

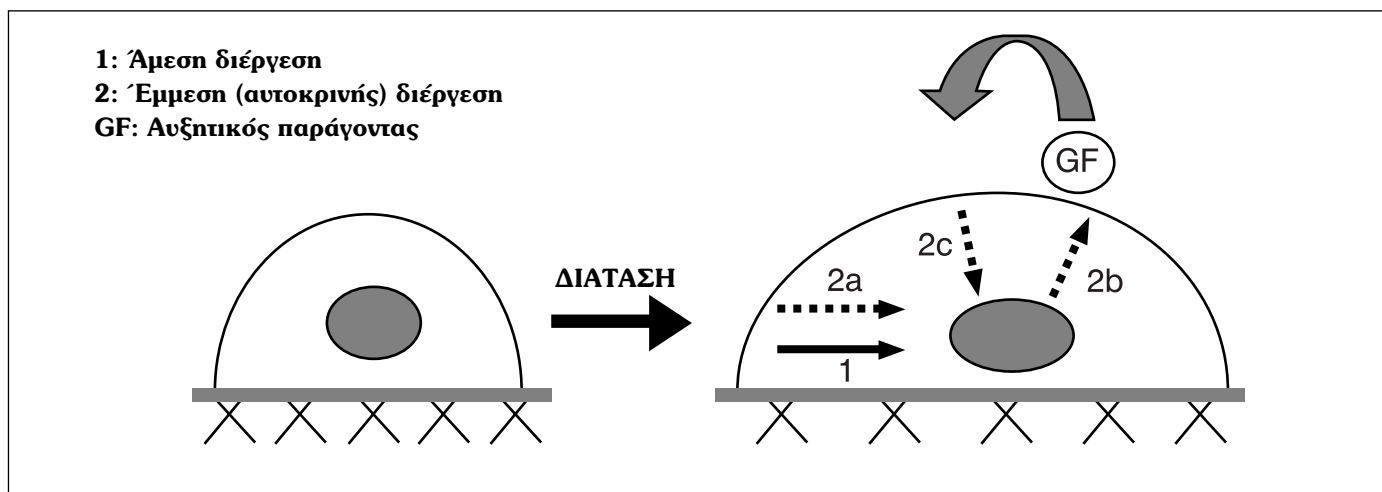
## ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΗΧΑΝΟΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Δ. ΚΛΕΤΣΑΣ  
Γ. ΣΑΠΚΑΣ

Η οστεογένεση, τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όσο και στην ενήλικη ζωή, απαιτεί τον αυστηρότατο έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Η ρύθμιση των διεργασιών αυτών περιλαμβάνει την έκφραση ιστο-εξειδικευμένων γονιδίων που διεγείρονται από ένα μεγάλο φάσμα “ερεθισμάτων”, όπως οι αυξητικοί παράγοντες ή οι ορμόνες<sup>16</sup>. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι οι μηχανικές δυνάμεις αποτελούν ένα σημαντικότερο ρυθμιστικό παράγοντα της οστικής ομοιοστασίας. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η οστική μάζα μειώνεται μετά από μακροχρόνια κατάκλιση, ενώ αυξάνει μετά από παρατεταμένη άσκηση<sup>12</sup>. Κατά συνέπεια, η χρήση των μηχανικών δυνάμεων αποτελεί μέρος πολλών θεραπευτικών στρατηγικών στην ορθοπαιδική. Όμως η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τα φαινόμενα αυτά είναι ακόμη εν τω γεννάσθαι.

Οι ακριβείς μηχανισμοί, λοιπόν, που καθορίζουν τη μετατροπή των μηχανικών δυνάμεων σε βιοχημικές αποκρίσεις και τελικά σε εξειδικευμένη γονιδιακή έκφραση παραμένουν ακόμη ασαφείς. Παρόλα αυτά νεότερες μελέτες έχουν προσθέσει αρκετά στοιχεία προς αυτή την κατεύθυνση. Παραδείγματος χάριν, οι “μηχανοευαίσθητοι” υποδοχείς πρέπει να βρίσκονται εντός ή σε στενή σχέση με την πλασματική μεμβράνη, ώστε να αντιλαμβάνονται τις δυνάμεις και να μεταδίδουν τα κατάλληλα σήματα στον πυρήνα<sup>7</sup>. Επίσης, η μηχανική διέγερση αυξάνει την ευαισθησία και τον αριθμό καναλιών ιόντων στη μεμβράνη<sup>4</sup>, καθώς και την έκφραση των ιντεγκρινών, των διαμεμβρανικών -δηλαδή- υποδοχέων που συνδέουν τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας με τον κυτταροσκελετό<sup>2</sup>. Σημειώνεται ότι η ακεραιότητα του τελευταίου είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος των μηχανικών δυνάμεων<sup>18</sup>, ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζουν και τα μέλη της οικογένειας των Rho GTPases που εστιάζονται πλησίον της πλασματικής μεμβράνης<sup>17</sup>. Πρέπει, όμως, να αναφερθεί ότι οι μηχανισμοί αυτοί είναι εξειδικευμένοι για το είδος του μηχανικού ερεθίσματος και το “κύτταρο-στόχο”.

