



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

***"Αποπτωτικοί/αντιαποπτωτικοί μηχανισμοί
οστεοβλαστικών κυττάρων παρουσία
κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων"***

Διδακτορική Διατριβή

ΙΩΑΝΝΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2011



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCES, FACULTY OF BIOLOGY

***“Proapoptotic/antiapoptotic mechanisms
in osteoblasts in the presence of cytokines
and growth factors”***

Ph.D THESIS

TSAGARAKI IOANNA
CHEMIST

ATHENS 2011

Εικόνα εξωφύλλου: Κύτταρα U937 σε συνθήκες απόπτωσης

Αφιερώνεται στις κόρες μου ...

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Κάθε πείραμα αποτελεί ένα μέσον για να αναγκάσουμε τη φύση να μιλήσει,

αν αυτό σχεδιαστεί σωστά, τότε το μόνο πράγμα που έχει να κάνει ο ερευνητής είναι να ακούσει...

George Wald

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Α. Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών.
2. Π. Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας Παν/μιο Αθηνών.
3. Ε. Κ. Τσιλιμπάρη, Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ ‘Δημόκριτος’.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Α. Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών.
2. Ε. Κ. Τσιλιμπάρη, Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ ‘Δημόκριτος’.
3. Π. Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών.
4. Σ. Ευθυμιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας Παν/μιο Αθηνών.
5. Α. Σκορίλας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών.
6. Ι. Τρουγκάκος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών.
7. Ο. Τσιτσιλώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών.

Επιβλέπουσα Ερευνήτρια

Αθ. Τζίνια, Ερευνήτρια Β, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ ‘Δημόκριτος’

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην εκπόνηση της διδακτορική διατριβής πολλοί ήταν εκείνοι που συνέβαλαν για την πραγματοποίησή της και νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω. Ευχαριστώ θερμά τη Δρα Αθηνά Τζίνια, Ερευνήτρια Β' του εργαστηρίου Βιοχημείας και Παθοβιολογίας Εξωκυττάριας Ουσίας για την επιστημονική καθοδήγηση και την υποστήριξή της σε κάθε επίπεδο καθ' όλη τη μακρόχρονη πορεία, όπως επίσης τη Δρα. Ε. Τσιλιμπάρη, Διευθύντρια Ερευνών του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, η οποία πρώτη με εμπιστεύτηκε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, την Καθηγήτρια Α. Γαϊτανάκη και την Αν. Καθηγήτρια Π. Παπαζαφείρη για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και ακόμη τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής Αν. Καθηγητή Σ. Ευθυμιόπουλο, Αν. Καθηγητή Α. Σκορίλα, Επ. Καθηγητή Ι. Τρουγκάκο και Επ. Καθηγήτρια Ο. Τσιντσιλώνη.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και Παθοβιολογίας Εξωκυττάριας Ουσίας για τη συνεργασία και την αντιμετώπιση ποικίλων δυσκολιών που ανέκυπταν στην καθημερινότητά μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μανώλη και Μαρία και την αδερφή μου Γεωργία οι οποίοι στέκονται αρωγοί με κάθε τρόπο και μου συμπαραστέκονται όλα αυτά τα χρόνια. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον Σωτήρη Κωτσιαντή ο οποίος με υποστήριξε με θέρμη και συνέβαλε με κάθε τρόπο, προκειμένου αυτή η πορεία να ολοκληρωθεί και διότι είναι πάντα δίπλα μου.

Ιωάννα Τσαγκαράκη

Αθήνα, Ιούλιος 2011

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

4E-BP	eIF4E-Binding Protein	Πρωτεΐνη πρόσδεσης στον eIF4E
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase	Αδαμαλυσίνη
ADP	Adenosine DiPhosphate	Διφωσφορική αδενοσίνη
AIF	Apoptosis Inducing Factor	Παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης
AGTR2	AnGiotensin II Type 2 Receptor	Υποδοχέας τύπου 2 της αγγιοτενσίνης II
ALP	ALkaline Phosphatase	Αλκαλική φωσφατάση
AMP	Adenosine MonoPhosphate	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
AP-1	Activator Protein-1	Πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1
APAF-1	Apoptosis-Activating Factor-1	Παράγοντας ενεργοποίησης της απόπτωσης-1
APS	Ammonium PerSulfate	Υπερθεϊκό αμμώνιο.
ARD	Ankyrin Repeat Domain	Επικράτεια επαναλήψεων αγκυρίνης
ASK	Apoptosis Signal Regulating Kinase	Κινάση ρυθμιζόμενη από σήμα απόπτωσης
ATF	Activating Transcription Factor	Μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποίησης
ATP	Adenosine TriPhosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	Βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
BMP	Bone Morphogenetic Protein	Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών
BMU	Basic Multicellular Unit/	Βασική πολυκυτταρική μονάδα/
	Bone Metabolic Unit	Μονάδα μεταβολισμού του οστού
BSA	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη βόειου ορού
CAD	Caspase-Activated DNase	Ενεργοποιούμενη από κασπάσες DNάση

cAMP	Cyclic AMP	Κυκλικό AMP
c-FLIP	cellular FLICE Inhibitory Protein	Κυτταρική πρωτεΐνη αναστολής της FLICE
CHX	CycloHeXamide	Κυκλοεξαμίδιο
c-IAP-1,2	cellular Inhibitor of Apoptosis-1,2	Κυτταρικός αναστολέας της απόπτωσης-1,2
CIB	Calcium and Integrin Binding Protein	Πρωτεΐνη δέσμησης ασβεστίου και ιντεγκρίνης
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	Κινάση που εξαρτάται από κυκλίνη
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein	Apoptosis-Activating Factor-1
DAB	3,3'-DiAminoBenzidine	3,3'-Διαμινοβενζιδίνη
DAPI	4',6-DiAmidine-2-PhenylIndole Dihydrochloride	4',6-διάμινο-2-φαινυλοδιυδροχλωριδική ινδόλη
DD	Death Domain	Επικράτεια θανάτου
DIABLO	Direct IAP-Binding protein with Low pI	Πρωτεΐνη άμεσα συνδεόμενη με τις IAP με χαμηλό pI
DISC	Death-Inducing Signaling Complex	Σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου
DMSO	DiMethyl SulfOxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DR	Death Receptor	Υποδοχέας θανάτου
DSP	Dual Specificity Phosphatase	Φωσφατάση διπλής ειδικότητας
DTT	DiThioThreitol	Διθειοθρεϊτόλη
ECM	ExtraCellular Matrix	Εξωκυττάρια μήτρα
EDTA	EthyleneDiamine TetraAcetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Receptor	Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού

		παράγοντα
EGTA	EthyleneGlycol TetraAcetic acid	Αιθυλενογλυκολοτετραοξικό οξύ
eIF4E	Eukaryotic translation Initiation Factor 4E	Ευκαρυωτικός Παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4E
ERK	Extracellular Regulated Kinase	Ρυθμιζόμενη από εξωτερικά σήματα κινάση
ETS-1	E-TwentySix-1	E26-1
FADD	Fas-Associated DD Containing Protein	Πρωτεΐνη συνδεόμενη με Fas που περιέχει επικράτεια DD
FAK	Focal Adhesion Kinase	Κινάση εστιακών επαφών
FBS	Fetal Bovine Serum	Ορός βόειου εμβρύου
FGF	Fibroblast Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
FGF-R	Fibroblast Growth Factor-Receptor	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών
FITC	Fluorescein Isothyocyanate	Ισοθειοκυανιούχα φλουορεσκίνη
FKHR	Forkhead Homolog in Rhabdomyosarcoma	Πρωτεΐνες με ομολογία Forkhead του ραβδομυοσαρκώματος
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3β	Κινάση 3β της συνθετάσης του γλυκογόνου
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	Δεσμευμένη σε υποδοχέα αυξητικού παράγοντα πρωτεΐνη-2
GST	Glutathione S-Transferase	Μεταφοράση της γλουταθειόνης
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-(2-ethanesulphonic acid	4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζίνη-(2-αιθανοθειικό οξύ)
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας των ηπατικών κυττάρων
HRP	Horseradish Peroxidase	Υπεροξειδάση ραπανιού

HTRA2	High Temperature Requirement protein A2	Πρωτεΐνη απαίτησης υψηλής θερμοκρασίας A2
HSP	Heat Shock Protein	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ
IAP	Inhibitor of Apoptosis	Πρωτεΐνη αναστολέας της απόπτωσης
ICAD	Inhibitor of Caspase-activated DNase	Αναστολέας της CAD
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule	Μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης
IFN	InterFeroN	Ιντερφερόνη
IGFBP-3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3	Πρωτεΐνη δέσμευσης στον αυξητικό παράγοντα τύπου ινσουλίνης-3
IGF-R	Insulin-like Growth Factor Receptor	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης
IKK	IKB Kinase	Κινάση του IKB
IKB	Inhibitor of NF-KB	Αναστολέας του NF-KB
IL	InterLeukin	Ιντερλευκίνη
ILK	Integrin-Linked Kinase	Κινάση συνδεδεμένη με ιντεγκρίνες
JAK	Janus Kinase	Κινάση Janus
JIP	JNK Interacting Protein	Πρωτεΐνη αλληλεπιδρώσα με τη JNK
JNK	c-Jun N-terminal Kinase	Κινάση του N-τελικού άκρου του c-Jun
LDL	Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LEF	Lymphoid Enhancer Factor	Παράγοντας ενίσχυσης των λεμφοειδών
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	Κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase	Κινάση της MAPK
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase	Κινάση της MAPKK

	Kinase	
MIDAS	Metal Ion-Dependent (Mg^{+2}) Adhesive Site	Επικράτεια πρόσδεσης που ρυθμίζεται από ιόν μετάλλου
MLK	Mixed Lineage Kinase	Κινάση μικτής σειράς
MMP	Matrix Metalloproteinase	Μεταλλοπρωτεάση εξωκυττάριας ουσίας
MSK	Mitogen and Stress Activated Kinase	Κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα και στρες
MT-MMP	Membrane-Type MMP	Μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεάση
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin	Πρωτεΐνη-στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide	Βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο
NEMO	NF-KB Essential Modifier	Βασικός τροποποιητής του NF-KB
NFAT-c1, c2	Nuclear Factor of Activated T cells-c1, c2	Πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T κυττάρων-c1, c2
NF-KB	Nuclear Factor-KB	Πυρηνικός παράγοντας KB
OSF2	Osteoblast Specific Factor 2	Ειδικός παράγοντας των οστεοβλαστών 2
OPG	OsteoProteGerin	Οστεοπροτεγερίνη
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase	Πολυμεράση της πολυ-ADP ριβόζης
PBS	Phosphate Buffer Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	Πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζομένων κυττάρων
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων

PDK	PI-3K-Dependent Kinase	Κινάση εξαρτώμενη από την PI-3K
PDTC	Pyrrolidine DiThioCarbamate	Διθειοκαρβαμδική πυρρολιδίνη
PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule	Μόριο κυτταρικής προσκόλλησης αιμοπεταλίων/ενδοθηλιακών κυττάρων
PI, Propidium Iodide	3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethyllummonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide	Διωδικό 3,8-διάμινο-5-[3-(διαίθυλομέθυλαμμώνιο)προπυλο]-6-φαινυλοφαινανθρένιο
PI 3-K	PhosphoInositide 3-Kinase	3-Κινάση του φωσφοϊνοσιτιδίου
PI 4-K	PhosphoInositide 4-Kinase	4-Κινάση του φωσφοϊνοσιτιδίου
PIP2	PhosphatidylInositol 4,5 bisPhosphate	4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PIP3	PhosphatidylInositol 3,4,5 triPhosphate	3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PKA	Protein Kinase A	Πρωτεϊνική Κινάση A
PKB	Protein Kinase B	Πρωτεϊνική Κινάση B
PKC	Protein Kinase C	Πρωτεϊνική Κινάση C
PMSF	PhenylMethyl-Sulfonyl Fluoride	Φθοριούχο φαινυλο-μεθυλο-σουλφονύλιο
PTEN	Phosphatase and TENSin homolog	Φωσφατάση με ομολογία με την τενσίνη
RANK	Receptor Activator of NF-KB	Υποδοχέας ενεργοποιητής του NF-KB
RANKL	Receptor Activator of NF-KB Ligand	Προσδέτης του υποδοχέα ενεργοποιητή του NF-KB
RANTES	Regulated upon Activation Normally T cell Expressed and Secreted	Ρυθμιζόμενη μετά από ενεργοποίηση, φυσιολογικά εκφραζόμενη και εκκρινόμενη από T-κύτταρα

RHD	Rel-Homology Domain	Επικράτεια ομολογίας Rel
RISC	RNA-Induced Silencing Complex	Επαγόμενο από RNA σύμπλοκο αποσιώπησης
RIP1	Receptor Interacting Protein 1	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα 1
ROS	Reactive Oxygen Species	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
RUNX	Runt-related Transcription Factor	Σχετιζόμενος με runt μεταγραφικός παράγοντας
S.D.	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Θειικό δωδεκυλικό νάτριο
SHP-1	SH2-containing Protein-Tyrosine Phosphatase-1	Φωσφατάση τυροσίνης που περιέχει επικράτεια SH2-1
SMAC	Second Mitochondrial Activator of Caspases	Δεύτερος μιτοχονδριακός ενεργοποιητής των κασπασών
SOS	Son Of Sevenless	Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων
SP-1	Specificity Protein-1	Πρωτεΐνη ειδικότητας-1
SRC	Src Family Kinases	Κινάσες της οικογένειας Src
STAT1,3	Signal Transducer And Activator of Transcription 1,3	Παράγοντας μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής 1,3
TACE	TNF-α Converting Enzyme	Μετατρεπτικό ένζυμο του TNF-α
TAK1	TGF-β-Activated Kinase 1	Κινάση ενεργοποιούμενη από τον TGF-β 1
TBS	Tris Buffer Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris

TEMED	N, N, N', N-TetraMethylEthyleneDiamine	N, N, N', N-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη
TGF-β	Transforming Growth Factor-β	Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase	Ιστικός Αναστολέας Μεταλλοπρωτεασών
TNF	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor-Receptor 1	Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων 1
TNF-R2	Tumor Necrosis Factor-Receptor 2	Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων 2
TPL-2	Tumor Progression Locus 2	Κινάση της περιοχής αύξησης όγκου 2
TRAF	TNFR-Associated Factors	Παράγοντας σχετιζόμενος με τον TNFR
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand	Σχετιζόμενος με τον TNF προσδέτης επάγωγής απόπτωσης
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Τρις(υδροξυμέθυλο)αμινομεθάνιο
TRITC	Tetramethyl Rhodamine IsoThioCyanate	Ισοθειοκυανιούχα τετραμέθυλο-ροδαμίνη
TWEAK	TNF-related Weak Inducer of Apoptosis	Σχετιζόμενος με τον TNF ήπιος επαγωγέας της απόπτωσης
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule	Μόριο κυτταρικής προσκόλλησης των αγγείων
VE-cadherin	Vascular Endothelial cadherin	Καδερίνη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων

XIAP	X chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis	X φυλοσύνδετος αναστολέας της απόπτωσης
------	---	--

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1	Οστίτης Ιστός-Οστό.....	13
1.1.1	Σχηματισμός-Λειτουργίες.....	13
1.1.2	Είδη κυττάρων.....	14
1.1.3	Ανακατασκευή του οστού.....	16
1.2	Απόπτωση.....	18
1.2.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	18
1.2.2	Κασπάσες.....	19
1.2.3	Η οικογένεια των πρωτεϊνών BCL-2.....	21
1.2.4	Η επαγωγή της απόπτωσης.....	22
1.2.5	Η επαγωγή της απόπτωσης στους οστεοβλάστες.....	24
1.3	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων-α.....	27
1.3.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	27
1.3.1.1	Ο βιολογικός ρόλος του TNF-α.....	28
1.3.1.2	Το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει ο TNF-α.....	29
1.3.1.3	Ενεργοποίηση του NF-KB από τον TNF-α.....	38
1.3.1.4	Ανοσολογία του οστού.....	43
1.4	Ιστικοί Αναστολείς των Μεταλλοπρωτεασών.....	47
1.4.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	47
1.4.2	Κυτταρικές λειτουργίες.....	49
1.4.3	Ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεασών -1.....	53
1.4.3.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	53
1.4.3.2	Η αναστολή των MMPs από τον TIMP-1.....	55
1.4.3.3	TIMP-1 και κυτταρικές λειτουργίες.....	56
1.4.3.4	Ο υποδοχέας του TIMP-1 στην κυτταρική επιφάνεια.....	62
1.5	Ιντεγκρίνες.....	65
1.5.1	Γενικά χαρακτηριστικά και δομή των ιντεγκρινών.....	65
1.5.2	Ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και κυτταρική σηματοδότηση.....	67
1.5.3	Ιντεγκρίνες και απόπτωση.....	69
1.5.4	Βιολογικός ρόλος των ιντεγκρινών στο οστό.....	72
1.6	Σκοπός.....	74
2	ΥΛΙΚΑ.....	76
2.1	Χημικά αντιδραστήρια.....	76
2.2	Αντισώματα.....	77
2.3	Όργανα.....	80
2.4	Βιολογικό υλικό.....	81
3	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83
3.1	Καλλιέργεια κυττάρων.....	83
3.1.1	Αποστείρωση.....	83
3.1.2	Συντήρηση των κυττάρων.....	84
3.1.3	Μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	85
3.1.4	Κατάψυξη και απόψυξη των κυττάρων.....	85
3.1.5	Κυτταρική καλλιέργεια παρουσία παραγόντων.....	86
3.1.6	Καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες μετα-μεταγραφικής γονιδιακής αποσιώπησης.....	87
3.2	Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων (MTT).....	92
3.3	Χρώση πυρήνων με DAPI.....	93
3.4	Απομόνωση πρωτεϊνών.....	95

3.4.1	Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα	95
3.4.1.1	Απομόνωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.....	95
3.4.1.2	Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών	96
3.4.1.3	Απομόνωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών	96
3.4.2	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	97
3.5	Ανίχνευση πρωτεϊνών	98
3.5.1	Ανοσοεντοπισμός.....	98
3.5.1.1	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)	98
3.5.1.2	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	101
3.5.1.3	Εντοπισμός των πρωτεϊνών με χρήση χημειοφωταύγειας.....	102
3.5.2	Ανοσοκατακρήμνιση	105
3.6	Τεχνικές μικροσκοπίας	108
3.6.1	Φωτονική μικροσκοπία.....	108
3.6.2	Μικροσκοπία φθορισμού.....	110
3.6.3	Συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία Laser.....	112
3.7	Κυτταρομετρία ροής.....	115
3.7.1	Προσδιορισμός της έκφρασης των ιντεγκρινικών υπομονάδων στην επιφάνεια των κυττάρων MG63.	117
3.7.2	Προσδιορισμός των θραυσμάτων DNA	118
3.8	Πυκνομετρική ανάλυση	120
3.9	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	120
3.10	Λογισμικά Προγράμματα	120
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	121
4.1	Επίδραση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των μεταλλοπρωτεασών και των ιστικών αναστολέων τους.....	121
4.2	Επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα MG63 από τον TNF-α.....	127
4.2.1	Μελέτη πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν την απόπτωση.....	133
4.3	Η επαγόμενη από τον TNF-α αύξηση στα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1 συνδέεται με την ενεργοποίηση του NF-κΒ και τη σηματοδότηση μονοπατιών επιβίωσης.....	140
4.3.1	Η συμμετοχή του TIMP-1 στην ανθεκτικότητα των κυττάρων MG63 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης.....	152
4.3.2	Προσθήκη TIMP-1 εξωγενώς μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης ...	159
4.4	Οι ιντεγκρίνες στη διαμεσολαβούμενη από τον TIMP-1 προστασία των κυττάρων MG63 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης	164
4.4.1	Επίδραση του TNF-α στην έκφραση των ιντεγκρινών.....	164
4.4.2	Συνεντοπισμός του TIMP-1 με την ανβ3 στην κυτταρική επιφάνεια.....	168
4.4.3	Διασύνδεση του TIMP-1 με την ανβ3	171
4.4.4	Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της αλληλεπίδρασης TIMP-1-ανβ3 στην απόπτωση	174
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	181
5.1	Ρύθμιση της έκφρασης-έκκρισης των MMPs και TIMPs από μόρια του μικροπεριβάλλοντος του οστού	181
5.2	Επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF-α.....	185
5.3	Ενεργοποίηση των κινάσων Akt/PKB και MAPKs και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ κατά την επαγωγή του TIMP-1	187
5.4	Επίδραση του TIMP-1 στην κυτταροτοξική δράση του TNF-α.....	191

