ca²⁸. Ion ini memegang peran penting pada sejumlah aktifitas sel seperti pembelahan sel, sekresi berbagai protein, endositosis, kegiatan metabolisme dalam sel serta pergerakan sel. Ion-kalsium mempunyai struktur yang sangat berbeda dengan suatu nukleotide ataupun pospatase inositol yang disintesa maupun didegradasi secara ensimatik. Konsentrasi ion ini didalam sitosol diatur oleh suatu mekanisme yang kompleks, melibatkan transporter ion-kalsium ataupun kanal ion yang terdapat dalam membran sel atau membran organel dalam sitoplasma^{29,30,31}.

Tergantung dari jenis sel, maka ion-kalsium dapat meningkatkan atau menghambat aktifitas berbagai enzim, sistem transport, permeabilitas membran sel, struktur dan fungsi sitoskeleton. Dalam melakukan respon spesifik ini ion kalsium pada umumnya akan berikatan dengan sejumlah *calcium-binding protein* diantaranya adalah kalmodulin (*calmodulin*). Pada saat terjadi peningkatan konsentrasi ion kalsium dalam sitoplasma, kemudian akan disusul dengan ikatan dengan kalmodulin. Ikatan tersebut akan merubah konformasi dari protein sehingga terjadi peningkatan afinitas dengan berbagai efektor. Tergantung dari macam sel, maka kalsium-kalmodulin kompleks akan berikatan dan mengaktifasi protein kinase ataupun *cyclic nucleotide phosphodiesterase*, mempengaruhi kanal ion atau bahkan sistem transport ion kalsium sendiri. Pengaruh kalsium-kalmodulin kompleks terhadap kanal ion dan sistem transport ion berguna untuk mempertahankan konsentrasi ion

kalsium dalam sitoplasma tetap dalam konsentrasi yang fisiologis.

Lipid derived second messenger

Membran sel merupakan suatu lipid bilayer. Fosfolipid dari membran sel dapat dipecah menjadi *second messenger* oleh aktifitas enzim fosfolipase, yang merupakan suatu enzim hidrolitik. Terdapat berbagai macam *second messenger* yang berasal dari fosfolipid membrane sel, diantaranya adalah yang berasal dari PI. PI segera mengalami fosforilasi dan berubah menjadi fosfoinositid. Cincin inositol dari fosfoinositid mempunyai enam atom karbon terletak pada permukaan polar bagian dalam dari membran sel. Sejumlah enzim fosfoinositid-kinase yang terdapat pada sel yang bersangkutan akan melakukan fosforilasi atom karbon tersebut. Enzim fosfoinositid kinase antara lain PI3-kinase, PI4-kinase dan PI5-kinase, yang mampu memindahkan pospat dari ATP secara berturut-turut pada posisi ke 3,4, dan 5 dari cincin inositol⁹. Sebagai contoh apabila group pospat tunggal dipindahkan pada posisi keempat cincin inositol dari PI oleh enzim PI4-kinase, akan membentuk PI4-pospatase (PIP) yang selanjutnya akan mengalami fosforilasi kembali oleh PI5-kinase menjadi bentuk PI4,5-pospatase (PIP2) yang juga dapat mengalami fosforilasi oleh IP3-kinase menjadi bentuk PI3,4,5-pospatase (PIP3).

Fosforilasi cincin inositol dari fosfoinositid akan berikatan dengan molekul tambahan dari protein target yang disebut sebagai domain-PH. Ikatan antara suatu protein dengan *messenger* PIP2 atau PIP3 akan membawa protein tersebut ke permukaan dalam membran sel yang selanjutnya akan berinteraksi dengan protein lain yang berikatan dengan membran sel.

Apabila terjadi ikatan suatu ligan dengan reseptornya akan mengaktifkan G-protein yang mendorong peningkatan aktifitas efektor *phosphatidylinositol-specific phospholipase c-beta* (PI-PLC-beta). PI-PLC-beta melakukan reaksi katalisis yang akan memecah PIP-2 menjadi dua

molekul Inositol 1,4,5-trispospat (IP3) dan diacylglycerol (DAG)³².