Όσον αφορά στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ένας από τους κύριους ρυθμιστές είναι ο μεταγραφικός παράγων Cbfa1 (core-binding factor)<sup>3</sup>, ο οποίος προσδέεται στην περιοχή OSE2 (osteoblast-specific element), που βρίσκεται στην περιοχή του προαγωγού (promoter) των κυριότερων γονιδίων των οποίων η έκφραση χαρακτηρίζει τους οστεοβλάστες (π.χ. τα υπεύθυνα για την έκφραση της οστεοκαλσίνης, του κολλαγόνου τύπου I, της αλκαλικής φωσφατάσης και της κολλαγονάσης 3)<sup>3,6,8,20</sup>. Ένας άλλος σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών είναι ο AP-1 (activating protein-1), ο οποίος ενέχεται στη ρύθμιση των ίδιων “οστεοβλαστικών” γονιδίων με τον Cbfa1<sup>5</sup>. Ο AP-1 είναι ένα ομο-/ετεροδιμερές σύμπλοκο, που σχηματίζεται από μέλη των οικογενειών των μεταγραφικών παραγόντων Fos και Jun, και ρυθμίζει τη γονιδιακή μεταγραφή προσδεδεμένο σε ειδικές περιοχές που ονομάζονται TREs (TPA-responsive elements)<sup>19</sup>. Ο AP-1



**Εικόνα 1.** Η στατική μηχανική διάταση επάγει τον πολλαπλασιασμό σε οστεοβλαστικά κύτταρα με ένα άμεσο τρόπο και όχι έμμεσα μέσω της έκκρισης αυτοκρινών αυξητικών παραγόντων.