5.5	Η προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης στα κύτταρα MG63 εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του με την ιντεγκρίνη ανβ3	193
5.6	Γενικά συμπεράσματα	200
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	202
7	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	231
8	SUMMARY	235
9	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	238

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

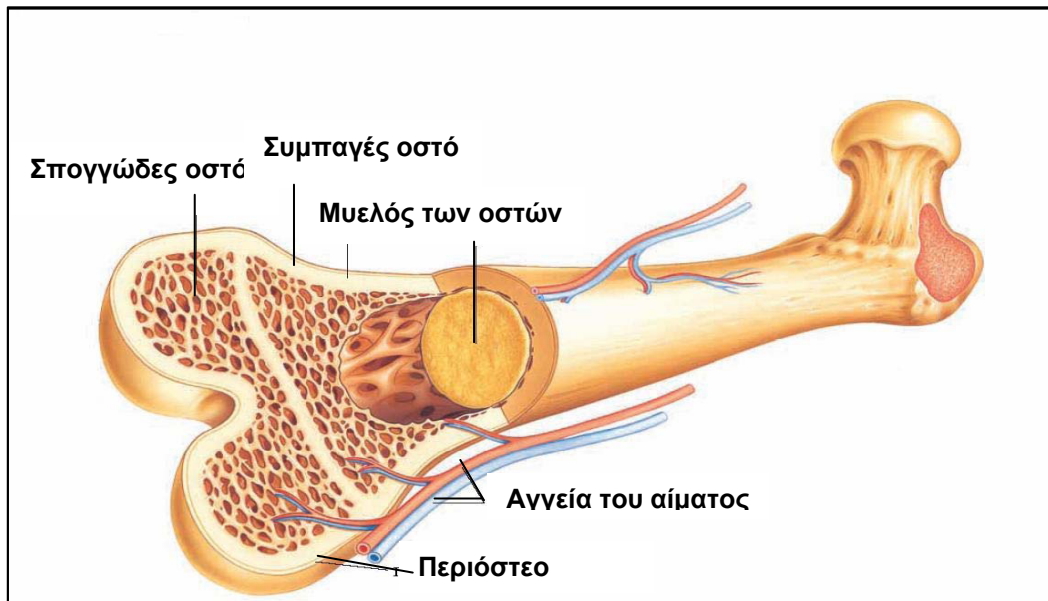
1.1 Οστίτης Ιστός-Οστό

1.1.1 Σχηματισμός-Λειτουργίες

Τα οστά είναι σκληρά ανθεκτικά όργανα, με κύριο συστατικό τους τον οστίτη ιστό. Ο ρόλος του οστίτη είναι σημαντικός γιατί παρέχει τη μηχανική υποστήριξη, την κινητικότητα και την προστασία των υπολοίπων οργάνων του οργανισμού, όπως της καρδιάς, του εγκεφάλου και των πνευμόνων. Μέσα στον οστίτη ιστό περιέχεται ο μυελός ο οποίος είναι απαραίτητος για την αναγέννηση των έμμορφων συστατικών του αίματος. Από βιοχημική άποψη ο οστίτης ιστός είναι η αποθήκη του οργανισμού σε ιόντα (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+}), των οποίων η διατήρηση σε σταθερά επίπεδα στον εξωκυττάριο χώρο, είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών.

Ο σχηματισμός του οστού πραγματοποιείται με ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση, που επιτελείται με μετασχηματισμό μιας μεμβράνης συμπυκνωμένου μεσεγχυματικού ιστού ή με ενδοχόνδρια οστεοποίηση, που επιτελείται με μετατροπή ενός ενδιάμεσου χόνδρινου υποδείγματος (Raisz 1999). Σχετικά με τη δομή του οστού, εξωτερικά περιβάλλεται από ένα συνδετικογενή υμένα, το περίοστεο, το οποίο αποτελείται από τρεις στιβάδες: την εξωτερική, τη μέση και την εσωτερική. Εσωτερικά του περιόστεου βρίσκεται η οστεΐνη η οποία αποτελείται εξωτερικά από το φλοιώδες ή συμπαγές τμήμα και εσωτερικά από το σπογγώδες τμήμα, στο οποίο βρίσκεται ο μυελός των οστών. Στο εσωτερικό του οστού υπάρχουν ακόμη τα αγγεία και τα νεύρα (Εικόνα 1).

Τα οστά αποτελούνται από την οστική θεμέλια ουσία, που είναι ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία και περιέχουν ανόργανα συστατικά (υδροξυαπατίτη, άλατα του φωσφόρου και του ασβεστίου), οργανικά συστατικά (κολλαγόνο τύπου I, πρωτεογλυκάνες) και κύτταρα.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του οστού.

1.1.2 Είδη κυττάρων

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί κυτταρικοί τύποι στο οστό:

α. Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από πρόδρομα στρωματικά κύτταρα και είναι διαφοροποιημένα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης. Κατά το σχηματισμό νέων οστών είναι πολλοί σε αριθμό και μεγάλοι σε μέγεθος με σχήμα κυλινδρικό ή κυβικό, ενώ στη φάση του ώριμου σκελετού μειώνονται τόσο σε αριθμό όσο και σε μέγεθος και αποκτούν επίμηκες σχήμα. Ο πυρήνας τους είναι ευμεγέθης, με σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα και περιέχει 1-3 πυρηνίσκους. Η διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς οστεοβλάστες εξαρτάται κυρίως από τον ειδικό παράγοντα των οστεοβλαστών 2 (Osteoblast Specific Factor 2, OSF2), ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που συνθέτουν πρωτεΐνες-δείκτες των οστών (Ducy et al. 1997). Οι οστεοβλάστες συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού του οστού, μέσω της σύνθεσης και απόθεσης των οργανικών συστατικών της θεμέλιας ουσίας και της έκκρισης των μεταλλοπρωτεασών και φωσφορυλασών, καθώς και των ανόργανων αλάτων ασβεστίου με τη βοήθεια της αλκαλικής φωσφατάσης που περιέχουν (Schepetkin 1997).

β. Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από τον μυελό των οστών και διαφοροποιούνται στο περιβάλλον του οστού. Πρόκειται για μεγάλα κύτταρα (γιγαντοκύτταρα)

ποικίλου σχήματος, που περιέχουν πολλούς πυρήνες (από 2 έως 100 στον αριθμό) (Loya et al. 2004). Η κύρια λειτουργία τους είναι η αποικοδόμηση του οστού που οδηγεί στο σχηματισμό βαθιών σκαφοειδών κοιλοτήτων που ονομάζονται βοθρία του Howship, η οποία επιτελείται με την έκκριση οστεολυτικών ενζύμων σε όξινο περιβάλλον και την επακόλουθη αποικοδόμηση των οργανικών συστατικών του οστού. Κατά τη φάση της αποικοδόμησης η επιφάνεια των ενεργών οστεοκλαστών παίρνει κατάλληλη μορφή που επιτρέπει την προσκόλλησή τους στην επιφάνεια του οστού, ενώ μετά το τέλος της αποικοδόμησης παίρνει την αρχική της μορφή (Chambers and Fuller 1985). Εκτός από την αποικοδόμηση του οστού, έχει προταθεί ότι οι οστεοκλάστες έχουν τη δυνατότητα να ενδοκυτταρώνουν οστικά κύτταρα - μεταξύ των οποίων οστεοβλάστες - που υφίστανται κυτταρικό θάνατο (Cerrì et al. 2003).

γ. Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα προέρχονται από τη μετακίνηση των οστεοβλαστών από την επιφάνεια του οστού στο εσωτερικό του μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του νέου οστού και αντιπροσωπεύουν το 95% των κυττάρων του. Τα κύτταρα αυτά έχουν ωοειδές σχήμα, δεν έχουν την ικανότητα διαίρεσης και βρίσκονται σε κοιλοότητες μέσα στη θεμέλια ουσία όπου αναπτύσσουν προεκβολές. Ακόμη έχουν την ιδιότητα να επικοινωνούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τους οστεοβλάστες, με αποτέλεσμα να δρουν ως μηχανικοί αισθητήρες (Doty 1981). Ο κύριος ρόλος των οστεοκυττάρων είναι η συντήρηση της θεμέλιας ουσίας του οστού, με την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου όπου και όποτε απαιτείται. Τέλος είναι δυνατό να συμμετέχουν στη σύνθεση οστικής μάζας, ή στην αποικοδόμηση του οστού, καθώς έχει βρεθεί ότι μικρό ποσοστό των οστεοκυττάρων εκκρίνει οστεολυτικά ένζυμα (Jilka et al. 1998).

δ. Καλυπτήρια κύτταρα

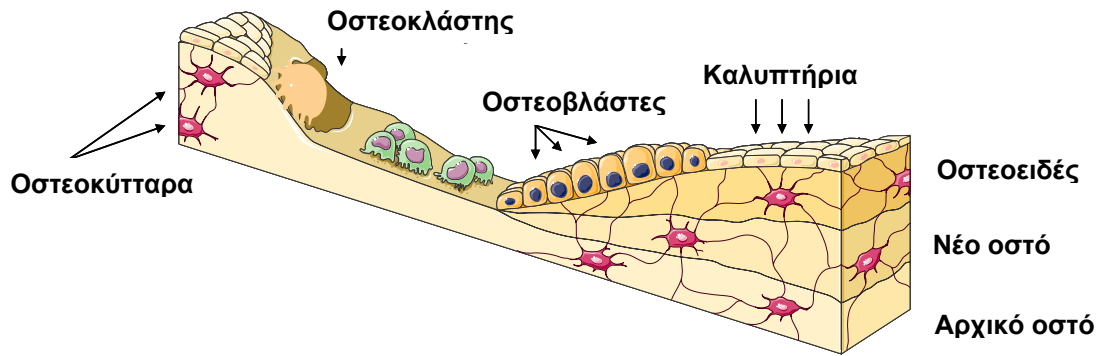
Τα καλυπτήρια κύτταρα του οστού είναι λεπτά, επιμήκη κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια του οστού όταν βρίσκεται σε ηρεμία. Τα καλυπτήρια κύτταρα θεωρούνται αδρανή κύτταρα και το κυτταρόπλασμά τους δεν περιέχει πολλά οργανίδια. Κατά την αποικοδόμηση του οστού, απομακρύνονται από την επιφάνειά του, με αποτέλεσμα την έκθεσή του σε οστεολυτικά ένζυμα (Raisz 1997).

1.1.3 Ανακατασκευή του οστού

Ο οστίτης ιστός είναι ένας πολύ οργανωμένος και δυναμικός ιστός, ο οποίος συνεχώς ανακατασκευάζεται. Η διαδικασία ανακατασκευής του οστού είναι πολύ σημαντική και επιτελείται όχι μόνο κατά την ανάπτυξη των οστών, αλλά και σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ενήλικα. Σε μικρής ηλικίας οργανισμούς οι μεταβολές εντοπίζονται κυρίως στο σχήμα και το μέγεθός του, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας οργανισμούς στην ποιότητά του. Οι περιοχές ενεργού ανακατασκευής του οστού ονομάζονται “βασικές πολυκυτταρικές μονάδες” (Basic Multicellular Units, BMU) ή, κατά άλλους, “μονάδες μεταβολισμού του οστού” (Bone Metabolic Units, BMU) (Frost 1991).

Σε πρώτη φάση πραγματοποιείται αποικοδόμηση του οστού από τους οστεοκλάστες. Οι οστεοκλάστες προσκολλώνται ισχυρά στην επιφάνεια του οστού μέσω της ιντεγκρίνης ανβ3 και εκκρίνουν H^+ και πρωτεολυτικά ένζυμα όπως μεταλλοπρωτεάσες, καθεψίνες και λυσοζύμη. Κατά συνέπεια, δημιουργούν μία όξινη περιοχή, που δρα σαν ένα μεγάλο και πολυδύναμο λυσοσωμάτιο το οποίο αποικοδομεί τη θεμέλια ουσία και απελευθερώνει ασβέστιο. Η δράση των ενζύμων προκαλεί τη δημιουργία των βοθρίων του Howship στην επιφάνεια του οστού με βάθος που φθάνει τα 50 μm και διαβρωμένων σωλήνων στο εσωτερικό του οστού με διάμετρο περίπου 1 mm. Η διαδικασία της αποικοδόμησης του οστού διαρκεί τρεις εβδομάδες. Κατόπιν, από το μικροπεριβάλλον του οστού εκκρίνονται αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι επιτρέπουν την απομάκρυνση των οστεοκλαστών, κυρίως λόγω απόπτωσης. Στις νεοσχηματισθείσες κοιλότητες δεσμεύονται οι οστεοβλάστες και ακολουθεί η φάση της αναστροφής και του σχηματισμού του νέου οστού η οποία διαρκεί περίπου 3-5 μήνες. Υπολογίζεται ότι απαιτούνται συνολικά περίπου 100-150 ενεργοί οστεοβλάστες για το σχηματισμό του οστού που απορρόφησε ένας οστεοκλάστης. Οι οστεοβλάστες παράγουν οργανική ουσία η οποία επαναοστεοποιείται, ενώ το νέο οστό σχηματίζεται σε διαδοχικούς ομόκεντρους κύκλους (Raisz 1997) (Εικόνα 2).

Η αδυναμία διατήρησης της ισορροπίας ανάμεσα στην αποικοδόμηση και το σχηματισμό του οστού οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως η οστεοπόρωση, η οστεοπέτρωση, η ασθένεια του Paget και το οστεοσάρκωμα (Cohen 2006), γι αυτό η ανακατασκευή του οστού υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο από συστηματικούς και τοπικούς παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος του οστού (Raisz 1999).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της ανακατασκευής του οστού.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ανακατασκευή του οστού προϋποθέτει τη ρύθμιση της δραστηριότητας και του αριθμού των κυττάρων του οστού, κυρίως μέσω της δημιουργίας νέων κυττάρων και της απόπτωσης. *In vivo*, ο προσδιορισμός των οστεοκυττάρων μετά το σχηματισμό του οστού δείχνει ότι ποσοστό 50-70% των οστεοβλαστών που υπήρχαν αρχικά κατά το σχηματισμό του οστού δεν εντοπίζεται και θεωρείται ότι έχουν οδηγηθεί σε απόπτωση (Jilka et al. 1998).

1.2 Απόπτωση

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μία φυσιολογική και εντεταλμένη διαδικασία που επιτρέπει την απαλοιφή των ανεπιθύμητων κυττάρων την κατάλληλη στιγμή και την ομοιοστατική ρύθμιση πολλών κυτταρικών πληθυσμών (Jacobson et al. 1997). Τα κύτταρα που υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο συχνά επιδεικνύουν μία σειρά διακριτών μορφολογικών μεταβολών που συνολικά αναφέρονται ως απόπτωση. Συγκεκριμένα, συμβαίνει συρρίκνωση του κυττάρου, τροποποίηση του κυτταροσκελετού και εμφάνιση στην κυτταρική επιφάνεια των μεμβρανικών κύστεων και του φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη (PS) (Martin et al. 1991). Στον πυρήνα του αποπτωτικού κυττάρου συμβαίνει συμπύκνωση της χρωματίνης και θραύση του DNA η οποία ρυθμίζεται από την Ενεργοποιούμενη από Κασπάσες DNάση (Caspase-activated DNase, CAD) και οδηγεί στην παραγωγή κλασμάτων με μέγεθος πολλαπλάσιο των 180 bp. Παράλληλα, συμβαίνει αποδιοργάνωση της πυρηνικής μεμβράνης, ενώ ο πυρηνίσκος φαίνεται κοκκιώδης. Οι μορφολογικές μεταβολές του αποπτωτικού κυττάρου ακολουθούνται από την αποκοπή μικρών μεμβρανικών αποπτωτικών σωματίων, τα οποία περιέχουν ακέραια οργανίδια. Τα αποπτωτικά σωμάτια, όπως και τα κύτταρα που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο απόπτωσης, φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα κύτταρα, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η εκδήλωση φλεγμονής.

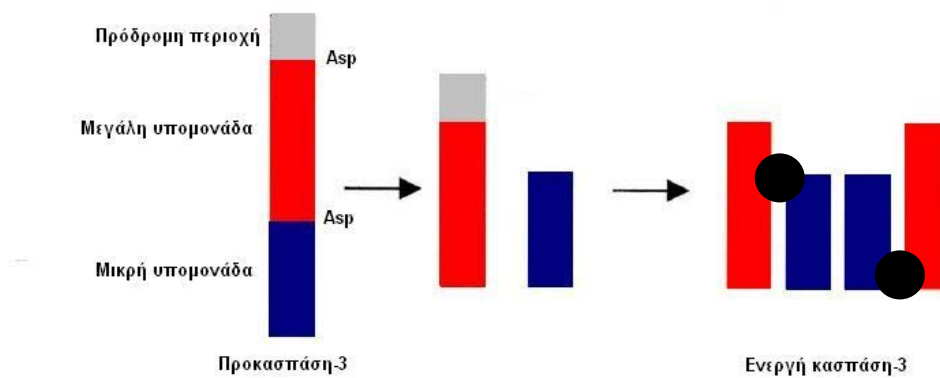
Εξίσου σημαντικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι τα βιοχημικά χαρακτηριστικά. Στα θηλαστικά έχει παρατηρηθεί καταστροφή της δομής των μικροϊνιδίων και των μικροσωληνίσκων και συσσώρευση της ιστικής διαγλουταμινάσης, η οποία πιθανόν εμποδίζει τη διαρροή των κυτταρικών συστατικών στο εξωτερικό περιβάλλον (Fesus et al. 1991). Εξάλλου μεταβολές υφίσταται και η κυτταρική επιφάνεια του αποπτωτικού κυττάρου με σκοπό την προσέλκυση των φαγοκυττάρων. Το κυριότερο σηματοδοτικό μόριο είναι η PS η οποία εμφανίζεται στην κυτταρική επιφάνεια ως αποτέλεσμα της αναίρεσης της μεμβρανικής φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας, ενώ, άλλα μόρια-υποδοχείς που έχουν χαρακτηριστεί είναι τα CD19, CD14, CD36, CD91 και η ιντεγκρίνη ανβ3 (Savill and Fadok 2000; Duvall et al. 1985). Επίσης, η απόπτωση συνδέεται με αύξηση των

επιπέδων των ελεύθερων ενδοκυτταρικών Ca^{2+} , ενώ, αντίθετα αύξηση των επιπέδων των Zn^{2+} την αναστέλλει (Cohen and Duke 1984; Martin et al. 1991; Perotti et al. 1990). Τέλος, έχουν αναφερθεί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου με χαρακτηριστικά απόπτωσης, όπου συμβαίνει ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως οι *θρυμματίνες* (Granzymes, GZM), οι *καλπαΐνες* (Calcium-Activated Neutral Proteases, Calpains) και οι *καθεψίνες* (Chowdhury and Lieberman 2008; Leist and Jaattela 2001; Wang 2000). Όμως, τα πιο χαρακτηριστικά πρωτεολυτικά ένζυμα της απόπτωσης είναι οι κασπάσες (Alnemri et al. 1996).

1.2.2 Κασπάσες

Οι κασπάσες (c-asps-ases) αποτελούν μία οικογένεια πρωτεασών που στο ενεργό τους κέντρο φέρουν το αμινοξύ κυστεΐνη και έχουν την ικανότητα να πρωτεολύουν τα υποστρώματά τους μετά από κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος (Stennicke and Salvesen 1998). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 διαφορετικές κασπάσες οι οποίες έχουν διακριτούς ρόλους στο κύτταρο. Οι κασπάσες -1, -4, -5 και -13 συμμετέχουν στην επεξεργασία και την ενεργοποίηση των κυτταροκινών (Denault and Salvesen 2002). Οι εναρκτήριες κασπάσες -2, -8, -9 και -10 συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία, καθώς ενεργοποιούνται από κάποιο ερέθισμα και στη συνέχεια ενεργοποιούν τις κασπάσες τελεστές. Τέλος, οι κασπάσες τελεστές -3, -6 και -7 είναι αυτές που επιτελούν την απόπτωση.