Diacylglycerol (DAG).

Merupakan molekul lemak yang tetap berada pada membran plasma setelah dibentuk oleh PI-PLC-beta. DAG akan mengaktifasi efekturnya yakni suatu protein kinase-C yang selanjutnya akan mengadakan fosforilasi residu serin dan treonin dari berbagai protein targetnya. Keadaan ini selanjutnya akan kembali mengaktifasi masing-masing protein target tersebut³³.

Inositol 1,4,5,-trispospat (IP3)

IP3 merupakan suatu pospat gula, suatu molekul yang sangat kecil, larut dalam air sehingga mempunyai kemampuan yang tinggi untuk berdifusi secara cepat. Molekul IP3 dibentuk dimembran sel dan segera berdifusi kedalam sitoplasma dan akan berikatan dengan reseptor-IP3 yang terletak pada dinding retikulum endoplasmik. Reseptor-IP3 merupakan suatu kanal kalsium-tetramerik. Ikatan IP3 dengan reseptornya akan diikuti dengan terbukanya kanal ion tersebut dan diikuti dengan masuknya ion kalsium kedalam sitoplasma³².

RESEPTOR PADA INTI SEL

Telah teridentifikasi sekitar 100 anggota yang termasuk dalam keluarga reseptor inti (*nuclear receptors*). Sebagian masih dikelompokkan kedalam *orphan receptor* mengingat bahwa ligand dari reseptor ini masih belum teridentifikasi. Sebagian lain reseptor ini diklasifikasi berdasar atas ligand yang berikatan dengannya.

Sebagian besar reseptor inti berikatan dengan DNA dalam bentuk dimer. Sebagai akibatnya setiap monomer akan mengenali hanya satu DNA, yang merupakan "satu" sisi dari reseptor tersebut. Tempat ikatan (domain) dengan DNA terdiri dari dua jari Zn, berhubungan dengan DNA spesifik yang dikenal dari gene

target. Ikatan *nuclear receptor* dengan ligand akan diikuti dengan peningkatan atau penurunan transkripsi protein¹⁴.

FUNGSI SITOSKELETON PADA TRANSDUKSI SIGNAL

Tempat Aktivitas Ensimatik

Berbagai protein ensim terikat pada jaringan sitoskeleton. Protein-protein tersebut antara lain: ensim glikolitik, beberapa protein kinase serta pospolipase maupun lipid kinase¹.

Ensim glikolitik sejak lama telah diketahui merupakan protein yang berikatan dengan sitoskeleton³⁴. Meskipun ensim ini pada umumnya tidak berperan penting pada transduksi signal, terikatnya ensim ini pada sitoskeleton dapat dijadikan sebagai model bagaimana suatu transduksi signal dapat dianalisa.

Berbagai isoensim protein kinase C (PKC) berikatan dengan filamen aktin. Ikatan ini memberikan arti penting dalam proses translokasi PKC- α ke-inti sel. Sedangkan pada beberapa isoensim yang terdapat pada sitoplasma atau membran plasma, terikatnya ensim tersebut pada filamen aktin akan mendorong peningkatan aktifitas ensimatiknya³⁵. PKC- β II yang pada umumnya berikatan dengan vimentin akan teraktifasi setelah berikatan dengan filamen aktin³⁶. PKC- ζ akan menuju filamen aktin setelah teraktifasi oleh interleukin-2 (IL-2). Pada keadaan ini ikatan antar PKC dengan filamen aktin tampaknya diperlukan dalam upaya menjaga kestabilan jaringan filamen aktin itu sendiri. Demikian pula PKC- ϵ yang berperan pada pengaturan fungsi sinap, akan berikatan dengan filamen aktin setelah teraktifasi.