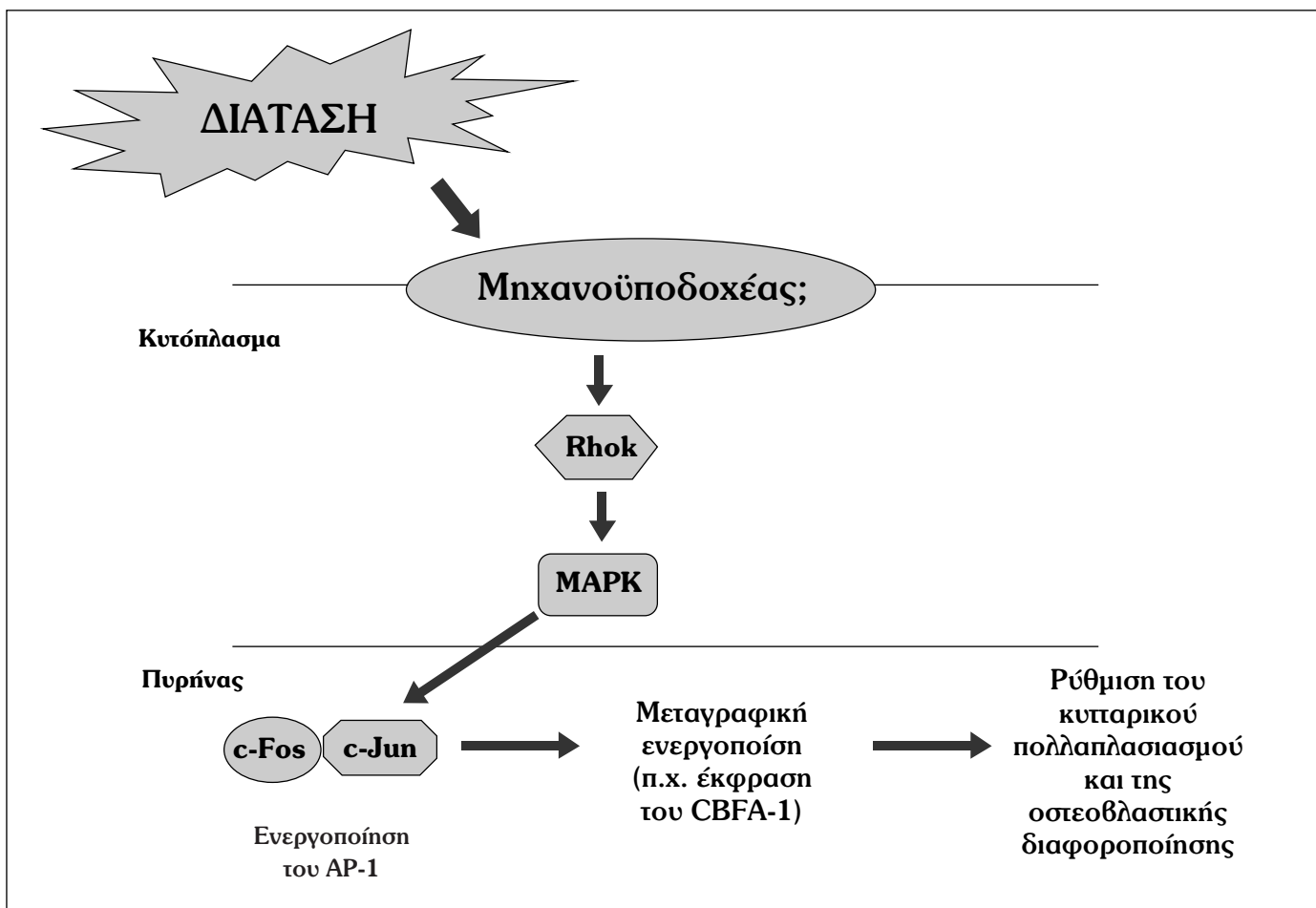
είναι επίσης ένας σημαντικός διαμεσολαβητής της άμεσης κυτταρικής απόκρισης σε εξωτερικά ερεθίσματα<sup>9</sup>. Αμέσως μετά την ενεργοποίηση από ένα πλήθος παραγόντων (αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες, ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία) αυξάνει η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των οικογενειών Fos και Jun, οι οποίες στη συνέχεια υπόκεινται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (κυρίως φωσφορυλίωση) απαραίτητες για το σχηματισμό του συμπλόκου AP-1<sup>9</sup>. Από τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (signaling pathways) που αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα και οδηγούν σε φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση του AP-1 πιο σημαντικά είναι τα μονοπάτια της οικογένειας των MAPK (mitogen-activated protein kinases), δηλαδή οι ERK (extracellular signal-regulated kinases; p42-p44), οι SAPK/JNK (stress-activated protein kinase, c-Jun N-terminal kinase; p46-p54/55) και η p38<sup>15</sup>. Είναι ενδιαφέρον ότι ανάμεσα στους τελεστές που οδηγούν σε ενεργοποίηση των MAPKs είναι και μέλη της οικογένειας των Rho GTPases, που όπως αναφέρθηκε ενεργοποιούνται ως αποτέλεσμα της εφαρμογής μηχανικών δυνάμεων.

Στόχος της ερευνητικής μας ομάδας υπήρξε η μελέτη της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και Cbfa1 ως συνέπεια μηχανικής διέγερσης, καθώς και η ανεύρεση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενέχονται στη ρύθμιση αυτή. Για το λόγο αυτό απομονώθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων που υπόκεινται σε οστεοβλαστική διαφοροποίηση (human periodontal ligament fibroblasts) και καλλιιεργήθηκαν σε τρυβλία με εκτατούς πυθμένες. Τα τρυβλία τοποθετούνται επί σφαιρικών επιφανειών και με την προσθήκη βάρους στο επάνω μέρος τους ο πυθμένας εκτείνεται. Έτσι, τα κύτταρα υφίστανται μία στατική μηχανική διάταση (static

mechanical stretching) κατά περίπου 2,5%<sup>1</sup>.