Οι κασπάσες παράγονται με τη μορφή ανενεργών ζυμογόνων (προκασπάσες) που περιέχουν τρεις διακριτές περιοχές: την πρόδρομη N-τελική περιοχή, τη μεγάλη υπομονάδα που περιέχει την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου και τη μικρή υπομονάδα. Η μετατροπή των προκασπασών στις ενεργές κασπάσες συμβαίνει μετά από αυτοπρωτεόλυση ή πρωτεόλυση από άλλες κασπάσες σε κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος (Asp-297). Η ενεργή κασπάση είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δύο ετεροδιμερή, που περιέχουν μία μικρή και μία μεγάλη υπομονάδα και περιέχει δύο ενεργά κέντρα (Wolf and Green 1999) (Εικόνα 3).



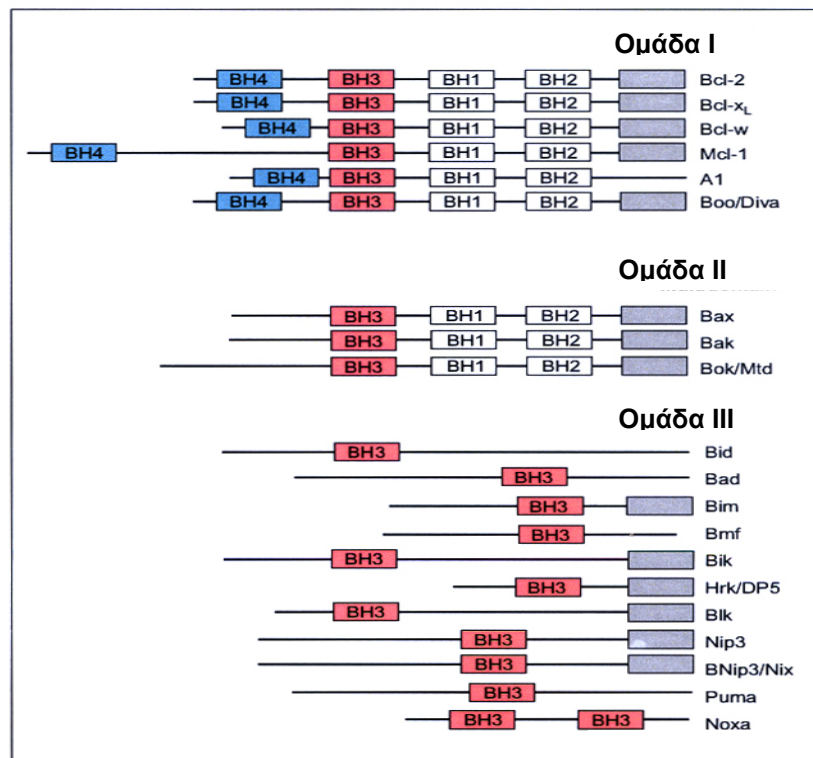
Εικόνα 3: Ενεργοποίηση της προκασπάσης στην ενεργή μορφή (Zimmermann et al. 2001).

Οι κασπάσες πρωτεολύουν μία πληθώρα υποστρωμάτων που περιλαμβάνει πρωτεΐνες που μετέχουν στη συγκρότηση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, στη μεταγωγή σήματος, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και σε διαδικασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, η μετάφραση και η επιδιόρθωση του DNA. Τα πιο χαρακτηριστικά υποστρώματα των κασπασών - πέρα από τις ίδιες τις κασπάσες - είναι ο αναστολέας της ενεργοποιούμενης από κασπάσες DNάσης (Inhibitor of Caspase-Activated DNase, ICAD), η ελικάση που φέρει την επικράτεια στρατολόγησης κασπάσης (Caspase Recruitment Domain, CARD) (helicard), η λαμίνη και το ένζυμο πολυμεράση της πολύ-ADP ριβόζης (Poly ADP-Ribose Polymerase, PARP) (Kovacsovics et al. 2002; Kothakota et al. 1997; Rao et al. 1996; Lazebnik et al. 1994). Άλλα σημαντικά υποστρώματα των κασπασών είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2, όπως BCL-2, BCL-X_L και BID (Desagher et al. 2001; Clem et al. 1998; Cheng et al. 1997) και οι E-, N-, και P- καδερίνες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση της επιβίωσης που μεσολαβείται από τις ιντεγκρίνες (Hunter et al. 2001; Schmeiser and Grand 1999). Άλλα μόρια με αντι-αποπτωτική δράση που αποικοδομούνται από τις κασπάσες είναι η πρωτεϊνική κινάση B (Protein Kinase B AKT/PKB), η κινάση των εστιακών επαφών (Focal Adhesion Kinase, FAK) και οι μεταγραφικοί παράγοντες πυρηνικός παράγοντας KB (Nuclear Factor KB, NF-KB) και πρωτεΐνη πρόσδεσης σε ακολουθία απόκρισης στο cAMP (cAMP Response Element Binding Protein, CREB) (Francois et al. 2000; Ravi et al. 1998; Bachelder et al. 2001; Wen et al. 1997). Ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας των κασπασών εξαρτάται από τους ενδογενείς αναστολείς των κασπασών που ονομάζονται αναστολείς της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptosis, IAPs), όπως ο X-φυλοσύνδετος αναστολέας της απόπτωσης (X chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis, XIAP), ο

κυτταρικός αναστολέας της απόπτωσης-1 (cellular Inhibitor of Apoptosis-1, c-IAP1), ο κυτταρικός αναστολέας της απόπτωσης-2 (cellular Inhibitor of Apoptosis-2, c-IAP2), ο νευρωνικός αναστολέας της απόπτωσης και η επιβιωτίνη (Deveraux et al. 1997; Tamm et al. 1998) καθώς επίσης από χημικές ενώσεις (Perry et al. 1997; Thornberry and Molineaux 1995).

1.2.3 Η οικογένεια των πρωτεϊνών BCL-2

Η πρωτεΐνη BCL-2 είναι ένα μέλος μιας πρωτεϊνικής οικογένειας, τα μέλη της οποίας συμμετέχουν στη ρύθμιση του αποπτωτικού προγράμματος στα κύτταρα των θηλαστικών. Προς το παρόν, τουλάχιστον 25 μέλη της οικογένειας BCL-2 είναι γνωστά, τα οποία μπορούν να αναστέλλουν ή να ενεργοποιούν την απόπτωση (Antonsson and Martinou 2000). Ένα κύριο χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας BCL-2 είναι η ικανότητα ομοδιμερισμού και ετεροδιμερισμού, που έχει ως αποτέλεσμα την αμοιβαία εξουδετέρωση της δράσης τους. Επομένως, η αποπτωτική δράση εξαρτάται από τη στοιχειομετρική αναλογία μεταξύ των αντι-αποπτωτικών και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Η μελέτη των πρωτεϊνών BCL-2 με βάση λειτουργικά και δομικά κριτήρια προτείνει το διαχωρισμό τους σε τρεις ομάδες (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2 (Kuwana and Newmeyer 2003).

Δομικά, ο διαχωρισμός βασίζεται στην παρουσία ή όχι τεσσάρων μικρών σε μήκος συντηρημένων επικρατειών ομολογίας μεταξύ των μελών (BCL-2 homology, BH), γνωστών ως BH1-BH4, ενώ λειτουργικά, τα μέλη που ανήκουν στην ομάδα I έχουν αντι-αποπτωτική δράση και τα μέλη που ανήκουν στις ομάδες II και III έχουν κατά βάση προ-αποπτωτική δράση. Η ομάδα I αποτελείται από τις πρωτεΐνες BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, A1/BFL1, BOO/DIVA και NRF3 (Adams and Cory 1998; Boise et al. 1993; Choi et al. 1995; Gibson et al. 1996; Gross et al. 1999; Kozopas et al. 1993). Τα μέλη της ομάδας I διαθέτουν και τις τέσσερις συντηρημένες περιοχές ομολογίας BH1-BH4 και τα περισσότερα από αυτά διαθέτουν μια καρβοξυτελική υδρόφοβη επικράτεια μέσω της οποίας αλληλεπιδρούν με την επικράτεια BH3 των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας (Muchmore et al. 1996). Ο πιο κοινός τρόπος δράσης τους είναι η αναστολή της απόπτωσης μέσω αλληλεπίδρασης με την επικράτεια BH3 των πρωτεϊνών της ομάδας III, οπότε αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ή τη μετατροπή του BID σε tBID (Wang et al. 1999a; Danial and Korsmeyer 2004). Η ομάδα II περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες BAX, BAK και BOK/MTD οι οποίες διαφέρουν από τα μέλη της ομάδας I, λόγω απώλειας της αμινοτελικής BH4 περιοχής. Τα μόρια αυτά βρίσκονται ως ανενεργά μονομερή στο κυτταρόπλασμα και - με την επίδραση του κατάλληλου αποπτωτικού ερεθίσματος - μετακινούνται προς τα μιτοχόνδρια όπου σχηματίζουν ομο-ολιγομερή, τα οποία επιτρέπουν την απελευθέρωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών όπως το κυτόχρωμα c και οδηγούν σε απόπτωση. Τέλος, η ομάδα III περιέχει μία πληθώρα πρωτεϊνών με μεγάλη ετερογένεια, οι οποίες περιέχουν μια μόνο BH3 επικράτεια. Σε αυτήν ανήκουν οι πρωτεΐνες BID, BAD, BIK, BIM, BLK, BMF, HRK, BNIP3, NIX, NOXA και PUMA οι οποίες συνδέονται με μέλη των ομάδων I ή/και II, μέσω των επικρατειών BH3 και αποκρίνονται στα αποπτωτικά ερεθίσματα με έλεγχο της μεταγραφής ή με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Huang and Strasser 2000; Nakano and Vousden 2001).

1.2.4 Η επαγωγή της απόπτωσης

Είναι ενδιαφέρον ότι η επαγωγή ή η αναστολή της απόπτωσης ρυθμίζονται τόσο από σήματα του εξωκυττάριου χώρου (Εξωγενές μονοπάτι) όσο και από ενδοκυτταρικά σήματα που ανιχνεύουν βλάβες στο DNA (Ενδογενές μονοπάτι). Στο

ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς απελευθερώνουν στο κυτταρόπλασμα διάφορες πρωτεΐνες και κυρίως το κυτόχρωμα c. Με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, επάγεται ο σχηματισμός του αποπτωσώματος, στο οποίο συμμετέχουν ακόμη ο παράγοντας ενεργοποίησης της απόπτωσης-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1, APAF-1) και η τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine TriPhosphate, ATP). Ακολουθεί ο ολιγομερισμός του APAF-1 και η αλληλεπίδραση του με την προ-κασπάση-9 και η μετατροπή της στην ενεργή κασπάση-9. Τελικά, η κασπάση-9 ενεργοποιεί την τελεστική κασπάση-3 που ολοκληρώνει τη διαδικασία της απόπτωσης (Rodriguez and Lazebnik 1999). Εκτός από το κυτόχρωμα c, τα μιτοχόνδρια ελευθερώνουν το δεύτερο μιτοχονδριακό ενεργοποιητή των κασπασών (Second Mitochondrial Activator of Caspases, SMAC) ή πρωτεΐνη άμεσα συνδεδεμένη με τις IAPs με χαμηλό pI (Direct IAP-Binding protein with Low pI, DIABLO) και την πρωτεΐνη απαίτησης υψηλής θερμοκρασίας A2 (High Temperature Requirement protein A2, HTRA2) ή OMI οι οποίες επάγουν ένα είδος απόπτωσης, χωρίς σχηματισμό του αποπτωσώματος, αλλά μέσω δέσμευσης των IAPs (Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000; Ekert et al. 2001). Ταυτόχρονα, έχει αναφερθεί ένα αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κασπάσης-2 (Danial and Korsmeyer 2004).

Εκτός από τον αποπτωτικό μηχανισμό μέσω των μιτοχονδρίων, οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει παράλληλα το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι μέσω των υποδοχέων θανάτου, οι οποίοι διαβιβάζουν αποπτωτικά σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου, μετά από δέσμευση των κατάλληλων προσδετών. Στην οικογένεια των υποδοχέων θανάτου ανήκουν οι FAS, Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων-α 1 (Tumor Necrosis Factor-α Receptor1, TNF-R1), Υποδοχέας θανάτου 3 (Death Receptor 3, DR3), Υποδοχέας θανάτου 4 (Death Receptor 4, DR4) και Υποδοχέας θανάτου 5 (Death Receptor 5, DR5). Το καλύτερα χαρακτηρισμένο αποπτωτικό μονοπάτι σηματοδότησης είναι του υποδοχέα θανάτου FAS, όπου η δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα επιτρέπει την επακόλουθη στρατολόγηση μιας σειράς πρωτεϊνών που σχηματίζουν το σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου (Death-Inducing Signalling Complex, DISC) στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη συνδεδεμένη με FAS που περιέχει επικράτεια θανάτου (Fas-Associated Death Domain Containing Protein, FADD) και οι προκασπάσες -8 και -10 (Kischkel et al. 1995). Οι

προκασπάσες -8 και -10 υφίστανται αυτοπρωτεόλυση, μετατρέπονται στις ενεργές τους μορφές και οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης διαφέρει ανάλογα με την ποσότητα της ενεργού κασπάσης-8 (Scaffidi et al. 1998). Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους (κύτταρα τύπου I) όπου παράγεται μεγάλη ποσότητα κασπάσης-8, επάγεται η ενεργοποίηση της τελεστικής κασπάσης-3 ταχύτατα (<30 λεπτά), ενώ, αντίθετα, σε άλλους κυτταρικούς τύπους (κύτταρα τύπου II) όπου παράγεται μικρή ποσότητα κασπάσης-8 (λόγω στρατολόγησης μικρής ποσότητας της FADD στο DISC), η ενεργοποίηση της τελεστικής κασπάσης-3 καθυστερεί (~60 λεπτά). Στα κύτταρα τύπου II η απόπτωση ενισχύεται από τα μιτοχόνδρια μέσω πρωτεόλυσης του μορίου BID προς σχηματισμό του προ-αποπτωτικού μορίου tBID (truncated BID).

1.2.5 Η επαγωγή της απόπτωσης στους οστεοβλάστες

Επειδή ο αριθμός των οστεοβλαστών συνδέεται με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων του οστού, είναι σημαντική η μελέτη των παραγόντων που επάγουν τις παραπάνω μορφές κυτταρικού θανάτου, καθώς και τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται.

Κατά την επαγωγή της απόπτωσης σε οστεοβλάστες, έχει περιγραφεί το ενδογενές μονοπάτι με τη συμμετοχή των μιτοχονδρίων κατά το οποίο συμβαίνει απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 και της ενεργότητας των κασπασών. Ο παραπάνω μηχανισμός απόπτωσης ενεργοποιείται σε συνθήκες στέρησης ορού (Wang et al. 2009a) ή παρουσία δεξαμεθαζόνης σε φυσιολογικούς οστεοβλάστες και συνδέεται με αύξηση των επιπέδων έκφρασης των BIM, BAK και BAX (Liang et al. 2008). Σε κύτταρα οστεοσαρκώματος το μονοπάτι των μιτοχονδρίων ενεργοποιείται παρουσία καφεΐνης ή χαμηλών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης (curcumin) (Lu et al. 2008; Chan et al. 2006). Επίσης τα κύτταρα οστεοσαρκώματος οδηγούνται σε απόπτωση παρουσία H₂O₂, λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein, LDL), ανδρογόνων (όπως 5α-διυδροτεστοστερόνη), θυμοκινόνης (thymoquinone) ή του φαρμακολογικού αναστολέα των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες (Cyclin-Dependent Kinase, CDK), SCH727965 ή Dinaclilib (Chua et al. 2003; Ho et al. 2009; Fu et al.; Klein et al. 2006; Roepke et al. 2007; Wiren et al. 2006). Το αρσενικό προκαλεί απόπτωση στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος MG63 και hFOB όπως

επίσης στην κυτταρική σειρά φυσιολογικών οστεοβλαστών MC3T3-E1 λόγω δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου. Σε αυτόν το μηχανισμό συμβαίνει ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 και των επιπέδων ασβεστίου και επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών και των καλπαϊνών (Tang et al. 2009). Αντίστοιχος αποπτωτικός μηχανισμός που περιλαμβάνει ενεργοποίηση των καλπαϊνών και των κασπασών έχει περιγραφεί για την αποπτωτική δράση του φλαβονοειδούς καμπερόλη (3,4',5,7-τετραυδρόξυ φλαβόνη), στην οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα οι φυσιολογικοί οστεοβλάστες, αλλά όχι τα καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος (Huang et al. 2010).

Είναι ενδιαφέρον ότι έχουν περιγραφεί και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου στο οστό όπου συμμετέχουν άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, πλην των κασπασών. Αυτό συμβαίνει διότι, κατά τη διαφοροποίηση και ανακατασκευή του οστού, οι οστεοβλάστες οδηγούνται σε μορφές κυτταρικού θανάτου εκτός της απόπτωσης, κυρίως λόγω της δυσκολίας των φαγοκυττάρων να τους προσεγγίσουν. Έτσι, σε κύτταρα οστεοσαρκώματος U2OS, η χορήγηση δεξαμεθαζόνης συνδέεται με την επαγωγή της θρυμματίνης A, της κασπάσης-6 καθώς και τη μειωμένη έκφραση μορίων της οικογένειας BCL-2, όπως BCL-X_L και MCL-1 (Lu et al. 2007), και ακόμη στα κύτταρα οστεοσαρκώματος Ewing SK-N-MC, A673, SK-ES-1 και L1062 ενεργοποιείται το μονοπάτι της θρυμματίνης/περφορίνης (de Hooge et al. 2007). Τέλος, υπάρχουν αναφορές για τη συμμετοχή των καθεψινών στην απόπτωση των οστεοκλαστών (Chen et al. 2007).

Εξάλλου, οι οστεοβλάστες και τα κύτταρα οστεοσαρκώματος εκφράζουν την πλειονότητα των κλασσικών προσδετών/υποδοχέων θανάτου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, το οποίο συνδέεται με ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Το πιο κλασσικό αποπτωτικό σύστημα FAS/FASL προκαλεί απόπτωση σε φυσιολογικούς οστεοβλάστες, στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63 και στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος Ewing SK-N-MC, A673, L1062 και RD-ES, ενώ οι κυτταρικές σειρές TC-268 και IMR-320 εμφανίζουν ανθεκτικότητα (Duque et al. 2004; Kontny et al. 2001; Mitsiades et al. 1999). Σε αυτήν την περίπτωση, η επαγωγή της απόπτωσης συνδέεται με ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 και στα κύτταρα MG63 ενισχύεται παρουσία του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α) ή της ιντερλευκίνης-1β (Interleukin-1β, IL-1β) (Tsuboi et al. 1999).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η δέσμευση του σχετιζόμενου με τον TNF προσδέτη επαγωγής απόπτωσης (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, TRAIL) στον υποδοχέα του δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα σε πρωτογενείς καλλιέργειες οστεοβλαστών ή στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος HOS, MG63, SJSA-1, G-292, SaOS-2, αλλά επάγει απόπτωση στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος Ewing CHP-100, RD-ES, SB, SK-N-MC, TC32, TC71, 5838 μέσω του κλασσικού μονοπατιού που περιλαμβάνει ενεργοποίηση των κασπασών (Evndokiu et al. 2002; Kontny et al. 2001). Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο TRAIL επάγει απόπτωση στα κύτταρα U2OS με την ενεργοποίηση ενός εναλλακτικού αποπτωτικού μονοπατιού που βασίζεται στην πρωτεόλυση του BID από την καθεψίνη B (Garnett et al. 2007). Στο κλασσικό αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον TRAIL εμφανίζουν ευαισθησία και οι οστεοκλάστες (Colucci et al. 2007). Το αποπτωτικό μονοπάτι του σχετιζόμενου με τον TNF ήπιου επαγωγέα της απόπτωσης (TNF-related Weak Inducer of Apoptosis, TWEAK) με τον υποδοχέα του DR3 έχει μελετηθεί λιγότερο, αλλά είναι γνωστό ότι επάγει απόπτωση στους φυσιολογικούς οστεοβλάστες και στα κύτταρα MG63. Η παραπάνω σηματοδότηση ενεργοποιείται κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από αυξημένη συγκέντρωση TNF-α (Borysenko et al. 2006). Σχετικά με τη δράση του TNF-α στην απόπτωση των οστεοβλαστών, τα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι φυσιολογικοί οστεοβλάστες είναι ευαίσθητοι στην απόπτωση - η οποία χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των κασπασών -, αλλά η κυτταρική σειρά MG63 εμφανίζει ανθεκτικότητα (Tsuboi et al. 1999; Chua et al. 2002). Η δράση του TNF-α σε συνάρτηση με το φαινόμενο της απόπτωσης και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από αυτόν θα αναλυθούν στην επόμενη ενότητα.