Pada sel trombosit, rangsangan trombin akan menimbulkan terjadinya hubungan antara *phospholipase-A2*, *phosphatidylinositol (PI)3 kinase*, *diacylglycerol (DAG) kinase* dan *phospholipase C (PLC)* dengan sitoskeleton selama masa terjadinya polimerisasi filamen aktin^{37,38}. Aktifitas yang tinggi dari PI3 dan PI4

kinase terlihat ketika enzim ini berikatan dengan fraksi sitoskeleton³⁷. Disamping sebagai tempat aktifitas enzim, ternyata bahwa beberapa protein sitoskeleton, mampu mengganggu aktifitas lipid kinase maupun lipase yang berikatan dengan jaringan sitoskeleton khususnya filamen aktin³⁹.

Dari berbagai data tersebut terlihat bahwa sitoskeleton ikut berperan baik pada aktivasi maupun deaktivasi dari berbagai protein enzim

Jalur Signal

Untuk mengetahui peran sitoskeleton pada transduksi signal pada umumnya digunakan berbagai bahan spesifik yang mampu mempengaruhi masing-masing filamen dari sitoskeleton secara spesifik pula. Sitokalsin akan merusak filamen aktin, kolkisin merusak mikrotubulus sedangkan akrilamid akan merusak filamen antara¹. Dengan merusak salah satu filamen dengan bahan spesifik tersebut, maka dapat diamati fungsi dari filamen yang bersangkutan berdasar adanya gangguan aktifitas transduksi signal yang menjadi tanggung jawab filamen tersebut.

Dari hasil analisa yang dilakukan terhadap protein signal, ternyata terdapat interaksi yang sangat erat antara jaringan sitoskeleton dengan jaringan protein signal⁴⁰. Terdapat dua penjelasan yang menerangkan bagaimana sesungguhnya peran sitoskeleton sebagai jalur transduksi signal. Pertama, masing-masing protein jaringan sitoskeleton berperan langsung pada transduksi signal melalui ikatan dengan protein signal. Kedua, sitoskeleton menyediakan berbagai jalur (tangga, scaffold) yang terpisah untuk kaskade transduksi signal².

Pada berbagai tipe sel, signal mekanik merupakan signal utama. Rangsang mekanik berupa gesekan, perlekatan atau tekanan pada permukaan sel selanjutnya dirubah menjadi reaksi biokimia dan segera menimbulkan reaksi sel. Jaringan sitoskeleton tidak hanya mampu mendeteksi namun juga meneruskan signal yang diterimanya kedalam sel. Namun demikian untuk

dapat meneruskan signal tersebut diperlukan struktur tiga dimensi yang elastik yang menghubungkan antara tempat pertama dimana signal mekanik diterima dengan titik tempat dimana perubahan biokimiawi terjadi⁴¹. Salah satu peran sitoskeleton adalah sebagai struktur elastik yang menghubungkan antara tempat terjadinya signal pada membran sel dengan suatu tempat pada organela dalam sitoplasma atau dalam inti sel⁴¹.

Hubungan yang erat antara bentuk sel dan ekspresi genetik secara umum terjadi melalui jalur sitoskeleton. Mengingat bahwa secara fisik sitoskeleton merupakan struktur seluler yang secara langsung menghubungkan permukaan dengan inti sel. Dengan adanya kemampuan sitoskeleton bekerja sebagai sensing mekanik dari sejumlah perlekatan, maka ada adanya kontak fisik yang mampu menghambat pertumbuhan sel diduga difasilitasi oleh jaringan sitoskeleton. Jaringan filamen aktin diduga memegang peran yang penting pada peristiwa tersebut mengingat terjadinya ekspresi berlebihan dari protein yang berikatan dengan aktin, akan menjadikan perlekatan yang terjadi menjadi sangat stabil. Hal ini terbukti pada kejadian kerusakan inti akibat adanya pemberian tekanan mekanik pada membran plasma¹³. Berbagai perubahan ekspresi protein yang berikatan dengan aktin sering terlihat sebagai gambaran adanya transformasi oleh sejumlah onkogen⁴².