Αρχικά μελετήθηκε το αποτέλεσμα της εφαρμογής αυτής της στατικής μηχανικής διάτασης σε ένα ιδιαίτερα σύνθετο φαινόμενο, τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έτσι, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε διάταση για διάφορα χρονικά διαστήματα από 1 έως 6 ώρες και στη συνέχεια αφέθηκαν σε ηρεμία και μετά από πάροδο 48 ωρών μετρήθηκε η σύνθεση DNA (ως προαπαιτούμενο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού) με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης τριπλωμένης θυμιδίνης. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι ακόμη και μετά από διάταση 1 ώρας παρατηρείται σημαντική διέγερση του πολλαπλασιασμού, η οποία γίνεται πιο έντονη μετά από παρατεταμένη διάταση<sup>10</sup>. Δεδομένα από άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως λεία μυϊκά κύτταρα στα οποία επίσης οι μηχανικές δυνάμεις διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό, ανέφεραν ότι η διέγερση αυτή δεν είναι άμεση (direct) αλλά έμμεση (indirect), μέσω της έκκρισης αυτοκρινών αυξητικών παραγόντων (autocrine growth factors). Για να μελετήσουμε την πιθανότητα αυτή, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε διάταση και συλλέξαμε το εθισμένο μέσο της καλλιέργειας (conditioned medium), το οποίο εξ ορισμού περιέχει όλους τους εκκρινόμενους από τα κύτταρα παράγοντες και το οποίο μελετήθηκε ως προς την ικανότητά του να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το εθισμένο μέσο από κυτταρικές καλλιέργειες που υπέστησαν διάταση δεν ήταν περισσότερο μοιγόνο από αυτό που προήλθε από καλλιέργειες που ήταν σε ηρεμία, αποδεικνύοντας ότι η μηχανική διάταση επάγει τον πολλαπλασιασμό στα κύτταρα αυτά με ένα άμεσο τρόπο και όχι έμμεσα μέσω της έκκρισης αυτοκρινών παραγόντων (εικόνα 1).

Στη συνέχεια μελετήσαμε το αποτέλεσμα της μηχανικής διάτασης τόσο στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών



**Εικόνα 2.** Μικρής έντασης στατική μηχανική διάταση, μέσω άγνωστων ακόμη “μηχανοϋποδοχέων”, οδηγεί σε ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών των οικογενειών Rho και MAP κινασών, καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και Cbfa1, με τελικό αποτέλεσμα τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.

σηματοδοτικών μονοπατιών όσο και των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και Cbfa1 που - όπως ήδη αναφέρθηκε - καθορίζουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Στην κατεύθυνση αυτή συλλέχθηκαν λύματα κυτάρων που υποβλήθηκαν σε διάταση και μελετήθηκαν με διάφορες βιοχημικές δοκιμασίες (όπως Western analysis, Northern analysis, in-gel kinase assay, electrophoretic mobility shift assay και immunoprecipitations). Με τη χρήση των τεχνικών αυτών δείξαμε ότι μέλη των οικογενειών των Rho και MAP κινασών ενεργοποιούνται ταχύτατα μετά από την εφαρμογή μηχανικής διάτασης<sup>1,20</sup>. Επίσης, παρατηρήσαμε μία έντονη διέγερση της έκφρασης των πρωτεϊνών c-Jun και c-Fos - των μορίων δηλαδή που σχηματίζουν το σύμπλεγμα AP-1 - μόλις 30 min μετά την εφαρμογή της διάτασης<sup>11</sup>.

Για να διερευνήσουμε τη σχέση των φαινομένων αυτών χρησιμοποιήσαμε ειδικούς αναστολείς σηματοδοτικών κινασών. Τα μόρια αυτά μπορούν να διέλθουν μέσω της πλασματικής μεμβράνης και να αναστείλουν με ε-

ξειδικευμένο τρόπο τη δράση κινασών. Έτσι, με τη χρήση των μορίων αυτών διαπιστώσαμε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών c-Jun και c-Fos είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των Rho και MAP κινασών<sup>11</sup> (εικόνα 2).

Διαπιστώσαμε επίσης ότι η μηχανική διάταση επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1<sup>20</sup>. Η διέγερση αυτή παρατηρείται σε επίπεδο πρωτεΐνης 6 ώρες μετά την εφαρμογή της διάτασης, αλλά και σε επίπεδο mRNA μόλις μετά 30 min. Αυτό αποτελεί μία επιπλέον απόδειξη ότι το αποτέλεσμα των μηχανικών δυνάμεων στα κύτταρα αυτά είναι άμεσο και δεν διαμεσολαβείται από αυτοκρινείς παράγοντες, δεδομένου ότι γνωστοί αυξητικοί παράγοντες, όπως οι TGF-β1 και BMP-2, προκαλούν τη μέγιστη διέγερση του mRNA του Cbfa1 2 ώρες μετά τη δράση τους<sup>13</sup>. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ο Cbfa1 μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω φωσφορύλιωσης από τις ενεργοποιημένες από τη διάταση κινάσες ERK (μέλη της οικογένειας των MAPK). Τέλος, η διάταση προκαλεί πρόσδεση του Cbfa1 στο DNA και συγκεκρι-