1.3 Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων-α

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α) είναι μία κυτταροκίνη η οποία παράγεται με τη μορφή πρόδρομου μορίου που αποτελείται από 233 αμινοξέα και έχει μέγεθος 26 kDa, το γονίδιο της οποίας εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στον άνθρωπο (6p21.3) και αποτελείται από τέσσερα εξόνια (Carroll et al. 1987). Αρχικά το μόριο συντίθεται ως μία μη γλυκοζυλιωμένη πρόδρομη μορφή η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και μετατρέπεται στο ώριμο διαλυτό μονομερές με την επίδραση μιας πρωτεάσης σερίνης, του μετατρεπτικού ενζύμου του TNF-α (TNF-α Converting Enzyme, TACE). Η TACE είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου από το N-τελικό άκρο που αποτελείται από 76 αμινοξέα και το τμήμα που απομένει αποτελεί την ώριμη υπομονάδα του TNF-α η οποία αποτελείται από 157 αμινοξέα και έχει μέγεθος 17 kDa (Black et al. 1997). Το δραστικό μόριο του TNF-α είναι η τριμερής μορφή της ώριμης υπομονάδας η οποία παρουσιάζει τρεις ενεργές θέσεις δέσμησης. Συγκεκριμένα, η τεταρτοταγής δομή του TNF-α απεικονίζεται ως μια τριγωνική πυραμοειδής μορφή, όπου η κάθε βάση της απαρτίζεται από ένα μονομερές του μορίου και η θέση δέσμησης για τον υποδοχέα του TNF-α εντοπίζεται στη βάση της πυραμίδας.

Ο TNF-α συντίθεται *de novo* μετά από ενεργοποίηση του κατάλληλου κυτταρικού τύπου. Ο TNF-α παράγεται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (B- και T-λεμφοκύτταρα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα) και άλλους κυτταρικούς τύπους όπως ινοβλάστες, οστεοκλάστες, λεία μυικά κύτταρα, νευρώνες, αστροκύτταρα και πολλά καρκινικά κύτταρα. Η σύνθεση του TNF-α ρυθμίζεται από λιποπολυσακχαρίτες, ιικά και μυκητιακά αντιγόνα, εντεροτοξίνη, ανοσολογικά σύμπλοκα καθώς και με αυτοκρινή τρόπο, ενώ τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν τη σύνθεση του TNF-α τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο. Η ποσότητα του TNF-α αυξάνεται σε χρονικό διάστημα 15-30 λεπτών από τη στιγμή της διέγερσης, ωστόσο, από τη στιγμή που το ερέθισμα διακοπεί, το mRNA του TNF-α αποικοδομείται ταχύτατα από κυτταροπλασματικές

ριβονουκλεάσες λόγω της ύπαρξης του οκταμερούς UUAUUUAU στο 3' άκρο, το οποίο προσδίδει αστάθεια στο μόριο.

1.3.1.1 Ο βιολογικός ρόλος του TNF-α

Ο TNF-α έχει πληθώρα δράσεων σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, το αποτέλεσμα των οποίων καθορίζεται από τη συγκέντρωση και το χρόνο έκθεσης των κυττάρων στον παράγοντα καθώς επίσης από την παρουσία ή όχι άλλων μορίων που δρουν σε συνέργεια με τον TNF-α. Ο TNF-α συμμετέχει σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση, η απόπτωση αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η καρκινογένεση και η απόκριση στην ιική, βακτηριακή ή παρασιτική προσβολή. Ο TNF-α έχει χαρακτηριστεί ως ο κυριότερος διαμεσολαβητής της άμυνας έναντι των Gram⁻ βακτηρίων. Ο κύριος ρόλος του TNF-α εντοπίζεται στη φλεγμονή, όπου ενισχύει τη φαγοκυττάρωση και την προσέλκυση των πολυμορφοπύρηνων και των μονοκυττάρων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο TNF-α προκαλεί την έκφραση νέων επιφανειακών υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιτρέποντας σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να κινηθούν προς το σημείο της φλεγμονής. Ακόμη προκαλεί την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων-μακροφάγων και την επακόλουθη παραγωγή άλλων κυτταροκινών όπως IL-1α, IL-1β, IL-6 αλλά και του ίδιου του TNF-α. Στις περιπτώσεις που το σήμα που διεγείρει την παραγωγή του είναι παρατεταμένο, ο TNF-α δρα ενδοκρινώς και προκαλεί πυρετό και υπνηλία. Σε αυτές τις περιπτώσεις συμβαίνει απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών, ενεργοποίηση των μονοκυττάρων-μακροφάγων και επακόλουθη παραγωγή κυτταροκινών όπως IL-1α, IL-1β, IL-6 και ακόμη παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών του ορού, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξεία φάση της λοίμωξης. Τέλος, χρόνια και παρατεταμένη χορήγηση TNF-α προκαλεί φαινόμενα καχεξίας, τα οποία χαρακτηρίζονται από ανορεξία, διαταραχές καταβολισμού, απώλεια βάρους και αναιμία (Beutler and Cerami 1989).

Εξαιτίας του σημαντικού βιολογικού ρόλου και τον έλεγχο μιας πληθώρας φυσιολογικών και παθολογικών λειτουργιών από τον TNF-α, η ρύθμιση της παραγωγής και της ενεργοποίησής του εμπλέκεται στην παθογένεια μιας σειράς ασθενειών όπως η οστεοπόρωση, η σήψη, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος και φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες. Κατά συνέπεια η κατανόηση και η διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από τον TNF-α

επιτρέπουν την ανάπτυξη κατάλληλων θεραπευτικών αγωγών για τις ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το μόριο αυτό.

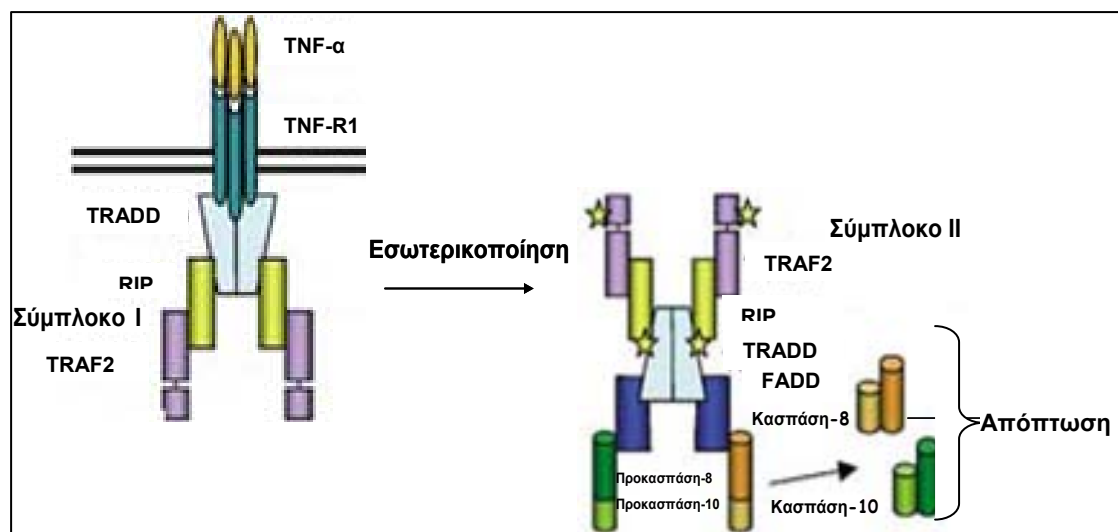
1.3.1.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει ο TNF-α

Ο TNF-α απαντάται στα κύτταρα με μία μεμβρανο-συνδεδεμένη μορφή (mTNF) και με μία διαλυτή μορφή (sTNF). Η σηματοδότηση του TNF-α στα θηλαστικά πραγματοποιείται μέσω δύο διακριτών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας: του TNF-R1 (p55 ή τύπου I ή CD120a), που είναι ο κύριος υποδοχέας για τον sTNF και του TNF-R2 (p75 ή τύπου II ή CD120b), που είναι ο κύριος υποδοχέας για τον mTNF (Smith et al. 1994). Στην πλειονότητα των κυττάρων κυριαρχεί ο υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκων 1 (Tumor Necrosis Factor-R1, TNF-R1) του οποίου η έκφραση είναι συνεχής, ενώ η έκφραση του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων 2 (Tumor Necrosis Factor-R2, TNF-R2) υφίσταται ρύθμιση. Η εξωκυτταρική περιοχή των υποδοχέων περιέχει θέσεις γλυκοζυλίωσης και τέσσερις επικράτειες πλούσιες σε κυστεΐνη. Η ενδοκυτταρική περιοχή των υποδοχέων παρουσιάζει δομικές διαφορές, καθώς στην κυτταροπλασματική πλευρά του TNF-R1 υπάρχει μία επικράτεια θανάτου, ενώ στον TNF-R2 δεν υπάρχει επικράτεια θανάτου, αλλά μία επικράτεια δέσμευσης των παραγόντων σχετιζόμενων με τον TNF-R (TNFR-Associated Factors, TRAFs).

Η πρόσδεση της τριμερούς μορφής του TNF-α στο προσχηματισμένο τριμερές του υποδοχέα οφείλεται στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και πυροδοτεί τη δέσμευση μιας σειράς παραγόντων. Αν πρόκειται για τον υποδοχέα TNF-R1, προκαλεί τη δέσμευση της πρωτεΐνης TRADD (TNF-Receptor Associated Death Domain), η οποία περιέχει επικράτεια θανάτου μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα (Hsu et al. 1995). Παράλληλα, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα 1 (Receptor Interacting Protein 1, RIP1) και τις TRAF2 ή TRAF5 και σχηματίζει το σύμπλοκο I. Το σύμπλοκο I εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και προκαλεί την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1 (Activator Protein-1, AP-1). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τον υποδοχέα υφίστανται μία σειρά μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (όπως ουβικιτινίωση της κινάσης RIP1) και τα επίπεδά τους μειώνονται σταδιακά. Ακολούθως, ο υποδοχέας TNF-R1 υφίσταται ενδοκυττάρωση και οι πρωτεΐνες TRADD-RIP1 αποδεσμεύονται από αυτόν και

μετακινούνται προς το κυτταρόπλασμα. Η TRADD μέσω της επικράτειας θανάτου στρατολογεί την FADD η οποία στη συνέχεια στρατολογεί τις προκασπάσες-8 και -10 και δημιουργείται το σύμπλοκο II. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενεργοποίηση των προ-κασπασών οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Kucharczak et al. 2003) (Εικόνα 5).

Η δέσμευση των κασπασών-8 και -10 στο σύμπλοκο II ανταγωνίζεται με την κυτταρική πρωτεΐνη αναστολής της FLICE (cellular FLICE-Inhibitory Protein, c-FLIP) η οποία παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με τις κασπάσες και δεσμεύεται στο σύμπλοκο, αλλά δεν έχει καταλυτική δραστηριότητα. Επίσης, η c-FLIP δρα ανασταλτικά στην απόπτωση διότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TRAF2 και RIP1 του συμπλόκου, οπότε προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση του NF-κB (Shu et al. 1997; Irmeler et al. 1997). Επειδή τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης c-FLIP καθορίζονται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, η επαγόμενη από το σύμπλοκο I ενεργοποίηση του NF-κB καθορίζει την αποπτωτική δράση του συμπλόκου II. Επομένως, ο ρόλος της πρωτεΐνης c-FLIP είναι διττός: ρυθμίζει τη δράση του TNF-α ως παράγοντα απόπτωσης και ακόμη πιστοποιεί το σήμα που επάγεται από το σύμπλοκο I.



Εικόνα 5: Η δέσμευση του TNF-α στον TNF-R1 προκαλεί το σχηματισμό του συμπλόκου I, το οποίο αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα, στρατολογεί την FADD και μέσω σχηματισμού του συμπλόκου II επάγει απόπτωση (Kucharczak et al. 2003).

Η επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση ενισχύεται κατά την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των υποδοχέων TNF-R1 και TNF-R2. Όπως προαναφέρθηκε, ο υποδοχέας TNF-R2 δεν περιέχει την επικράτεια θανάτου και αλληλεπιδρά απ'ευθείας με τις πρωτεΐνες TRAF2 και TRAF1, με αποτέλεσμα ο TNF-R2 να προκαλεί την

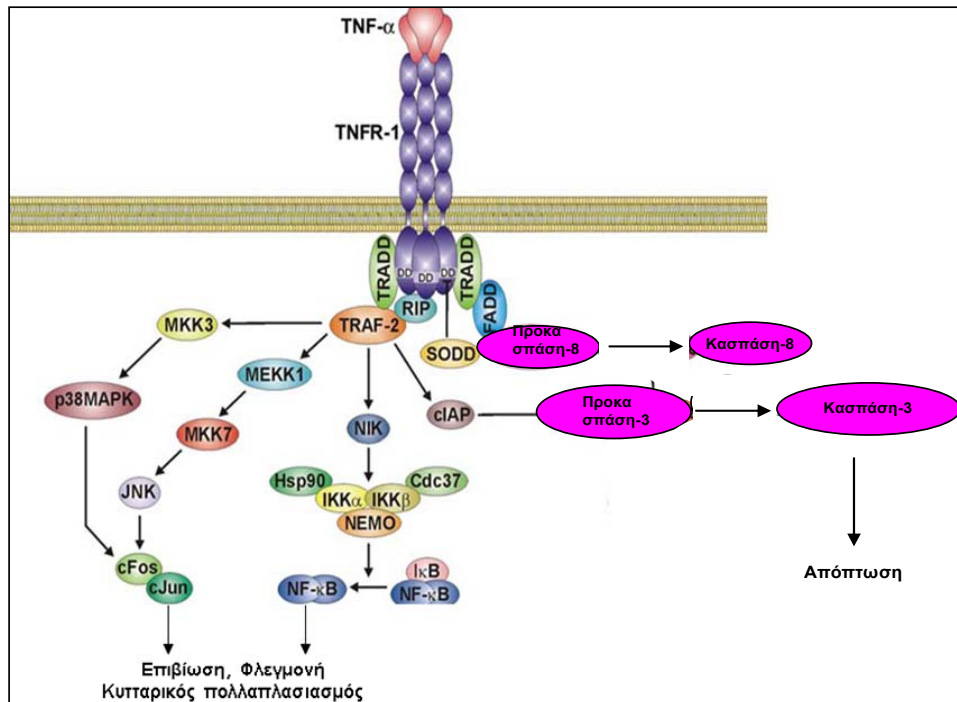
αποικοδόμηση της TRAF2. Αυτό έχει ως συνέπεια την αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB και της στρατολόγησης των cIAPs στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον TNF-R1 και επομένως την ενίσχυση της απόπτωσης.

Εκτός από το αποπτωτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει τα σύμπλοκα I και II, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας ακόμη μηχανισμός απόπτωσης. Σε αυτήν την περίπτωση συμβαίνει αποικοδόμηση των αναστολέων cIAP1 και cIAP2 και αποουβικιτινίωση της κινάσης RIP1. Κατά συνέπεια, η RIP1 απελευθερώνεται από το σύμπλοκο των TRAF-2-TRADD-RIP1 όπου συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB και συμμετέχει στο σχηματισμό ενός νέου συμπλόκου μαζί με τις FADD και προ-κασπάση-8 που οδηγεί σε απόπτωση (Wang et al. 2008).

Τέλος σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η πρόσδεση του TNF-α στους υποδοχείς του μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε μία μορφή θανάτου με χαρακτηριστικά νέκρωσης που περιλαμβάνει την RIP1 και το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) όπως H_2O_2 , O_2^- , $HO^\bullet$ (Holler et al. 2000). Στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TNF-α, η RIP1 αλληλεπιδρά με την TRAF2 και οδηγεί σε ένα είδος κυτταρικού θανάτου που διαμεσολαβείται από τις κινάσες του N-τελικού άκρου του *c-JUN* (*c-JUN* N-terminal Kinases, JNKs) και την οξειδάση NOX1, αλλά όχι από τις κασπάσες. Εξάλλου, η ενεργοποίηση των JNKs συνδέεται και με την ενεργοποίηση του NF-κB και την αναστολή της απόπτωσης. Κατά συνέπεια, οι JNKs έχουν αντίθετες δράσεις στους παρακάτω μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου: αναστέλλουν την επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση και ενισχύουν την επαγόμενη από τον TNF-α νέκρωση, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν στην εκδήλωση της φλεγμονής (Ventura et al. 2004). Είναι ενδιαφέρον ότι, αν και η λειτουργία της πρωτεΐνης FADD είναι προ-αποπτωτική, δρα παρεμποδιστικά στο μονοπάτι της νέκρωσης. Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση της FADD είναι καθοριστική για την επιλογή του εξαρτώμενου από τις κασπάσες ή του ανεξάρτητου από τις κασπάσες αποπτωτικού μονοπατιού. Όμως επειδή υπάρχουν αναφορές όπου απαιτείται η πρωτεΐνη FADD για το σχηματισμό του συμπλόκου που επάγει την νέκρωση από τον TNF-α, πιθανόν η παρουσία της FADD να εξαρτάται από όχι μόνο από τον προσδέτη-υποδοχέα θανάτου, αλλά και από τον κυτταρικό τύπο (Lin et al. 2004).

Η ανθεκτικότητα των κυττάρων έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α εξαρτάται από τη δημιουργία του συμπλόκου I, μέσω του οποίου ενεργοποιούνται κομβικές κινάσες όπως η AKT/PKB και οι κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα

(Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs) οι οποίες καταλήγουν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NF- κ B (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τη δέσμευση του TNF- α στον TNF-R1 και καταλήγουν στην ενεργοποίηση των AP-1 και NF- κ B ή των κασπασών (van Horssen et al. 2006).

-AKT/PKB

Η πρωτεΐνη AKT/PKB είναι μία κινάση σερίνης-θρεονίνης η οποία αποτελείται από μία αμινοτελική επικράτεια με ομολογία στην πλεκστρίνη (PH), μία κεντρική καταλυτική και μία μικρή καρβοξυτελική ρυθμιστική επικράτεια. Η AKT/PKB ενεργοποιείται από ποικίλα ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, κυτταροκίνες και παράγοντες στρες μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει ενεργοποίηση της κινάσης της 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI-3K). Η PI-3K φωσφορυλιώνει την 4, 5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (Phosphatidylinositol 4,5-bisPhosphate, PIP₂) προς 3, 4, 5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (Phosphatidylinositol 3,4,5-triPhosphate, PIP₃), η οποία προσδένεται στην AKT/PKB. Με αυτόν τον τρόπο η AKT/PKB προσελκύεται στη μεμβράνη και φωσφορυλιώνεται σε κατάλληλα κατάλοιπα. Η φωσφορυλίωση της AKT/PKB στη θρεονίνη 308 γίνεται από την εξαρτώμενη από την PI-3K κινάση 1 (PI-3K-Dependent Kinase 1, PDK1) και αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την ενεργοποίησή της, ενώ για την πλήρη

ενεργοποίησή της απαιτείται η φωσφορυλίωσή της στη σερίνη 473 που γίνεται από την εξαρτώμενη από την PI-3K κινάση 2 (PI-3K-Dependent Kinase 2, PDK2) ή άλλες κινάσες όπως οι MAPKs, η κινάση του IKB (IKB Kinase, IKK), η κινάση συνδεδεμένη με ιντεγκρίνες (Integrin-Linked Kinase, ILK), ενώ έχουν προταθεί και μηχανισμοί αυτοφωσφορυλίωσης (Toker and Newton 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει αναφερθεί ενεργοποίηση της AKT/PKB μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (Protein Kinase A, PKA) και της εξαρτώμενης από το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνης κινάσης (Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Kinase) και μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ27 (Heat Shock Protein27, HSP27) σε περιπτώσεις κυτταρικού στρες (Konishi et al. 1997; Filippa et al. 1999; Perez-Garcia et al. 2004). Η φωσφατάση με ομολογία με την τενσίνη (Phosphatase and TENsin homolog, PTEN) ελέγχει την ενεργοποίηση της AKT/PKB μέσω αποφωσφορυλίωσης της 3,4,5-τριφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης.