PENGARUH HIPERGLIKEMIA PADA FUNGSI SITOSKELETON

Salah satu petanda khas dari DM adalah adanya hiperglikemi serta adanya defisiensi insulin relatif maupun absolut. Keadaan ini mampu mempengaruhi berbagai struktur maupun fungsi jaringan, termasuk struktur dan berbagai protein dalam sel. Setidaknya terdapat enam jalur biokimia yang terkait dengan pembentukan spesies oksigen radikal (ROS) pada hiperglikemia. Peningkatan ROS sendiri terbukti ikut

bertanggung jawab terhadap kerusakan struktur maupun fungsi sel. Hiperglikemi akan meningkatkan metabolisme sorbitol yang langsung meningkatkan produksi ROS. Melalui jalur peningkatan sintesa glukose-6P akan dilanjutkan dengan peningkatan produksi fruktose 1,6 bisP yang akan mendorong peningkatan sintesa glukosamine, dehidrooksiaseton dan gliseraldehid. Peningkatan dehidrooksiaseton akan diikuti dengan peningkatan gliserol-3P, diasilgliserol (DAG) dan aktivasi protein PKC yang seterusnya meningkatkan produksi ROS. Peningkatan sintesa gliseraldehid-3P diikuti dengan meningkatnya produksi enediol, 1:3 bis-P gliserat dan metiglioksal. Pembentukan enediol akan diikuti pembentukan α -ketoaldehid, sedangkan peningkatan 1:3 bis-P gliserat akan diikuti dengan peningkatan pembentukan piruvat, sedangkan meningkatnya metiglioksal akan diikuti peningkatan proses glikasi. Baik α -ketoaldehid, piruvat dan proses glikasi akan meningkatkan pembentukan ROS⁴³.

Proses glikosilasi yang terjadi pada berbagai molekul akan menghasilkan *advances glycation end products (AGEs)*. Hal ini merupakan salah satu penjelasan yang dapat menerangkan pengaruh hiperglikemi pada jaringan maupun sel⁴⁴. AGEs ditandai dengan timbulnya *cross linking serta chromogenicity* yang luas⁴⁵. Salah satu target istimewa proses glikosilasi ditingkat sel adalah sitoskeleton filamen aktin kortikal. Glikosilasi dari protein sitoskeletal berakibat timbulnya ketidakstabilan plasmalemma dan menimbulkan gangguan kemampuan transduksi mekanik⁴⁶.

Penelitian pada kultur sel didapatkan bahwa glukosa yang tinggi mempengaruhi regulasi jaringan filamen aktin kortikal melalui modulasi siklus Cdc-42 endogen⁴⁴. Dengan adanya glikosilasi Cdc-42 akan terjadi depolimerisasi sementara dari aktin kortikal. Cdc-42, Rho dan Rac termasuk dalam superfamili Ras yang terlibat pada regulasi jaringan filamen aktin dan memegang peran penting pada peristiwa

adesi, migrasi, pagositosis, sitokinesis dari sel. Peran lain dari Cdc42 adalah pengaruhnya terhadap perubahan morfologi seperti pembentukan baru lamelipodia maupun filopodia^{8,47,48}. Hiperglikemia meningkatkan sintesa sorbinil yang dilanjutkan dengan meningkatnya diasilgliserol (DAG). Melalui perannya pada PKC- β II, DAG akan meningkatkan aktifitas pospatidilinositol-3 kinase (PI3K) yang selanjutnya melalui jalur Akt mengaktifasi jalur Raf dan MEK1/2 mendorong pembentukan filopodia. Selain melalui jalur Akt, PI3K juga mengaktifasi FAK mendorong peningkatan dan melalui aktivasi protein kinase N (PKN), mendorong pembentukan lamelipodia. Peningkatan aktifitas DAG melalui jalur Ras, Raf, MEK1/2, ERK1/2 selanjutnya mendorong pembentukan filopodia⁸. Lamelipodia maupun filopodia ikut berperan pada proses pergerakan sel⁴⁹. Sel yang bergerak mengalami polarisasi, salah satu bagian menjadi melebar membentuk lamelipodia, terjadi pula pembentukan filopodia. Pada proses ini sitoskeleton aktin akan terorganisir sepanjang sumbu sel memfasilitasi pergerakan, sedangkan filopodia berperan sebagai sensor pengarah gerak⁴⁹.