μένα στην περιοχή OSE2, η οποία όπως ήδη αναφέρθηκε βρίσκεται στην περιοχή του προαγωγού των κυριότερων “οστεοβλαστικών” γονιδίων, γεγονός απαραίτητο για την ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών. Στην ίδια κατεύθυνση (της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης), διαπιστώθηκε ότι μετά από μηχανική διέγερση και ο AP-1 προσδένεται στον προαγωγό του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης<sup>14</sup>.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι μικρής έντασης στατική μηχανική διάταση, μέσω άγνωστων ακόμη “μηχανοϋποδοχών”, οδηγεί σε άμεση ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών των οικογενειών Rho και MAP κινασών, που καταλήγει στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και Cbfa1, με τελικό αποτέλεσμα τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (εικόνα 2). Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος είναι ένας από τους κατ’εξοχήν ιστούς στους οποίους οι μηχανικές δυνάμεις παίζουν σημαντικότατο ρόλο, τόσο στη διαφοροποίησή του όσο και στον εκφυλισμό του. Έτσι, στόχο μας αποτελεί η διερεύνηση των βασικών μηχανισμών που διέπουν τα φαινόμενα αυτά. Συγκεκριμένα, μελετάμε τη διέγερση ενδοκυτταρικών μονοπατιών μετά από μηχανική διέγερση πρωτογενών καλλιέργειών από ινώδη δακτύλιο (annulus fibrosus) και ημικτοειδή πυρήνα (nucleus pulposus), την έκκριση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους. Ιδιαίτερα δε ενδιαφερόμαστε για το ρόλο της γήρανσης στις διεργασίες αυτές. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιούμε πλέον μία διάταση με την οποία επάγουμε τα κύτταρα σε κυκλική διάταση-χαλάρωση (cyclic stretching), με ελεγχόμενη ένταση και συχνότητα. Ήδη, πρόδρομα πειράματα έδειξαν ότι - σε αντίθεση με τους οστεοβλάστες - τα κύτταρα του βόειου μεσοσπονδύλιου δίσκου μετά από μηχανική καταπόνηση εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που μπορούν να επάγουν αυτοκρινώς τον πολλαπλασιασμό τους (H. Pratsinis, C. Neidlinger-Wilke, D. Kletsas αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Πιστεύουμε ότι οι μελέτες αυτές, που στοχεύουν στην κατανόηση βασικών μηχανισμών που διέπουν τη ρύθμιση της ιστικής ομοιοστασίας μέσω των μηχανικών δυνάμεων, μπορεί μελλοντικά να οδηγήσουν σε εξειδικευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις για την αντιμετώπιση εκφυλιστικών ασθενειών, χωρίς τις γνωστές φαρμακολογικές παρενέργειες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Basdra EK, Papavassiliou AG, Huber LA. Rab and rho GTPases are involved in specific response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268:209-213.
2. Cameliet G, Bouillon R. The effect of microgravity on morphology

- and gene expression of osteoblasts in vitro. *FASEB J* 1999; 13:(Suppl)S129-S134.
3. Ducey P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89:747-754.
4. Duncan RL, Hruska KA. Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am J Physiol* 1994; 267:F909-F916.
5. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:40-57.
6. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M. *Cbfa1* isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 1999; 274:6972-6978.
7. Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:575-599.
8. Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. Collagenase 3 is a target of *Cbfa1*, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 1999; 19:4431-4442.
9. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:240-246.
10. Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanical stress induces DNA synthesis in PDL fibroblasts by a mechanism unrelated to autocrine growth factor action. *FEBS Lett* 1998; 430:358-362.
11. Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. Effect of protein kinase inhibitors on the stretch-elicited c-Fos and c-Jun up-regulation in human PDL osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 2002; 190:313-321.
12. Lanyon LE. Functional strain in bone tissue as an objective and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *J Biomech* 1987; 20:1083-1093.
13. Lee KS, Kim YJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC. *Runx2* is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between *Runx2* and *Smad5* induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000; 20:8783-8792.
14. Peverali FA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells. *Mol Med* 2001; 7:68-78.
15. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:180-186.
16. Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukar Gene Expr* 1991; 1:85-89.
17. Schwartz MA, Shattil SJ. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:388-391.
18. Shyy YJ, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:707-713.
19. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996; 74:589-607.
20. Ziros PG, Rojas Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. The bone-specific transcriptional regulator *Cbfa1* is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002; 277:23934-23941.