Το μονοπάτι PI-3K-AKT/PKB παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές διαδικασίες μεταξύ των οποίων η προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αγγειογένεση (Nicholson and Anderson 2002). Ειδικά στην προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης, η AKT/PKB αναστέλλει τη δράση της κασπάσης-9 με φωσφορυλίωση στη σερίνη 196 και επακόλουθη αλλαγή στη διαμόρφωσή της (Cardone et al. 1998) και ακόμη ρυθμίζει τη δράση του BAD μέσω φωσφορυλίωσης στη σερίνη 136 που επιτρέπει την απελευθέρωσή του από τα μόρια BCL-2 και BCL-X_L (Datta et al. 1997). Επιπλέον η ενεργοποιημένη AKT/PKB παρεμποδίζει την επαγωγή της απόπτωσης από την p53 με τη μείωση των επιπέδων της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης PUMA ή εναλλακτικά με αυξημένη δραστηριότητα λιγάσης ουβικιτίνης που προκαλεί την αποικοδόμηση της p53 στο πρωτεάσωμα ή με φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης MDM2 και εισαγωγή της στον πυρήνα και αναστολή της μεταγραφικής δράσης της p53 (Gottlieb et al. 2002). Η αναστολή της απόπτωσης από την AKT/PKB περιλαμβάνει ακόμη την ενεργοποίηση σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως των NF-KB μετά από φωσφορυλίωση του αναστολέα του NF-KB (Inhibitor of NF-KB, IKB) (Wang et al. 1999b) και των CREB οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μεταγραφή αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Ακόμη, η AKT/PKB φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες με ομολογία Forkhead του ραβδομυοσαρκώματος (Forkhead Homolog in Rhabdomyosarcoma, FKHR) με αποτέλεσμα τη διατήρησή τους στο κυτταρόπλασμα και αναστολής της έκφρασης

προ-αποπτωτικών γονιδίων όπως BIM, FASL, TRAIL και TRADD (Burgering and Medema 2003). Ακόμη η AKT/PKB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω ρύθμισης της έκφρασης των CDKs και των αναστολέων p27^{KIP1} και p21^{waf1/cip1} (Viglietto et al. 2002; Zhou et al. 2001). Επίσης, η AKT/PKB φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη-στόχο της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian Target Of Rapamycin, mTOR), η οποία ενισχύει τη μετάφραση του mRNA, καθώς και την κινάση 3β της συνθετάσης του γλυκογόνου (Glucogen Synthase Kinase 3β, GSK3β), η οποία ενισχύει τη σταθερότητα των κυκλινών-D και -E και των μεταγραφικών παραγόντων c-JUN και c-MYC (Diehl et al. 1998).

-MAPKs

Οι MAPKs είναι κυτταροπλασματικές κινάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από πολλαπλά ερεθίσματα, όπως ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και παράγοντες στρες. Η οικογένεια των MAPKs των θηλαστικών περιλαμβάνει την υποοικογένεια των ρυθμιζόμενων από εξωτερικά σήματα κινάσων (Extracellular Regulated Kinases, ERKs), την υποοικογένεια των JNKs, την υποοικογένεια των p38 και την υποοικογένεια των ERK5 (Chang and Karin 2001). Η ποικιλία των ερεθισμάτων που χρησιμοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPKs υποδηλώνει σημαντικό ρόλο στο κύτταρο και η ενεργοποίηση/απενεργοποίησή του υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Η δέσμευση του σηματοδοτικού μορίου στον κατάλληλο υποδοχέα προκαλεί την ενεργοποίηση του υποδοχέα, τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών-συνδετήρων (adaptor proteins) και την ενεργοποίηση μιας σειράς πρωτεϊνών. Αρχικά ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες RAS και στη συνέχεια οι κινάσες των MAPKKs (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinases, MAPKKKs) ή MEKKs και τελικά οι κινάσες των MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase Kinases, MAPKKs) ή MEKs. Έπειτα αυτές οι διπλής εξειδίκευσης κινάσες σερίνης/θρεονίνης/τυροσίνης φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAPKs. Η πλήρως ενεργοποιημένη μορφή των MAPKs περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωσή τους σε δύο αμινοξικά κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης σύμφωνα με την ακολουθία θρεονίνη-X-τυροσίνη. Οι ενεργοποιημένες MAPKs φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τα υποστρώματά τους τα οποία περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, φωσφολιπάσες, κινάσες και άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της ενεργοποίησης των MAPKs βασίζεται στη δράση των φωσφατασών

διπλής ειδικότητας (Dual Specificity Phosphatases, DSPs) (Camps et al. 2000; Farooq and Zhou 2004).

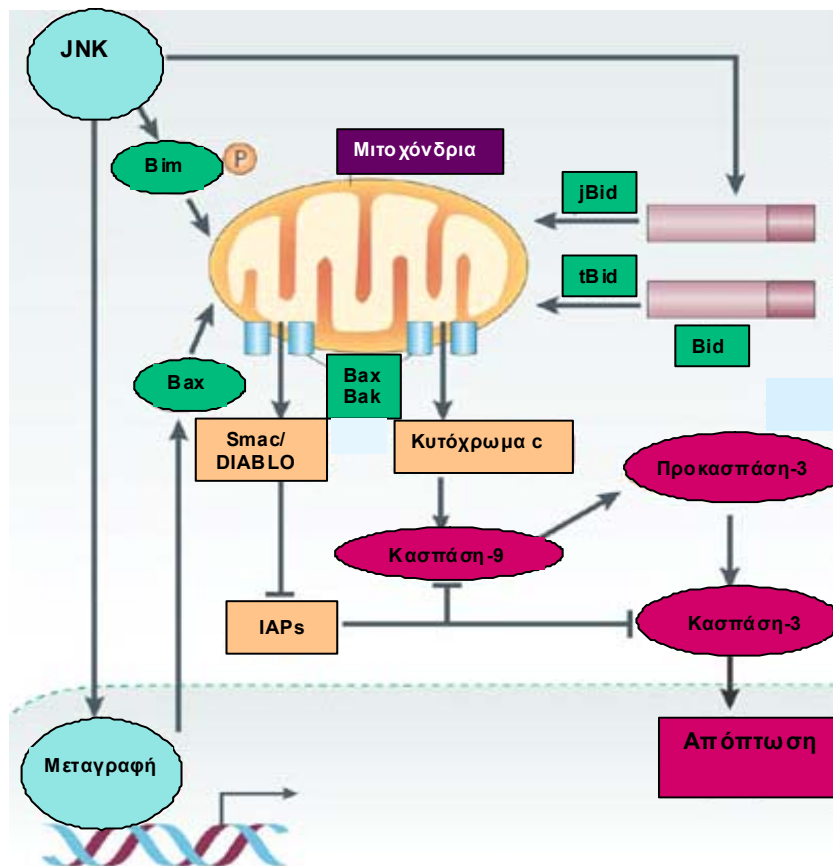
Οι πρωτεΐνες ERK1-p44 και ERK2-p42 ενεργοποιούνται κυρίως υπό την επίδραση μιτογόνων ερεθισμάτων, αυξητικών παραγόντων και φορβολικών εστέρων μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τις RAS/RAF και τις MEK1 και MEK2. Οι ενεργοποιημένες ERKs μεταφέρονται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες ELK-1, c-JUN, c-FOS, ATF2, c-MYC και προκαλούν τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Brunet et al. 1999b). Ακόμη, οι ERKs φωσφορυλιώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO3a και επάγουν την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα (Yang et al. 2008) καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες CREB ευνοώντας την κυτταρική επιβίωση (Bonni et al. 1999). Επίσης ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στη φωσφορυλίωση μελών της οικογένειας των BCL-2 πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων του BAD στη σερίνη 112, που προκαλεί την απενεργοποίησή του και του BIM στις σερίνες 55, 65 και 73, που αναστέλλει την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα ή στη θρεονίνη 112 που μειώνει την ικανότητα δέσμευσης του στην πρωτεΐνη BCL-2 (Ley et al. 2003). Αν και η ενεργοποίηση των ERKs σχετίζεται κυρίως με αναστολή της απόπτωσης, υπάρχουν αναφορές που προτείνουν ότι σε περιπτώσεις βλάβης στο DNA συνδέεται με παύση του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της απόπτωσης, ενώ έχει διαπιστωθεί αλληλεπίδραση των ERKs με το προ-αποπτωτικό μόριο BIK, με αποτέλεσμα οι πρώτες να συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα (Mebratu et al. 2008; Wang et al. 2000a). Συμπερασματικά απαιτούνται επιπλέον μελέτες σχετικά με το ρόλο των ERKs στην επαγωγή της απόπτωσης, ο οποίος εξαρτάται από το αποπτωτικό ερέθισμα, τον κυτταρικό τύπο και πιθανόν από τη χρονική διάρκεια της ενεργοποίησης της κινάσης. Ειδικότερα, άμεση και παροδική ενεργοποίηση συνδέεται με προστασία από την απόπτωση, ενώ παρατεταμένη ενεργοποίηση συνδέεται με επαγωγή της απόπτωσης (Agell et al. 2002).

Οι πρωτεΐνες JNKs και p38 ενεργοποιούνται από ποικίλα ερεθίσματα - κυρίως διάφορες μορφές κυτταρικού στρες και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αλλά μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι JNKs - στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί οι JNK1, JNK2 και JNK3 - ενεργοποιούνται άμεσα από τις κινάσες των MAPKs, MKK4 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4) και MKK7 (Mitogen-

Activated Protein Kinase Kinase 7), όπου η MKK4 φωσφορυλιώνει με μεγαλύτερη συγγένεια την τυροσίνη 185 και η MKK7 φωσφορυλιώνει με μεγαλύτερη συγγένεια τη θρεονίνη 183 (Davis 2000). Η ενεργοποίηση των MKK4/7 καθορίζεται από διάφορες κινάσες όπως κινάση ρυθμιζόμενη από σήμα απόπτωσης 1 (Apoptosis-Signal Regulating Kinase 1, ASK1), κινάσες των κινασών MAP/ERK (MAP/ERK Kinase Kinase, MEKKs), κινάση μικτής σειράς (Mixed Lineage Kinase, MLK), κινάση ενεργοποιούμενη από τον TGF- β 1 (TGF- β -Activated Kinase 1, TAK1) και κινάση της περιοχής αύξησης όγκου 2 (Tumor Progression Locus 2, TPL-2) και ελέγχεται από πρωτεΐνες αλληλεπιδρώσες με τις JNKs (JNK Interacting Proteins, JIPs). Η πλήρης φωσφορυλίωση των JNKs προκαλεί αντικρουόμενες κυτταρικές αποκρίσεις, δεδομένου ότι ενεργοποιούν μία πληθώρα διαφορετικών υποστρωμάτων ανάλογα με τις συνθήκες και το ερέθισμα. Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα των JNKs περιλαμβάνουν μέλη των AP-1 μεταγραφικών παραγόντων όπως c-JUN, JUND, ATF2 και ακόμη ELK-1, πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T-κυττάρων c2 (Nuclear Factor of Activated T cells c2, NFATc2) και p53 (Ortega-Perez et al. 2005; Hibi et al. 1993; Buschmann et al. 2001), ιστόνες και μέλη της οικογένειας BCL-2 (Maundrell et al. 1997; Yu et al. 2004).

Είναι αξιοσημείωτο, ότι, ενώ θεωρείται ότι οι JNKs σηματοδοτούν την απόπτωση, υπάρχουν μελέτες που προτείνουν ότι μπορεί να συμμετέχουν στην επιβίωση των κυττάρων, ανάλογα με τις συνθήκες. Τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η επίδραση των JNKs στην απόπτωση εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, το ερέθισμα και τη διάρκεια ενεργοποίησης. Η σύντομη διάρκεια ενεργοποίησης των JNKs (< 1 ώρα) σηματοδοτεί την κυτταρική επιβίωση, ενώ η παρατεταμένη ενεργοποίηση συνδέεται με την επαγωγή της απόπτωσης (Ventura et al. 2006). Αυτό το φαινόμενο έχει ιδιαίτερη σημασία κατά την επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF- α , όπου η ενεργοποίηση του NF-KB αναστέλλει την παρατεταμένη ενεργοποίηση των JNKs. Οι πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές περιγράφουν τον αποπτωτικό ρόλο των JNKs κατά την έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες στρες και φλεγμονής ή λόγω απώλειας σύνδεσης με τον εξωκυττάριο χώρο (Verheij et al. 1996), μέσω ενεργοποίησης της AP-1 και επαγωγής προ-αποπτωτικών μορίων όπως BAX, BIM, BMF και FASL ή φωσφορυλίωσης αντι-αποπτωτικών μορίων όπως BCL-2 και BCL-X_L (Kasibhatla et al. 1998; Lei and Davis 2003; Fan et al. 2000). Εναλλακτικά έχει προταθεί ότι οι JNKs συμβάλλουν στην

ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μέσω πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης BID, προς ένα προϊόν jBID, το οποίο μετακινείται προς τα μιτοχόνδρια όπου επάγει την απελευθέρωση της πρωτεΐνης SMAC/DIABLO και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Deng et al. 2003). Το σηματοδοτικό μονοπάτι JNK-jBID-SMAC/DIABLO αποτελεί έναν ακόμη τρόπο σύνδεσης του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης με το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου (Varfolomeev and Ashkenazi 2004) (Εικόνα 7). Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των JNKs ίσως είναι απαραίτητη διότι η έκφραση των μορίων που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα c-JUN και/ή των ενδιάμεσων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού της απόπτωσης (π.χ. jBID ή SMAC/DIABLO) καθυστερεί. Επίσης, είναι πιθανό η ποσότητα των μορίων αυτών να μην είναι αρκετή για να επάγει τη δράση τους.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού JNK-jBid-Smac/Diablo το οποίο καταλήγει στην απόπτωση με τη συμμετοχή των μιτοχονδρίων και των υποδοχέων θανάτου (Clarke and Tyler 2009).

Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι οι JNKs μεταδίδουν σήματα επιβίωσης μέσω επαγωγής της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-X_L σε T-λεμφοκύτταρα ή μέσω φωσφορυλίωσης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BAD (Nishina et al. 1998; Yu et al.

2004). Ακόμη, έχει περιγραφεί η ενεργοποίηση των JNKs από την ινωδονεκτίνη μέσω του συμπλόκου FAK/p130Cas, η οποία επάγει την κυτταρική επιβίωση σε ινοβλάστες (Almeida et al. 2000). Επίσης μετά από επεξεργασία με TNF-α και σε συνθήκες όπου ο NF-KB δεν είναι λειτουργικός, οι JNKs αναστέλλουν την απόπτωση και προκαλούν νέκρωση που συνδέεται με αυξημένο σχηματισμό των ROS (Kamata et al. 2005; Ventura et al. 2004). Τέλος, στην περίπτωση που οι κασπάσες δεν είναι λειτουργικές, οι JNKs επάγουν μία μορφή κυτταρικού θανάτου με την ενεργοποίηση λυσοσωμικών πρωτεασών.

Η οικογένεια p38 αποτελείται από τουλάχιστον τέσσερις ομόλογες πρωτεΐνες τις p38α, p38β, p38γ και p38δ, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τις κινάσες των MAPKs, MKK3 και MKK6 ή μηχανισμούς αυτοφωσφορυλίωσης. Οι p38 συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, της κυτταρικής ανάπτυξης και της απόπτωσης (Hui et al. 2007; Han and Sun 2007). Αν και οι καλύτερα χαρακτηρισμένες λειτουργίες των p38 αφορούν την απόπτωση λόγω κυτταρικού στρες, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση των p38 μπορεί να συσχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση. Συγκεκριμένα ερεθίσματα που προκαλούν βλάβη στο DNA και ενεργοποίηση των p38 συνδέονται με την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, κυρίως λόγω της δράσης των p38 στην επιδιόρθωση της βλάβης στο DNA (Reinhardt et al. 2007). Επίσης έχει δειχτεί ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα τύπου-ινσουλίνης IGF-1R (Insulin-like Growth Factor) από την ιονίζουσα ακτινοβολία ενεργοποιεί τις κινάσες p38 και συμβάλλει στην αντοχή των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα έναντι της ακτινοβολίας (Cosaceanu et al. 2007). Τέλος, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση των p38 συνδέεται με την κυτταρική επιβίωση και τη μετάσταση, κυρίως μέσω επαγωγής της μεταλλοπρωτεάσης εξωκυττάριας ουσίας-9 (Matrix MetalloProteinase-9, MMP-9) σε κύτταρα από λευχαιμία (Ringshausen et al. 2004).