Pengaruh hiperglikemi terhadap filamen aktin dapat pula terjadi melalui peningkatan aktifitas protein kinase C- α (PKC- α). Hasil penelitian ini menunjukkan peran PKC- α pada remodeling filamen aktin⁵⁰. Pada *cell-line* tubulus proksimal yang diberikan inhibitor PKC ternyata menunjukkan adanya penurunan yang sangat berarti dari pembentukan kluster filamen aktin.

Hiperglikemi tidak hanya berpengaruh terhadap filamen aktin. Dengan menggunakan label imunofluoresen (*immunofluorescent labeling*) terlihat bahwa paparan hiperglikemi pada sel akan menurunkan densitas tubulin- β , yang merupakan komponen terbesar dari mikrotubulus⁷.

Pengaruh hiperglikemi pada filamen aktin maupun mikrotubulus ternyata terkait pula dengan adanya defisiensi insulin. Insulin juga memegang

peran kunci pada fungsi organisasi jaringan mikrofilamen aktin⁵¹, disamping juga berpengaruh terhadap mikrotubulus⁵². Insulin mempunyai pengaruh pada regulasi tonus dari *two Ca²⁺ independent K⁺ currents* pada miosit ventrikel tikus diabetes. Pada penelitian invitro, adanya defisiensi insulin akan menurunkan tonus hubungan keduanya yang dapat diperbaiki dengan penambahan insulin pada kultur jaringan tersebut. Perbaikan yang terjadi ternyata dapat dihambat dengan pemberian sitosalsin, suatu bahan yang menghambat pembentukan filamen aktin, maupun pemberian kolkisin yang menghambat pembentukan mikrotubulus⁵³. Hal ini membuktikan bahwa insulin mampu mendorong terbentuknya jaringan filamen aktin maupun mikrotubulus baru.

Pengaruh hiperglikemia pada protein signal pada umumnya akan meningkatkan ekspresi maupun aktifitas protein tersebut. Peningkatan ekspresi dan aktifitas PKC- α terbukti berpengaruh pada remodeling sitoskeleton, khususnya filamen aktin⁵⁰. Hal ini mungkin akan memberikan pengaruh yang baik terhadap fungsi sitoskeleton.

Mengingat bahwa hiperglikemi juga memberi kemungkinan perbaikan sitoskelton melalui proses remodeling sitoskeleton, apakah keadaan hiperglikemia dan defisiensi insulin pada DM yang mempengaruhi struktur sitoskeleton akan mengganggu peran sitoskeleton dalam memfasilitasi transduksi signal?.

KESIMPULAN

Sitoskeleton merupakan suatu jaringan yang kompleks, terdiri dari tiga struktur mikrofilamen (*aktin filament*), filamen antara (*intermediate filament*) dan mikrotubulus. Luasnya permukaan filamen sitoskeleton dan sifatnya yang bermuatan negatif memungkinkan terjadinya perlekatan berbagai macam protein yang berkeja sebagai enzim. Sejumlah penelitian menunjukkan adanya kaitan yang sangat erat

antara filamen sitoskeleton dengan protein signal, yang menunjukkan bahwa sitoskeleton memegang peran yang penting pada proses transduksi signal.

Hiperglikemi ternyata mempengaruhi struktur berbagai filamen sitoskeleton. Disamping hal tersebut, hiperglikemia juga berpengaruh terhadap ekspresi dan aktifitas berbagai protein yang pada umumnya berikatan dengan sitoskeleton. Diduga bahwa hiperglikemia akan berpengaruh terhadap transduksi signal.