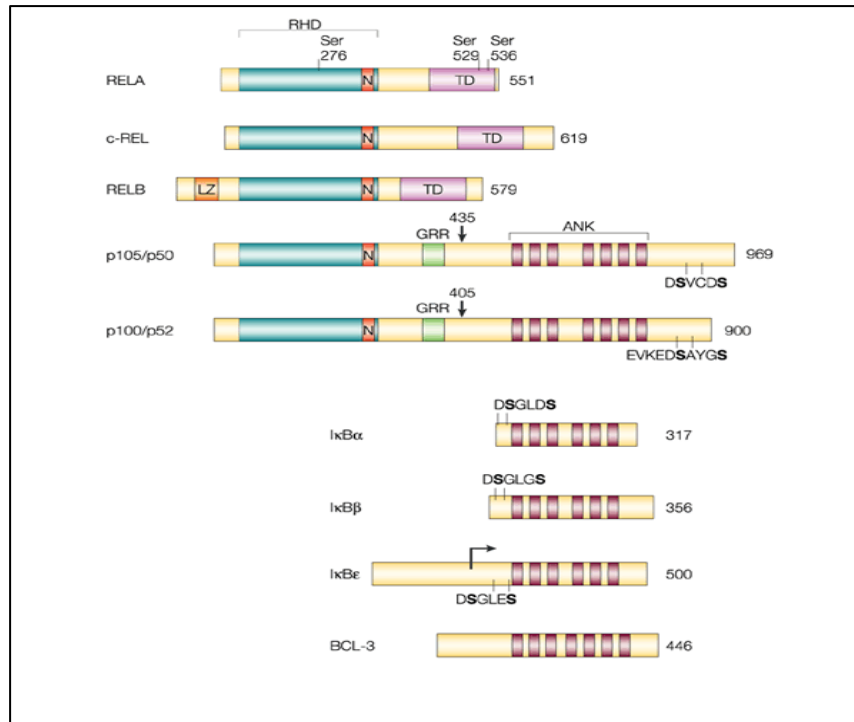
1.3.1.3 Ενεργοποίηση του NF-KB από τον TNF-α

1.3.1.3.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-KB

Η κυτταρική σηματοδότηση που επάγεται από τον TNF-α οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως NF-KB και AP-1, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση γονιδίων κυτταρικής επιβίωσης. Ειδικότερα, ο NF-KB συμμετέχει στη ρύθμιση γονιδίων που έχουν κυρίως στόχο την ανοσοδιέγερση: τη φλεγμονή, την

έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία, την ανάπτυξη των λεμφοειδών οργάνων και την έκφραση μιας σειράς πρωτεϊνών όπως κυτταροκίνες (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α, GM-CSF), χημειοκίνες όπως την IL-8 και τη ρυθμιζόμενη μετά από ενεργοποίηση, φυσιολογικά εκφραζόμενη και εκκρινόμενη από T-κύτταρα (Regulated upon Activation Normally T-cell Expressed and Secreted, RANTES) και μόρια προσκόλλησης όπως το μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης (Intercellular Cell Adhesion Molecule, ICAM) και το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης των αγγείων (Vascular Cell Adhesion Molecule, VCAM) (Ghosh et al. 1998; Naumann 2000). Η ενεργοποίηση του NF-KB οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες, ιοί, υπεριώδης ακτινοβολία κ.α.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-KB αναφέρεται σε ομοδιμερή ή ετεροδιμερή δύο τάξεων. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες RELA, c-REL και RELB, οι οποίες παράγονται στην ενεργή τους μορφή από τα γονίδια *RELA*, *c-REL* και *RELB*. Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *NFKB1* και *NFKB2*, οι οποίες παράγονται ως πρόδρομα μόρια, p105 και p100 και μετά από πρωτεόλυση μετατρέπονται στην ενεργή τους μορφή p50 και p52 (Heusch et al. 1999). Το καλύτερα μελετημένο και χαρακτηρισμένο είναι το ετεροδιμερές p65-p50, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GGGRNNYY-3', όπου R: πουρίνη και Y: πυριμιδίνη. Η δυνατότητα δημιουργίας διαφορετικών μορφών του NF-KB επιτρέπει την αναγνώριση διαφορετικών αλληλουχιών στο DNA και τη ρύθμιση της μεταγραφής πολλών γονιδίων, μεταξύ των οποίων του ίδιου του NF-KB. Το κοινό δομικό χαρακτηριστικό των διαφόρων μορφών του NF-KB είναι η ύπαρξη μίας συντηρημένης επικράτειας ομολογίας με Rel (Rel-homology domain, RHD) η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση στο DNA, το διμερισμό, τον πυρηνικό εντοπισμό και την αλληλεπίδραση με τους ειδικούς αναστολείς του NF-KB, IKBs (Ghosh et al. 1998) Οι IKBs αποτελούν τα μέλη μιας οικογένειας μορίων που περιλαμβάνει τα IKBα, IKBβ, IKBγ, IKBε, BCL-3 και τα πρόδρομα μόρια των πρωτεϊνών REL, p100 και p105. Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιέχουν επικράτειες επαναλήψεων αγκυρίνης (Ankyrin Repeat Domain, ARD) μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με την επικράτεια RHD του NF-KB και τον συγκρατούν στο κυτταρόπλασμα (Hatada et al. 1992) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Η δομή των υπομονάδων των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB (Li and Verma 2002).

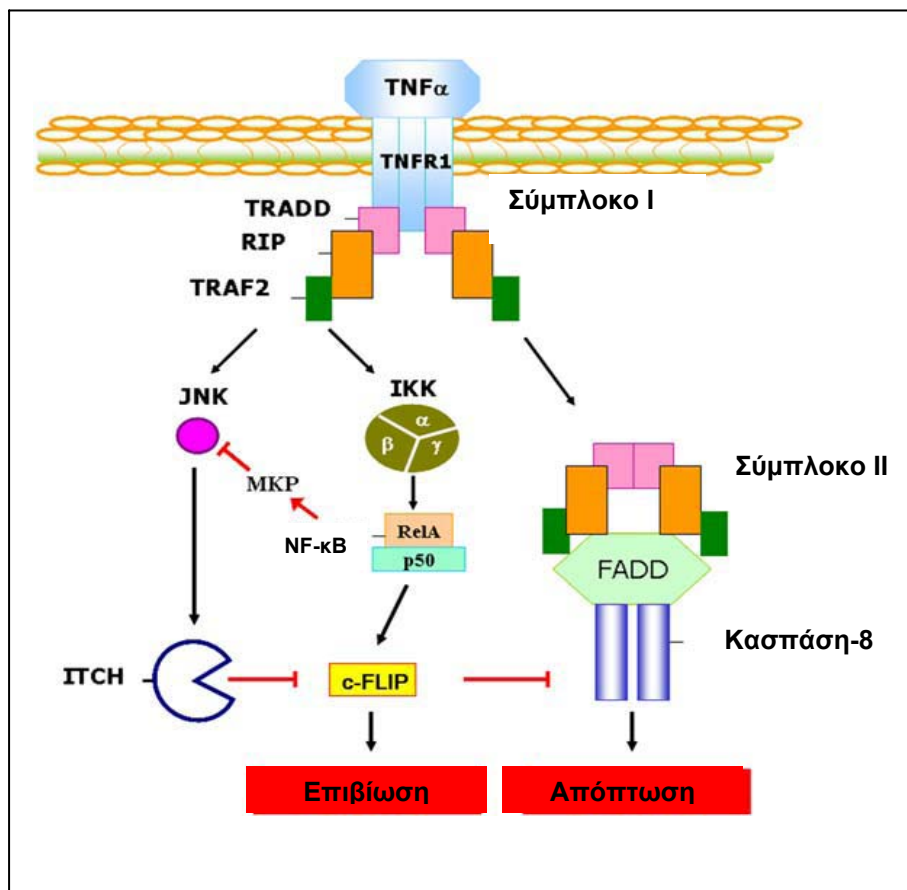
Η ενεργοποίηση του NF-κB βασίζεται στη μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της κινάσης IKK. Η κινάση του IκB αποτελείται από τις υπομονάδες, IKKα και IKKβ με καταλυτική δραστηριότητα και την υπομονάδα IKKγ ή βασικός τροποποιητής του NF-κB (NF-κB Essential Modifier, NEMO) με ρυθμιστικό ρόλο. Κατά την ενεργοποίηση του NF-κB συμβαίνει ενεργοποίηση της IKK με διμερισμό των υπομονάδων IKKα και IKKβ και δέσμευσή τους με την υπομονάδα IKKγ, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου (Mercurio et al. 1997; Zandi et al. 1997; Yamaoka et al. 1998). Η ενεργοποιημένη IKK φωσφορυλιώνει τον IκB, ο οποίος ουβικιτινιλιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Κατά συνέπεια, ο NF-κB απελευθερώνεται από τον αναστολέα και μετακινείται προς τον πυρήνα όπου επάγει τη μεταγραφή (Delhase et al. 1999). Επίσης έχει προταθεί ένα εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB κατά το οποίο η IKKα φωσφορυλιώνει την υπομονάδα p100 και τη μετατρέπει στην ενεργή μορφή p52 (Senftleben et al. 2001). Τέλος, πρόσφατα αναφέρθηκε ένας ακόμη μηχανισμός ενεργοποίησης ο οποίος δεν περιλαμβάνει ενεργοποίηση της IKK, αλλά βασίζεται στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται ο NF-κB. Έτσι κατά την επίδραση οξειδωτικού στρες σε σκελετικούς μυοβλάστες φωσφορυλιώνονται οι σερίνες 276 και 536 της p65 υπομονάδας του NF-κB και

ενισχύεται η μεταγραφική ικανότητα. Σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρείται αποικοδόμηση του IKB, ο οποίος παραμένει δεσμευμένος στον NF-KB, με αποτέλεσμα ένα μικρό ποσοστό του NF-KB να εισάγεται στον πυρήνα (Kefaloyianni et al. 2006).

1.3.1.3.2 Η αντι-αποπτωτική δράση του NF-KB

Η κυτταροτοξική δράση του TNF-α δεν είναι σημαντική εκτός αν συνδέεται με αναστολή της πρωτεϊνολύσεως ή της ενεργοποίησης του NF-KB, η αντι-αποπτωτική δράση του οποίου αποτελεί εμπόδιο στη χρήση του TNF-α ως θεραπευτικού παράγοντα (Kucharczak et al. 2003; Karin and Lin 2002). Ο NF-KB επάγει τη μεταγραφή γονιδίων με αντι-αποπτωτική δράση συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 όπως A1/BFL1, BCL-2, BCL-X_L, των αναστολέων των κασπασών c-IAPs, XIAP και επιβιωτίνη και των παραγόντων c-FLIP, TRAF1 και TRAF2 οι οποίοι συμμετέχουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση του NF-KB και την αναστολή της δράσης των IAPs στο σηματοδοτικό μηχανισμό του TNF-α (Shu et al. 1997; Irmeler et al. 1997; Karin and Lin 2002). Εξάλλου, η ρύθμιση της μεταγραφής των μορίων της οικογένειας BCL-2 από τον NF-KB αφορά και προ-αποπτωτικά μόρια όπως το BAX, η έκφραση του οποίου αυξάνεται σε κύτταρα όπου έχει κατασταλεί η ενεργότητα του NF-KB (Bentires-Alj et al. 2001), ενώ στο μονοπάτι της p53, ο NF-KB επάγει την MDM2 και οδηγεί την p53 σε αποικοδόμηση (Tergaonkar et al. 2002).

Επιπλέον, ο NF-KB ρυθμίζει την ενεργοποίηση των κινασών JNKs, που έχουν διττό ρόλο στην απόπτωση. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η ενεργοποίησή τους είναι σύντομη και δεν οδηγεί σε απόπτωση, εκτός αν παράλληλα συμβαίνει αναστολή της μεταγραφής ή ειδική αναστολή του NF-KB οπότε είναι παρατεταμένη και οδηγεί σε απόπτωση. Συγκεκριμένα, πρόσφατα διευκρινίστηκε ότι η επαγόμενη από τον TNF-α ενεργοποίηση των JNKs ενεργοποιεί τη λιγάση της ουβικιτίνης ITCH, η οποία προκαλεί την ουβικιτινίωση της πρωτεΐνης c-FLIP και την επακόλουθη αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα. Έτσι, η παρατεταμένη ενεργοποίηση των JNKs, μειώνει τα επίπεδα της c-FLIP και επιτρέπει το σχηματισμό του συμπλόκου II και την επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF-α (Chang et al. 2006) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Η επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF-α εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της ITCH από την JNK και την επακόλουθη αποικοδόμηση του c-FLIP (Chang et al. 2006).

Επομένως, είναι φανερό ότι ο NF-KB με κάποιο μηχανισμό επιδρά στο χρονική διάρκεια ενεργοποίησης των JNKs και η ενεργοποίηση των NF-KB και JNKs ελέγχει την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο (De Smaele et al. 2001). Η προ-αποπτωτική δράση των JNKs αναστέλλεται προσωρινά από την εξαρτώμενη από τον NF-KB επαγωγή μορίων που αναστέλλουν τις JNKs, όπως οι XIAP, GADD45β και A20 (Wertz et al. 2004; Lee et al. 2000; Tang et al. 2001). Εξάλλου έχει προταθεί ότι ο NF-KB ρυθμίζει τη διάρκεια ενεργοποίησης των JNKs εν μέρει μέσω της επαγωγής γονιδίων με αντι-οξειδωτική δράση όπως δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγνησίου (Manganese Superoxide Dismutase, *MNSOD*), βαριά αλυσίδα της φερριτίνης (Ferritin Heavy Chain, *FHC*), τρανσφεράση της γλουταθειόνης-S (*GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE*) και μεταλλοθειονίνη (*METALLOTHIONEIN*). Τα μόρια αυτά εμποδίζουν την προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες αναστολή των

φωσφατάσεων που είναι υπεύθυνες για την απενεργοποίηση των JNKs (Kamata and Hirata 1999).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η αντι-αποπτωτική δράση του NF-KB ρυθμίζεται από τις κασπάσες, οι οποίες πρωτεολύουν την υπομονάδα p65 (Levkau et al. 1999), όπως επίσης τις RIP1 και IKKβ και τον IKBα (Reuther and Baldwin 1999). Εξάλλου, σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές ο NF-KB επάγει τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών μορίων όπως DR4, DR5, DR6 και FAS, FASL (Kasof et al. 2001).

1.3.1.4 Ανοσολογία του οστού

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, η ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών στα κύτταρα του οστού, σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τη δράση συστηματικών και τοπικών παραγόντων του μικροπεριβάλλοντός του, όπως ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες (Raisz 1999). Η τελική επίδραση στη λειτουργία του κυττάρου είναι η συνισταμένη της δράσης των παραπάνω παραγόντων εξαιτίας της αμφι-επικοινωνίας μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από κάθε παράγοντα.

Ένας σημαντικός αυξητικός παράγοντας που ρυθμίζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες είναι ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β), ο οποίος ανήκει στην υπερικογενεία των TGF παραγόντων, όπου ανήκουν ακόμη οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs). Η κυτταρική σηματοδότηση από τον TGF-β ενεργοποιείται μετά από δέσμευση στον υποδοχέα του και μεσολαβείται μέσω των πρωτεϊνών SMAD ή εναλλακτικά μέσω των MAPKs και της AP-1 (Mulder 2000; Engel et al. 1999).

Γενικότερα, ο TGF-β απαντάται σε τρεις ισομορφές, TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3 από τις οποίες η πρώτη είναι η κύρια ισομορφή που εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στο οστό (200 μg/kg). Ο TGF-β παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του οστού, καθώς προσελκύει τους οστεοβλάστες και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Παράλληλα, ρυθμίζει το μεταγραφικό παράγοντα OSF2 ο οποίος επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών-δεικτών του σχηματισμού του οστού όπως το κολλαγόνο, την αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase, ALP), τον προσδέτη του υποδοχέα ενεργοποιητή του NF-KB (Receptor Activator of NF-κB Ligand, RANKL), την οστεοκαλσίνη και την οστεοποντίνη (Stein et al. 2004). Συγκεκριμένα, στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης, ο TGF-β επάγει την έκφραση του OSF2, ενώ

στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης την αναστέλλει (Spinella-Jaegle et al. 2001). Σχετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα αποτελέσματα ερευνητικών μελετών δείχνουν ότι η δράση του TGF- β εξαρτάται από τις συνθήκες, ενώ δηλαδή προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προκαλεί την επαγωγή του σε υψηλές (Centrella et al. 1987). Επομένως, αν και θεωρείται ότι ο TGF- β επάγει την οστεογένεση, η δράση του καθορίζεται τις πειραματικές συνθήκες και το περιβάλλον. Τέλος, ο TGF- β αναστέλλει την απόπτωση των οστεοβλαστών και τους μετατρέπει σε αδρανή οστεοκύτταρα (Karsdal et al. 2002).

Επιπλέον ο TGF- β ρυθμίζει την οστεοκλαστογένεση και η δράση του εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη χρονική διάρκεια της επεξεργασίας των κυττάρων με τον παράγοντα. Έτσι, είναι γνωστό ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-100 pg/ml) επάγει το σχηματισμό των πολυπύρηνων κυττάρων, ενώ, σε υψηλές συγκεντρώσεις (0.1-10 ng/ml) τον αναστέλλει. Η πρώτη ερμηνεία του φαινομένου αυτού προκύπτει από το γεγονός ότι ο TGF- β ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, δηλαδή στις χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλεί την ενεργοποίηση των ERKs, ενώ στις μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί την ενεργοποίηση της p38 (Kale and Vaidya 2004). Η δεύτερη ερμηνεία του φαινομένου προκύπτει από το γεγονός ότι ο TGF- β σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνει το λόγο RANKL/οστεοπροτεγερίνη (OsteoProtegerin, OPG), ενώ, σε υψηλές συγκεντρώσεις τον μειώνει (Karst et al. 2004). Σχετικά με τη χρονική διάρκεια επεξεργασίας με TGF- β , έχει προταθεί ότι προκαλεί αναστολή της οστεοκλαστογένεσης στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας και επαγωγή στη συνέχεια (Dieudonne et al. 1991).

Εξάλλου, έχει αναφερθεί ότι η δράση του TGF- β στο οστό ρυθμίζεται από τον TNF- α , αν και ο μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Πιθανόν η παρουσία του TNF- α προκαλεί τη χαλαρή δέσμευση των SMAD στο DNA μέσω της AP-1 ή επάγει την έκφραση της ανασταλτικής SMAD-7 μέσω του NF-KB (Bitzer et al. 2000; Verrecchia et al. 2000).

Εκτός από τον TNF- α και άλλες κυτταροκίνες επιδρούν στη λειτουργία του οστού και οι σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του σκελετικού και του ανοσοποιητικού συστήματος η οποία περιγράφεται με τον όρο «ανοσολογία του οστού» (Arron and Choi 2000). Η αλληλεπίδραση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του σκελετικού και του ανοσοποιητικού

συστήματος έχουν κοινή προέλευση από το μυελό των οστών και επίσης στο γεγονός ότι οι κυτταροκίνες που ρυθμίζουν τους μοριακούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος συμμετέχουν στη ρύθμιση της δραστηριότητας των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών και επομένως εμπλέκονται στη διαδικασία ανακατασκευής του οστού. Ανάμεσα στους παράγοντες που εκκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του οστού και συμμετέχουν στη διαδικασία ανακατασκευής του είναι μέλη της υπεροικογένειας του TNF-α.

Ο RANKL ανήκει στην υπεροικογένεια του TNF-α και έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε σχέση με τη ρύθμιση της ανακατασκευής του οστού. Ο RANKL όπως και ο υποδοχέας του, υποδοχέας ενεργοποιητής του NF-κB (Receptor Activator of NF-κB, RANK) παράγονται από τους οστεοβλάστες και τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Η πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα RANK ενισχύει τη διαφοροποίηση και ταυτόχρονα αναστέλλει την απόπτωση των οστεοκλαστών (Schoppet et al. 2002). Συγκεκριμένα, η δημιουργία του συμπλόκου RANKL/RANK επιτρέπει τη στρατολόγηση του παράγοντα TRAF6 και την ενεργοποίηση των JNKs, του NF-κB και του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων T κυττάρων c1 (Nuclear Factor of Activated T cells c1, NFATc1). Η οστεοπροτεγερίνη δρα ανασταλτικά στο παραπάνω σύστημα (Lacey et al. 1998), όπως, επίσης οι ιντερφερόνες (InterFeroNs, IFNs). Ειδικότερα, η IFN-γ δεσμεύεται στον υποδοχέα της και μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τις κινάσες JANUS (JAnus Kinases1/2, JAK1/2) και τον παράγοντα μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής 1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1, STAT1) επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που οδηγούν στην ουβικιτινίωση και την αποικοδόμηση του παράγοντα TRAF6 και στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος (Takayanagi et al. 2000). Συγχρόνως έχει προταθεί η αλληλεπίδραση του STAT1 με τον παράγοντα OSF2 στο κυτταρόπλασμα, οπότε αναστέλλει τη μετακίνησή του OSF2 προς τον πυρήνα και τη μεταγραφή. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και το σχηματισμό του οστού. Ο παραπάνω τρόπος δράσης του STAT1 είναι μοναδικός, με την έννοια ότι αλληλεπιδρά με έναν άλλο μεταγραφικό παράγοντα εκτός του πυρήνα στην ανενεργή του μορφή (Ito and Miyazono 2003). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, πρόσφατη αναφορά υποστηρίζει ότι η IFN-γ επιταχύνει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες με ταυτόχρονη επαγωγή του OSF2 (Duque et al. 2009).

Επίσης, ο TNF-α που είναι μία κυτταροκίνη της φλεγμονής ρυθμίζει τη φυσιολογία του οστού, μέσω της δέσμευσης στους υποδοχείς του TNF-R1 και TNF-R2 και της στρατολόγησης των πρωτεϊνών TRADD και TRAF που καταλήγει στην ενεργοποίηση κομβικών κινασών όπως JNKs, p38 και πρωτεϊνική κινάση C (Protein Kinase C, PKC). Ο TNF-α μειώνει τη συνολική οστική μάζα με δύο τρόπους: επάγει την οστεοκλαστογένεση και αναστέλλει τις διαδικασίες διαφοροποίησης, λειτουργίας και επιβίωσης των οστεοβλαστών (Nanes 2003). Συγκεκριμένα ο TNF-α αναστέλλει τη σύνθεση των μεταγραφικών παραγόντων OSF2 και OSTERIX (OSX) οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Gilbert et al. 2000; Gilbert et al. 2002). Επίσης, επάγει την απόπτωση σε πρωτογενείς καλλιέργειες οστεοβλαστών και στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1 (Chua et al. 2002; Hill et al. 1997), ενώ, δεν επάγει την απόπτωση στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63. Τα κύτταρα MG63 ευαισθητοποιούνται στην απόπτωση που προκαλείται από το αντίσωμα έναντι του FAS η οποία ενισχύεται παρουσία TNF-α ή IL-1β (Tsuboi et al. 1999). Ταυτόχρονα, ο TNF-α αναστέλλει το σχηματισμό του οστού και μέσω επαγωγής της οστεοκλαστογένεσης, εν μέρει με την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-KB και AP-1, οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση, τη λειτουργία και την επιβίωση των οστεοκλαστών (Jimi and Ghosh 2005; Kudo et al. 2002). Επίσης, ο TNF-α ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι των RANKL/OPG, όπου επάγει την έκφραση του RANK και του προσδέτη του RANKL, με αποτέλεσμα να ευνοεί την αποικοδόμηση του οστού (Hofbauer et al. 1999). Εξάλλου πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα δύο σηματοδοτικά μονοπατία των TNF-α και RANK-RANKL/OPG συνεργάζονται και απαιτούνται ταυτόχρονα για την πλήρη οστεοκλαστογένεση, που υποδεικνύει ένα είδος ελέγχου της διαδικασίας (Kobayashi et al. 2000).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η δράση του TNF-α εντοπίζεται όχι μόνο στη ρύθμιση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, αλλά ακόμη στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ο TNF-α αναστέλλει την παραγωγή πρωτεϊνών του οστού όπως το κολλαγόνο τύπου I, η οστεοκαλσίνη, η αλκαλική φωσφατάση, οι πρωτεογλυκάνες και οι υποδοχείς της βιταμίνης D και της παραθυρεοειδούς ορμόνης και επάγει την έκφραση οστεολυτικών ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεάσες και οι αντίστοιχοι ιστικοί αναστολείς τους (Mayur et al. 1993; Panagakos and Kumar 1994; Nakase et al. 1997).

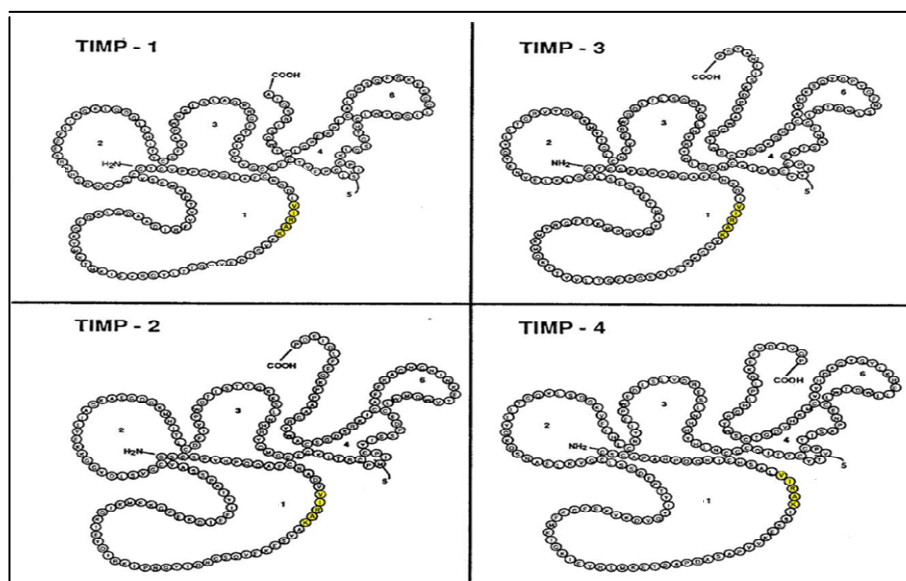
1.4 Ιστικοί Αναστολείς των Μεταλλοπρωτεασών

1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας (Matrix Metalloproteinases, MMPs) ή ματριξίνες, αποτελούν μία συνεχώς αναπτυσσόμενη οικογένεια μεταλλοενδοπεπτιδασών, των οποίων το καταλυτικό τμήμα περιέχει χαρακτηριστική αλληλουχία πρόσδεσης ιόντων Zn^{2+} και Ca^{2+} τα οποία είναι απαραίτητα για την ενζυμική δράση. Η οικογένεια των MMPs αποτελείται από 24 μέλη, τα οποία ανάλογα με την εξειδίκευσή τους ως προς το υπόστρωμα, την πρωτοταγή δομή και την κυτταρική τους τοποθέτηση διακρίνονται σε κολλαγονάσες, ζελατινάσες, στρωμελυσίνες, ματριλυσίνες, διαμεμβρανικές MMPs και άλλες MMPs που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις προηγούμενες κατηγορίες (Nagase and Woessner 1999). Η ρύθμιση της ενεργοποίησης και η πρωτεολυτική δράση των MMPs γίνεται σε τρία τουλάχιστον επίπεδα: α) μεταγραφή (Westermarck and Kahari 1999), β) ενεργοποίηση των ζυμογόνων (ανενεργές pro-MMPs) (Nagase 1997) και γ) ενδογενώς από τους ειδικούς ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs) (Wang et al. 2000b).

Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί τέσσερις TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4. Πρόκειται για μόρια μικρού μοριακού βάρους 21-34 kDa τα οποία προσδένονται στις MMPs με στοιχειομετρική αναλογία 1:1 σχηματίζοντας σύμπλοκα ανθεκτικά τόσο σε θερμική αποδιάταξη όσο και σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση (Gomez et al. 1997). Αν και οι TIMPs προσδένονται στις περισσότερες MMPs, υπάρχουν διαφορές όσον αφορά τη συγγένειά τους. Οι TIMP-1 και -2 αναστέλλουν τις περισσότερες MMPs, αν και παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια για την MMP-9 και την MMP-2 αντίστοιχα. Ο TIMP-3 παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδίκευση για τις MMP-1, -3, -7 και -13, ενώ ο TIMP-4 για τις MMP-1, -2, -3, -7 και -19. Σχετικά με τη δομή τους, αποτελούνται από πέντε πτυχωτές επιφάνειες β-βαρελίου, μια αλληλουχία με δομή έλικας και μια δομή β πτυχωτής επιφάνειας στο C-τελικό άκρο (Williamson et al. 1997; Tuuttila et al. 1998). Φέρουν δύο χαρακτηριστικές περιοχές: την N-τελική περιοχή που αποτελείται από περίπου 125 αμινοξέα και έχει τη δράση αναστολέα της μεταλλοπρωτεάσης και μία μικρότερη αποτελούμενη από περίπου 65 αμινοξέα C-τελική περιοχή. Καθεμία από τις δύο περιοχές περιέχει έξι κατάλοιπα κυστεΐνης που

σχηματίζουν από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι επιτρέπουν στα μόρια να έχουν σταθερή διαμόρφωση στο χώρο. Οι TIMPs φέρουν τα χαρακτηριστικά αμινοξικά κατάλοιπα Cys1-Cys70, από τα οποία η Cys1 αλληλεπιδρά με τα ιόντα Zn^{2+} που είναι κρίσιμα για την ενζυμική δράση των MMPs. Επίσης, φέρουν τη χαρακτηριστική και συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία VIRAK (αα: 18-22) (Caterina et al. 1997) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής των TIMPs, όπου διακρίνονται οι βρόγχοι, η χαρακτηριστική αλληλουχία VIRAK και οι έξι δισουλφιδικοί δεσμοί (Lambert et al. 2004).

Τα σύμπλοκα μεταξύ ενζύμου και αναστολέα χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα εξαιτίας της εκτεταμένης αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση τους διαμεσολαβείται μέσω της καλά συντηρημένης N-τελικής περιοχής, η οποία εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα και μικρή δυνατότητα ευελιξίας εξαιτίας των δισουλφιδικών δεσμών. Η C-τελική περιοχή των TIMPs είναι εξίσου σημαντική καθώς συμμετέχει στην αλληλεπίδρασή τους με τις πρόδρομες μορφές των MMPs και ρυθμίζει τη διαδικασία ενεργοποίησής τους. Χαρακτηριστικά ο TIMP-1 αλληλεπιδρά με την pro-MMP-9 και ο TIMP-2 αλληλεπιδρά με την pro-MMP-2, ενώ ο TIMP-3 μέσω της C-τελικής περιοχής δεσμεύεται με πρωτεογλυκάνες θεϊκής ηπαρίνης στην εξωκυττάρια μήτρα (ExtraCellular Matrix, ECM) (Yu et al. 2000).

Σχετικά με το πρότυπο έκφρασής τους οι TIMPs εκφράζονται από ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων και απαντώνται στους περισσότερους ιστούς. Η έκφραση των TIMP-1, -3 και -4 είναι επαγόμενη και εμφανίζει ιστο-ειδικότητα: ο TIMP-1

εντοπίζεται κυρίως στο σύστημα αναπαραγωγής και τα οστά, ο TIMP-3 στην καρδιά, τους νεφρούς, τους πνεύμονες και το θύμο και ο TIMP-4 στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους νεφρούς και τους σκελετικούς μύες (Leco et al. 1997; Greene et al. 1996). Αντίθετα, η έκφραση του TIMP-2 είναι συνεχής και η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε όλο το σώμα. Η έκφραση των TIMPs ρυθμίζεται από μία σειρά μεταγραφικών παραγόντων όπως NF-KB, AP-1, CREB, πρωτεΐνη ειδικότητας-1 (Specificity Protein-1, SP-1), E26-1 (E-twenty six-1, ETS-1) και οι οποίοι ενεργοποιούνται από τον ορό, τους φορβολικούς εστέρες, τις κυτταροκίνες όπως TNF-α, IL-1β, IL-6, τους αυξητικούς παράγοντες όπως τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet-derived Growth Factor, PDGF) καθώς και τους FGF, EGF και TGF-β (Logan et al. 1996; Bachmeier et al. 2005).

1.4.2 Κυτταρικές λειτουργίες

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι TIMPs δε θεωρούνται αποκλειστικά αναστολείς των MMPs, αλλά πολυλειτουργικές πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες όπως η αγγειογένεση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική επιβίωση (Chirco et al. 2006). Ειδικά κατά τη διαδικασία ανακατασκευής του οστού οι TIMPs επάγουν την ικανότητα αποικοδόμησης των οστεοκλαστών μέσω ενεργοποίησης των MAPKs και κινασών τυροσίνης (Sobue et al. 2001). Η ικανότητα των TIMPs να ισορροπούν μεταξύ της «δράσης αναστολέα» και της «δράσης κυτταροκίνης» διασφαλίζει την επικοινωνία μεταξύ των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και της εξωκυττάριας μήτρας.

Η ρύθμιση των παραπάνω βασικών κυτταρικών λειτουργιών από τους TIMPs, σε ορισμένες περιπτώσεις εξαρτάται από τη δράση τους ως αναστολέων των MMPs. Για παράδειγμα η αναστολή των MMPs προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης, της μετάστασης και της διείσδυσης του καρκινικού όγκου, όπως στην περίπτωση της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων του μαστού στα οστά (Yoneda et al. 1997). Παράλληλα, οι TIMPs αναστέλλουν την αγγειογένεση που είναι απαραίτητη στη μετάσταση των καρκινικών όγκων, είτε μέσω αναστολής των MMPs, είτε με μηχανισμούς οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από τη δράση τους ως αναστολέων των MMPs. Ο μηχανισμός έχει διευκρινιστεί στην περίπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων όπου δείχτηκε ότι ο TIMP-2 αλληλεπιδρά με την ιντεγκρίνη α3β1 στην κυτταρική επιφάνεια και προκαλεί την αποδέσμευση της φωσφατάσης τυροσίνης που

περιέχει επικράτεια SH2-1 (SH2-containing Protein-Tyrosine Phosphatase-1, SHP-1) από την ιντεγκρίνη. Ακολούθως, η SHP-1 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor-Receptor, FGFR) και τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor, VEGF-R) και αναστέλλει την ικανότητα επαγωγής αγγειογένεσης από αυτούς (Seo et al. 2003). Εξάλλου, ο TIMP-3 αναστέλλει την κυτταρική σηματοδότηση και την αγγειογένεση που επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) είτε διότι ανταγωνίζεται τη δέσμευσή του στον υποδοχέα του VEGF-R, είτε διότι αλληλεπιδρά με τον τύπου 2 υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II (Angiotensin II Type 2 Receptor, AGTR2) (Qi et al. 2003; Kang et al. 2008). Η υπερέκφραση του TIMP-3 έχει συνδεθεί ακόμη με αναστολή της κυτταρικής διείσδυσης και μετάστασης. Οι πρώτες μελέτες σχετικά με τη δράση του TIMP-4 δείχνουν ότι αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση σε ενδοθηλιακά, γλοιωματικά και καρδιακά κύτταρα (Fernandez and Moses 2006; Groft et al. 2001; Tummalapalli et al. 2001). Η δράση των TIMPs σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξης του καρκινικού όγκου όπως στην αγγειογένεση και τη μετάσταση τους κατατάσσουν ως πιθανούς αντι-καρκινικούς παράγοντες, όμως η κλινική χρήση τους δεν είχε τα απαιτούμενα αποτελέσματα στην αντι-καρκινική θεραπεία. Πιθανόν αυτό να σχετίζεται με τη δράση των TIMPs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

Οι TIMPs ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων. Έχει βρεθεί ότι ο TIMP-1 και ο TIMP-2 ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό θετικά ή αρνητικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και ανεξάρτητα από τη δράση τους ως αναστολέων των MMPs (Hayakawa et al. 1992). Χαρακτηριστικά οι TIMP-1 και -2 αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές όπως κύτταρα μαστού ανθρώπου MCF10A και νευρικά κύτταρα PC12, με τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1 και την αντίστοιχη αύξηση των αναστολέων της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p27^{KIP1} και p21^{Cip}. Ειδικά στην κυτταρική σειρά PC12 η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TIMP-2 συνδέεται με επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης που διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση του μορίου με την ιντεγκρίνη α3β1 και την ενεργοποίηση των ERKs (Taube et al. 2006; Perez-Martinez and Jaworski 2005), ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο TIMP-2 αναστέλλει τον

επαγόμενο από τον FGF κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αλληλεπίδρασης με την ιντεγκρίνη $\alpha 3 \beta 1$ καθώς επάγει την $p27^{KIP1}$ και αναστέλλει την ενεργοποίηση των κινασών ERKs (Seo et al. 2008). Αντίθετα οι TIMP-1 και TIMP-2 επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε άλλες κυτταρικές σειρές μεταξύ των οποίων την κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63, όπου η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεσολαβείται από τις κινάσες τυροσίνης και την ενεργοποίηση των ERKs και αυξάνεται με τη συγκέντρωση των TIMPs (Yamashita et al. 1996). Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TIMP-2 έχει δειχτεί και σε επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα όπου μεσολαβείται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB και αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 όπως επίσης σε καρκινικά κύτταρα μαστού μέσω ενεργοποίησης των MAPKs (Lizarraga et al. 2004; D'Alessio et al. 2008). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο TIMP-3 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρδιομυοκυττάρων με ταυτόχρονη αύξηση του αναστολέα $p27^{KIP1}$ λόγω μειωμένης ενεργοποίησης των JNK και SP-1 και αναστολής της έκφρασης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor-Receptor, EGF-R) (Hammoud et al. 2009), ενώ ο TIMP-4 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων G401 (Celiker et al. 2001).

Τέλος οι TIMPs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Επειδή η δράση των MMPs στο περιβάλλον του κυττάρου ρυθμίζει την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των αυξητικών παραγόντων, πρωτεόλυσης των υποδοχέων τους ή αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας θεωρήθηκε ότι η δράση των TIMPs στην απόπτωση οφείλεται στην ανασταλτική δράση έναντι των MMPs. Συγκεκριμένα, οι TIMPs διατηρούν την ακεραιότητα της εξωκυττάριας μήτρας και τη διασύνδεση των κυττάρων με αυτήν, με αποτέλεσμα να διαβιβάζονται σήματα κυτταρικής επιβίωσης. Παράλληλα, σύγχρονα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι TIMPs ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι ανεξάρτητα από τη δράση τους ως αναστολέων των MMPs (Chirco et al. 2006). Οι δύο παραπάνω παράλληλοι τρόποι δράσης των TIMPs δεν αποκλείουν ο ένας τον άλλο, αλλά είναι αλληλοεξαρτώμενοι και η επικράτηση του ενός έναντι του άλλου καθορίζεται από τον κυτταρικό τύπο, τα αποπτωτικά ερεθίσματα, το μικροπεριβάλλον του κυττάρου και τη διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών με τις οποίες οι TIMPs δεσμεύονται στην κυτταρική επιφάνεια.

Οι πρώτες μελέτες σχετικά με το ρόλο των TIMPs στην απόπτωση αφορούσαν τον TIMP-3 για τον οποίο βρέθηκε ότι οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση είτε ως

αναστολέας των MMPs είτε ανεξάρτητα από τη δράση του ως αναστολέα. Είναι γνωστό ότι ο TIMP-3 δρα ανασταλτικά όχι μόνο έναντι της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών, αλλά και έναντι της οικογένειας των αδαμαλυσινών (A Disintegrin And Metalloproteinase, ADAMs). Επομένως, η ικανότητα επαγωγής της απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη οφείλεται στη σταθεροποίηση των υποδοχέων του TNF-α καθώς τους προστατεύει από πρωτεόλυση από το πρωτεολυτικό ένζυμο ADAM-17 ή TACE (Smith et al. 1997). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ευαισθητοποίηση των κυττάρων μελανώματος A2058 στην απόπτωση έναντι των παραγόντων TNF-α, TRAIL και anti-FAS αντίσωμα ως αποτέλεσμα της σταθεροποίησης των αντίστοιχων υποδοχέων θανάτου από τον TIMP-3. Ακόμη έχει βρεθεί ότι ο TIMP-3 προκαλεί μείωση στην ανάπτυξη των κυττάρων A2058 και αναστολή της αγγειογένεσης, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να αποτελέσει έναν εκκρινόμενο παράγοντα αναστολής του καρκινικού όγκου (Ahonen et al. 2002; Ahonen et al. 2003). Επίσης, ο TIMP-3 επάγει την απόπτωση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές PC-3, DU-145, HeLa, HT1080 και σε νευρικά και λεία μυϊκά κύτταρα λόγω απώλειας σύνδεσης με την εξωκυττάρια μήτρα, ανεξάρτητα από τη δράση του ως αναστολέα των MMPs (Baker et al. 1998; Deng et al. 2006). Ένας ακόμη μηχανισμός προ-αποπτωτικής δράσης του TIMP-3 έχει περιγραφεί σε ανθρώπινους ινοβλάστες και κύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης, οπότε η υπερέκφραση του TIMP-3 συνδέεται με την ενεργοποίηση του NF-KB και την αυξημένη έκφραση των p53, FAS/FASL και των υποδοχέων του TNF-α (Drynda et al. 2005; Finan et al. 2006). Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι ο TIMP-3 αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και επάγει την απόπτωση στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών MC3T3-E1 λόγω απώλειας ορού. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κινασών p38 και ERKs και ακόμη αυξημένα επίπεδα έκφρασης του συστήματος FAS/FASL και των ενεργών μορφών των κασπασών-8 και -3 (Yuan et al. 2008). Όσον αφορά στον TIMP-4, έχει αποδοθεί προ-αποπτωτική δράση και αναστολή της ικανότητας μετανάστευσης των αγγειακών κυττάρων (Guo et al. 2004). Η δράση του TIMP-2 σχετικά με το φαινόμενο της απόπτωσης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αφού έχει αποδοθεί προ-αποπτωτική αλλά και αντι-αποπτωτική δράση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Έτσι, ο TIMP-2 προκαλεί αναστολή της απόπτωσης στα μακροφάγα, αλλά επαγωγή της απόπτωσης

στα T-λεμφοκύτταρα (Lim et al. 1999; Johnson et al. 2006). Εξάλλου, κατά την υπερέκφραση του TIMP-2 σε καρκινικά κύτταρα μελανώματος παρατηρήθηκε μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και την κυτταρική διείσδυση, αλλά αύξηση στην ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης (Valente et al. 1998). Τέλος, στον TIMP-1 έχει αποδοθεί αντι-αποπτωτική δράση που, είτε εξαρτάται από την αναστολή των MMPs, είτε από την ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών. Η ανασταλτική δράση του TIMP-1 έναντι των MMPs, όπως, επίσης, οι άλλες γνωστές βιολογικές λειτουργίες του TIMP-1 αναλύονται παρακάτω.