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah pengaruh negatif hiperglikemi pada struktur sitoskeleton, dapat dikompensasi oleh adanya peningkatan ekspresi dan aktifitas berbagai protein, khususnya PKC yang mendorong terjadi remodeling dari sitoskeleton tersebut.

DAFTAR RUJUKAN

1. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.* 1998; 78:763-81.
2. Forgacs G, Yook SH, Janmey PA, Jeong H, Burd CG. Role of cytoskeleton in signaling networks. *J Cell Sci.* 2004; 117:2769-75.
3. Isenberg G, Niggli V. Interaction of cytoskeletal protein with membrane lipids. *Int Rev Cytol.* 1998; 178:73-125.
4. Shafir Y, Ben-Avraham D, Forgacs G. Trafficking and signaling through the cytoskeleton: a specific mechanism. *J Cell Sci.* 2000.; 113:2747-57.
5. Forgacs G. Biological specificity and measurable physical properties of cell surface receptors and their possible role in signal transduction through the cytoskeleton. *Biochem Cell Bio.* 1995; 73:317-26.
6. Forgacs G. On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular

- signaling: an approach based on percolation. *J Cell Sci.* 1995; 108:2131-43.
7. Shimoni Y, Rattner B. Type 1 diabetes leads to cytoskeleton change that are reflected in insulin action on rat cardiac K⁺ currents. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281:E575-85.
 8. Campbell M, Trimble ER. Modification of PI3K- and MAPK-dependent chemotaxis in aortic vascular smooth muscle cells by Protein Kinase C-βII. *Circ Res.* 2005; 96:197-206.
 9. Karp G. *Cell and molecular biology.* 3rd edition. John Wiley & Son. New York. 2002; pp: 333-96.
 10. Stossel TP. The machinery of cell crawling. *Sci Am.* 1994; 271:55-63.
 11. Kessels MM, Qualmann B. The sundapin protein family: linking membrane trafficking with cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2004; 117:3077-86.
 12. Gao YS, Sztul E. A novel interaction of the golgi complex with vimentin intermediate filament cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2001; 152:877-93.
 13. Guilak F. Compression induce changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech.* 1995; 28:1529-41.
 14. Jameson JL. Principles of endocrinology. In: *Harrison Principles of Internal Medicine.* 16th Ed. Editors: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. 2005; pp:2067-75.
 15. Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, Fontilla-Poole M, et al. Identification of a novel extracellular cation sensing G-protein coupled receptor. *JBC*, (papers in press) . 2005.
 16. Sprang SR. G protein mechanism: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem.* 1997; 66:639-78.
 17. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 1998; 273:669-72.
 18. Farfel Z, Bourne HP, Iiri T. The expanding spectrum of G protein disease. *NEJM.* 1999; 340:1012-20.
 19. Krause DS Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *NEJM.* 2005; 353:172-87.
 20. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell.* 2004; 13:169-78.
 21. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000; 13:211-25.
 22. Saltiel AR. Putting the brakes on Insulin signaling. *NEJM.* 2003; 349:2560-62.
 23. Gilliland BC. Principles of endocrinology. In: *Harrison Principles of Internal Medicine.* 16th Ed. Editors: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. 2005; pp:1979-90.
 24. Yasphal NK, Li J, Wheeler MB, Wang R. Expression of β1 integrin receptors during rat pancreas development – sites and dynamics. *Endocrinology.* 2004 (abstract); 146:1798-1807.
 25. Nishizaka T, Shi Q, Sheetz MP. Position dependent linkages of fibronectin-integrin-cytoskeleton. *PNAS.* 2000; 97:692-97.
 26. Malaisse WJ. Malaisse-Lagae F. The role of cyclic AMP in insulin release. *Experienta.* 1984; 40:1968-75.
 27. Jones PM, Persaud SJ. 1998. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic β-cells. *Endocr Rev;* 19:429-61.
 28. Gill GN. Principles of endocrinology. In: *Cecil Text-book of Medicine.* 22nd Ed. Editor: Goldman L, Ausiello D. Saunders-International Edition. . 2004; pp: 1348-56.

29. Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB. Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Diabetes*. 2002; 51:3461-67.
30. Sharma K, Deelman L, Madesh M, et al. Involvement of transforming growth factor- β in regulation of calcium transients in diabetic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285:F1258-70.
31. Samii S, Khan MH, Mc Lean DA, King N, Herr MD, Sinoway LI. Muscle interstitial calcium during head-up tilt in humans. *Circulation*. 2004; 109:215-19.
32. Henquin JC. Cell biology of insulin secretion. In: *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14ed. Editors: Kahn CR, Weir GC, King GL,acobson AM, Moses AC, Smith RJ. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia. 2005; pp: 83-107.
33. Zawulich WS, Zawulich KC. Regulation of insulin secretion via ATP sensitive K⁺-channel independent mechanism: role of phospholipase C. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1997; 272:E671-77.
34. Arnold H, D-Pette. Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase. *Eur J Biochem*. 1970; 15:360-66.
35. Zalewski PD, Forbes IJ, Giannakis C, Betts WH. 1991. Regulation of protein kinase C by Zn²⁺-dependent interaction with actin. *Biochem Int*; 24:1103-10.
36. Blobe GC, Stribling DS, Fabbro D, Stabel S, Hannun YA. Protein kinase beta-II specifically binds to and is activated by F-actin. *J Biol Chem*. 271. 1996;15823-30.
37. Grondin P, Plantavid M, Sultan C, Breton M, Mauco G, Chap H. Interaction of pp60c-scr, phospholipase-C, inositol lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeletons of thrombin stimulated platelets. *J Biol Chem*. 1991; 266:15705-09.
38. Banno Y, Nakasihima S, Ohzawa M, Nozawa Y. Differential translocation of phospholipase-C isoenzymes to integrin-mediated cytoskeletal complexes in thrombin-stimulated human platelets. *J Biol Chem*. 1996; 271:14989-94.
39. Goldschmidt CP, Machesky LM, Baldassare JJ. The actin binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*. 1990; 247:1575-78.
40. Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2000; 403:623-27.
41. Maniotis AJ, Chen SC, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1997; 94:849-54.
42. Janmey P, Chaponier C. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7:111-17.
43. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004; 279:42351-54.
44. Ghitescu L, Gugliucci A, Dumas F. Actin and annexins I and II are among the main endothelial plasmalemma-associated proteins forming early glucose adducts in experimental diabetes. *Diabetes*. 2001; 50:1666-74.
45. Monnier V, Sell D, Ramanakoppa H, Nigara J, Miyata S, Grandhee, Odetti P, Ibrahim SA. Maillard reaction mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging and uremia. *Diabetes*. 1992; 41 (Suppl.2):36-41.
46. Nevins AK, Thurmond DC. Glucose regulates the cortical actin network through modulation of Cdc42 cycling to stimulate insulin

- secretion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285:C698-710.
47. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998; 279:509-14.
 48. Gasman S, Chasserot-Golaz S, Popoff MR, Bader MF. Involvement of Rho GTPases in calcium regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci.* 1999; 112:4763-71.
 49. Yamboliev IA, Gerthoffer WT. Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF stimulated migration of culture pulmonary artery SMCs. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280:C1680-88.
 50. Hryciw DH, Pollock CA, Poronnik P.. PKC- α mediated remodeling of the actin cytoskeleton is involved in constitutive albumin uptake by proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 (abstract); 288:F1227-35.
 51. Khayat ZA, Tong P, Yaworsky K, Bloch RJ, Klip A. Insulin induced actin filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubules. *J Cell Sci.* 2000; 113:279-90.
 52. Caron JM. Alteration of microtubule physiology in hepatocytes by insulin. *J Cell Physiol.* 1989; 138:603-10.
 53. Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W. Insulin stimulation of rat ventricular K⁺ currents depends on integrity of the cytoskeleton. *J Physiol (Lond).* 1999; 514:735-4