1.4.3 Ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεασών -1

1.4.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το γονίδιο *TIMP-1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα Xp11.23-11.4 και κωδικοποιεί μία γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 28.5 kDa που αποτελείται από 184 αμινοξέα, μεταξύ των οποίων δώδεκα κυστεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό των έξι χαρακτηριστικών δισουλφιδικών δεσμών (Spurr et al. 1987). Το μέγεθος της πρωτεΐνης εξαρτάται από το βαθμό γλυκοζυλίωσής της και τα σάκχαρα που συνδέονται σε αυτή είναι μανόζη, γαλακτόζη, N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη και σιαλικό οξύ. Η γλυκοζυλίωση του TIMP-1 παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, όπως και τη μετατόπισή της στην κυτταρική επιφάνεια (Caterina et al. 1998).

Η πρωτεΐνη παράγεται με την πρόδρομη μορφή της και περιέχει ένα πεπτίδιο-σήμα που επιτρέπει την έκκριση της στον εξωκυττάριο χώρο. Η ρύθμιση του TIMP-1 γίνεται σε πολλά επίπεδα μεταξύ των οποίων η μεταγραφή, η σταθερότητα του mRNA, η αποικοδόμηση και η ενδοκυττάρωση. Ο TIMP-1 εκφράζεται από μία πληθώρα κυτταρικών τύπων όπως οι ινοβλάστες, οι οστεοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ εντοπίζεται στο οστό, στο χόνδρο, στον τένοντα, το αμνιακό υγρό και τον ορό και ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής και αναδόμησης των ιστών (Cawston et al. 1986; Bord et al. 1999; Welgus et al. 1985). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ποντίκια που δεν εκφράζουν τον TIMP-1 επιβιώνουν, αν και τα θηλυκά παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα και διάρκεια ικανότητας αναπαραγωγής. Ο έλεγχος της έκφρασης του TIMP-1 σε συγκεκριμένους ιστούς πιστεύεται ότι

οφείλεται σε ιστο-ειδικούς καταστολείς που υπάρχουν στο γονίδιο, όπως στο ιντρόνιο 1 (Dean et al. 2000). Ο υποκινητής του TIMP-1 δεν περιέχει την αλληλουχία TATA και έχει προταθεί ότι για την ενεργοποίηση της μεταγραφής απαιτείται η δέσμευση μιας πρωτεΐνης 30 kDa σε μία περιοχή ανοδικά του TIMP-1 (Upstream TIMP-1 Element, UTE-1). Η έκφραση του TIMP-1 ρυθμίζεται από μία σειρά μεταγραφικών παραγόντων όπως NF-KB, AP-1, ETS-1, SP-1 και το σχετιζόμενο με runt μεταγραφικό παράγοντα (Runt-related transcription factor, RUNX) (Bertrand-Philippe et al. 2004; Wilczynska et al. 2006). Ειδικά για τις AP-1 έχει δειχτεί ένα είδος ρύθμισης της μεταγραφικής ικανότητας τους, καθώς διαφορετικά μέλη της οικογένειας των AP-1 μεταγραφικών παραγόντων προσδένονται με διαφορετική συγγένεια σε διαφορετικές θέσεις του υποκινητή του TIMP-1 και ελέγχουν την έκφραση του. Επιπλέον η αλληλεπίδραση της AP-1 με τον μεταγραφικό παράγοντα ETS-1 ενισχύει περαιτέρω τη μεταγραφική ικανότητα του πρώτου, ιδιαίτερα αν η ποσότητα της AP-1 είναι ιδιαίτερα χαμηλή, ενώ ακόμη έχει δειχτεί η συνέργεια της AP-1 με τον SP-1 (Logan et al. 1996; Botelho et al. 1998). Η ενεργοποίηση της μεταγραφής συμβαίνει κυρίως από μόρια της εξωκυττάριας μήτρας όπως ο ορός, οι φορβολικοί εστέρες, οι αυξητικοί παράγοντες FGF, PDGF, EGF, TGF- β , οι κυτταροκίνες IL-1, IL-6, IL-1 β , ογκοστατίνη M και τα ρετινοειδή (Wilczynska et al. 2006; Kwak et al. 2006). Επειδή οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται από πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, θεωρήθηκε ότι στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων η επαγωγή της έκφρασης του TIMP-1 συμβαίνει ως αντιστάθμισμα στην αυξημένη έκφραση των MMPs. Εντούτοις τα σύγχρονα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αυξημένη έκφραση του TIMP-1 οφείλεται στην ενεργοποίηση ξεχωριστών σηματοδοτικών μονοπατιών ανεξάρτητα από την έκφραση των MMPs. Σημαντικό παράγοντα ρύθμισης του TIMP-1 αποτελεί και η μειωμένη σταθερότητα του mRNA του TIMP-1 (Gardner et al. 2006). Σε επίπεδο πρωτεΐνης υφίσταται «πακετάρισμα» το οποίο προστατεύει το μόριο από πρωτεόλυση, αν και έχει αναφερθεί ότι αποικοδομείται από την καθεψίνη B και την ελαστάση των λευκοκυττάρων (Kostoulas et al. 1999). Επίσης οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί προσδίδουν σταθερή διαμόρφωση στο χώρο, ενώ, ακόμη έχει αναφερθεί ο σχηματισμός διμερών, με απώλεια της ανασταλτικής δράσης έναντι των MMPs (De Lorenzo et al. 2000). Τέλος, η δράση του TIMP-1 ελέγχεται από την εσωτερικοποίηση του συμπλόκου TIMP-1/proMMP-9 από τη σχετιζόμενη πρωτεΐνη

με τον υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Low Density Lipoprotein-Related Protein Receptor, LRP) (Hahn-Dantona et al. 2001).

1.4.3.2 Η αναστολή των MMPs από τον TIMP-1

Ο TIMP-1 - όπως οι άλλοι TIMPs - σχηματίζει σύμπλοκα με τις MMPs με στοιχειομετρία 1:1. Ο TIMP-1 δεν αναστέλλει τις μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεάσες (Membrane-Type MMPs, MT-MMPs), όμως αναστέλλει τις περισσότερες μεταλλοπρωτεάσες μέσω αλληλεπίδρασης με τη C-τελική περιοχή τους. Ο μηχανισμός αναστολής των MMPs από τον TIMP-1 διευκρινίστηκε το 1997 οπότε δημοσιεύτηκε η δομή του συμπλόκου του TIMP-1 με την μεταλλοπρωτεάση MMP-3 και διαπιστώθηκε ότι τα αμινοξέα των περιοχών Cys1-Val4 και Met66-Val69 αποτελούν τις πιο σημαντικές περιοχές μέσω των οποίων αλληλεπιδρά ο TIMP-1 με το ένζυμο (Nagase et al. 1997). Κατά τη δημιουργία του συμπλόκου ο TIMP-1 αποκτά δομή σφηνοειδή και καταλαμβάνει πλήρως τη σχισμή του ενεργού κέντρου του ενζύμου όπου εντοπίζονται τα ιόντα Zn^{2+} (Gomis-Ruth et al. 1997). Για την αναστολή της MMP-3 σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η Cys1 στο N-τελικό άκρο του αναστολέα που δεσμεύει τα ιόντα Zn^{2+} που είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση, όπως επίσης η Thr2 που εγκλωβίζει την περιοχή S1 (S1 pocket) της MMP-3 και αλληλεπιδρά μέσω της πλευρικής της υδροξυλομάδας με το Glu202. Έτσι απομακρύνεται το μόριο νερού από το καταλυτικό κέντρο. Άλλες περιοχές του μορίου του TIMP-1 που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τη μεταλλοπρωτεάση περιλαμβάνουν τα κατάλοιπα Thr98-Cys99 και Leu133-Ser134. Η διευκρίνιση του παραπάνω μηχανισμού αναστολής ερμηνεύει τη μειωμένη ανασταλτική δράση του TIMP-1 κατά την πρωτεόλυση του δεσμού Val69-Cys70 ή την αντικατάσταση καταλοίπων της περιοχής Cys1-Cys70 και τη μεταβολή της συγγένειάς του για τις διάφορες MMPs με την αντικατάσταση της Thr2. Ο TIMP-1 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την MMP-9, καθώς σχηματίζει σύμπλοκο με την πρόδρομη μορφή της (proMMP-9) μέσω της C-τελικής περιοχής του και αναστέλλει τη διαδικασία αυτό-ενεργοποίησής της.

1.4.3.3 TIMP-1 και κυτταρικές λειτουργίες

1.4.3.3.1 TIMP-1 και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Οι πρώτες ενδείξεις για τη συμμετοχή του TIMP-1 στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού προήλθαν από την ανακάλυψη ότι ενισχύει τη δράση της ερυθροποιητίνης στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων (Murata et al. 1993; Hayakawa et al. 1992). Αργότερα δείχθηκε ότι ο TIMP-1 δεσμεύεται στην κυτταρική επιφάνεια και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου συγκεντρώνεται κυρίως στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου (Zhao et al. 1998). Η μετακίνηση του TIMP-1 στον πυρήνα συνδέεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής. Ο TIMP-1 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικά κύτταρα όπως ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, χονδροκύτταρα, αστροκύτταρα, παγκρεατικά κύτταρα, λεμφοειδή και μυελοειδή κύτταρα, αλλά και σε κύτταρα από παθολογικές καταστάσεις όπως σκληρόδερμα, ηπάτωμα και οστεοσάρκωμα (Yamashita et al. 1996; Hayakawa et al. 1992; Kikuchi et al. 1997; Fata et al. 1999). Σύμφωνα με μία πρόσφατη εργασία βρέθηκε ότι ο ρυθμός αύξησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε δύο καρκινικές σειρές μαστού εξαρτάται από την επιθετικότητά τους. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TIMP-1 στις καρκινικές σειρές BC-3A και BC-61, από τις οποίες η δεύτερη είναι πιο επιθετική από την πρώτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση TIMP-1 προκάλεσε αύξηση στον πολλαπλασιασμό μόνο των κυττάρων BC-61 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτό πιθανώς οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του TIMP-1 στις δύο κυτταρικές σειρές, δηλαδή ο υποδοχέας εκφράζεται περισσότερο στα πιο επιθετικά κύτταρα BC-61 (Luparello et al. 1999).

Η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TIMP-1 είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ανεξάρτητη της δράσης του ως αναστολέα των MMPs. Ο μηχανισμός επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έχει διευκρινιστεί ειδικά στην περίπτωση των κυττάρων οστεοσαρκώματος MG63, όπου ο TIMP-1 ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι όπου συμμετέχουν κινάσες τυροσίνης και οι ERKs (Yamashita et al. 1996). Εξάλλου ο μηχανισμός επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TIMP-1 στα ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα αορτής βασίζεται στην ενεργοποίηση των κομβικών

κινασών ERKs και PI-3K και καταλήγει στην αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1, ενώ στα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 καταλήγει στην αυξημένη έκφραση του VEGF (Akahane et al. 2004b; Yoshiji et al. 1998). Οι παραπάνω παρατηρήσεις προτείνουν έναν επιπλέον ρόλο για τον TIMP-1 ως αυξητικό παράγοντα πέρα από το ρόλο του ως ενζυμικό αναστολέα, αν και δεν έχει διευκρινιστεί αν αυτό συμβαίνει με την είσοδό του στον πυρήνα ή με τη δέσμευσή του σε υποδοχέα/είς της κυτταρικής επιφάνειας. Εναλλακτικά, η ικανότητα αύξησης του πολλαπλασιασμού από τον TIMP-1 οφείλεται στη δράση του ως αναστολέα των MMPs, όπως στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού MDA-MB-435 όπου ο TIMP-1 και συνθετικός αναστολέας των MMPs επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Είναι αξιοσημείωτο ότι πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο TIMP-1 προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά μαστού MCF10A με τη μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1 και αντίστοιχη αύξηση του αναστολέα της p27^{KIP1} και ακόμη προκαλεί μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης σε ηπατοκύτταρα, καθώς αναστέλλει την επαγόμενη από τις MMPs αποικοδόμηση του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor, HGF) και της πρωτεΐνης δέσμευσης στον αυξητικό παράγοντα τύπου ινσουλίνης-3 (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-3, IGFBP-3) (Mohammed et al. 2005; Taube et al. 2006). Κατά συνέπεια, η δημιουργία ποντικών με μη λειτουργικό TIMP-1 συνδέεται με επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 και του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζομένων κυττάρων (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA).

1.4.3.3.2 TIMP-1 και αγγειογένεση

Οι TIMPs αναστέλλουν την αγγειογένεση δηλαδή τη δημιουργία νέων αγγείων σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις σε διάφορα στάδια. Η αναστολή της αγγειογένεσης βασίζεται στην επαγωγή κατάλληλων σηματοδοτικών μονοπατιών από τους TIMPs ή στη δράση τους ως αναστολέων των MMPs, καθώς έχει δειχτεί ότι ο συνθετικός αναστολέας των MMPs, BB-94 δρα ανασταλτικά στην αγγειογένεση και στην ανάπτυξη αιμαγγειώματος (Taraboletti et al. 1995). Ειδικά ο TIMP-1 αναστέλλει την αγγειογένεση και την κυτταρική μετανάστευση με τη δράση αναστολέα των MMPs. Συγκεκριμένα, ο TIMP-1 και οι συνθετικοί αναστολείς των MMPs καταστέλλουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς επάγουν

την έκφραση των μορίων προσκόλλησης αιμοπεταλίων/ενδοθηλιακών κυττάρων (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM) και της καδερίνης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Vascular Endothelial Cadherin, VE-cadherin). Η ανασταλτική δράση του TIMP-1 κατά την αγγειογένεση έχει αποδειχτεί ακόμη σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος (Takigawa et al. 1990; Bloomston et al. 2002). Ακόμη ο TIMP-1 αναστέλλει την αγγειογένεση ανεξάρτητα από την αναστολή των MMPs, όπως διαπιστώθηκε σε ενδοθηλιακά κύτταρα όπου ο TIMP-1 επάγει την έκφραση του διαλυτού υποδοχέα του VEGF, sVEGFR-1 (Bruegmann et al. 2009).

Τέλος, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι ο TIMP-1 συμβάλλει στην επαγωγή της αγγειογένεσης με τρόπο που εξαρτάται από την αναστολή των MMPs. Είναι γνωστό ότι η πρωτεολυτική δράση των MMPs οδηγεί στο σχηματισμό της αγγειοστατίνης και της ενδοστατίνης που δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης. Επομένως, σε αυτήν την περίπτωση ο TIMP-1 επάγει την αγγειογένεση με την αναστολή του σχηματισμού της αγγειοστατίνης και της ενδοστατίνης. Η επαγωγή της αγγειογένεσης από τον TIMP-1 εξαρτάται κυρίως από την αναστολή της MMP-9 και αντίστοιχη δράση έχει και ο συνθετικός χημικός αναστολέας των MMP-2/-9 (Liu et al. 2008). Ακόμη η διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού MCF-7 με TIMP-1 δρα ενισχυτικά στην αγγειογένεση με αύξηση στην έκφραση του αυξητικού παράγοντα VEGF.

1.4.3.3.3 TIMP-1 και μετανάστευση

Ο TIMP-1 αναστέλλει τη μετανάστευση και τη διείσδυση μέσω αναστολής των MMPs ή ανεξάρτητα από την αναστολή των MMPs μέσω της ενεργοποίησης κομβικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Reed et al. 2003). Η ανασταλτική δράση του TIMP-1 στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων βασίζεται εν μέρει στην αναστολή των MMPs μέσω της αυξημένης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών VE-καδερίνης και PECAM στις διασυνδέσεις κυττάρου-κυττάρου, αλλά και στην ανεξάρτητη των MMPs ικανότητα του TIMP-1 να προκαλεί αποφωσφορλίωση της FAK και μείωση του σχηματισμού εστιακών επαφών (Akahane et al. 2004a).

1.4.3.3.4 TIMP-1 και καρκίνος

Οι μελέτες σχετικά με τον TIMP-1 σε περιπτώσεις καρκίνου έχουν δείξει ότι εκφράζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα. Όμως η

έκφραση του TIMP-1 είναι μεγαλύτερη στα στρωματικά κύτταρα που πλαισιώνουν τα καρκινικά κύτταρα και στα καρκινικά κύτταρα που συμμετέχουν στη διείσδυση του όγκου. Υψηλά επίπεδα TIMP-1 εντοπίζονται σε διάφορες μορφές καρκίνου όπως καρκίνος του ενδομητρίου, του μαστού, του στομάχου, του παχέως εντέρου αλλά και στο οστεοσάρκωμα και σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, αδеноκαρκίνωμα ή γλοιοβλάστωμα και σχετίζονται με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης και κακή πρόγνωση (Aaberg-Jessen et al. 2009; Honkavuori et al. 2008; Yoshikawa et al. 2009; Ferrari et al. 2004). Τα επίπεδα του TIMP-1 με τη μορφή πρωτεΐνης ή mRNA αυξάνονται στα μεγαλύτερα στάδια του καρκίνου και αποτελούν δυσμενή διαγνωστικό παράγοντα, διότι συνδέονται με ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων έναντι της χημειοθεραπείας (Aaberg-Jessen et al. 2009; Yoshikawa et al. 2009; Davidsen et al. 2006; Honkavuori et al. 2008). Χαρακτηριστικά, έχει μελετηθεί η ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7 έναντι του αντικαρκινικού παράγοντα πακλιταξέλη που διαπιστώθηκε ότι οφείλεται στην επαγόμενη από τον TIMP-1 αποικοδόμηση της κυκλίνης B1 (Wang et al. 2009b). Τέλος, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα κρίσιμο ρόλο διαδραματίζει και ο βαθμός της γλυκοζυλίωσης του TIMP-1, αφού αυξημένη γλυκοζυλίωση του TIMP-1 συνδέεται με μειωμένη ικανότητα αναστολής των MMP-9 και MMP-2 και κατά συνέπεια αυξημένη ικανότητα διείσδυσης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων (Kim et al. 2008b).

1.4.3.3.5 TIMP-1 και σύνθεση των στεροειδών

Ο TIMP-1 συμμετέχει στη σύνθεση των στεροειδών, στη ρύθμιση της συγκέντρωσής τους και επομένως στην ανάπτυξη των αρσενικών και θηλυκών γαμετικών κυττάρων. Ο TIMP-1 εκφράζεται σε ιστούς που συμμετέχουν στην παραγωγή των στεροειδών όπως τα επινεφρίδια, ο πλακούντας και οι ωοθήκες. Εντούτοις *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι ποντίκια που δεν εκφράζουν τον TIMP-1 είναι γόνιμα υποδηλώνοντας ότι ο ρόλος του TIMP-1 είναι συμπληρωματικός (Nothnick 2001).

1.4.3.3.6 TIMP-1 και εμβρυογένεση

Ο TIMP-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας κατά την εμφύτευση του βλαστοκυττάρου, οπότε αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασής του (Alexander et al. 1996a; Brenner et al. 1989).

1.4.3.3.7 TIMP-1 και αιμοποίηση

Πρόσφατα διευκρινίστηκε ο ρόλος του TIMP-1 στην αιμοποίηση, οπότε δείχτηκε ότι ο TIMP-1 επάγει τη διαφοροποίηση και ευνοεί την κυτταρική επιβίωση στην κυτταρική σειρά των ερυθροκυττάρων UT-7. Στην κυτταρική σειρά UT-7 η επεξεργασία με ερυθροποιητίνη επάγει την έκφραση του TIMP-1 ο οποίος δρα αυτοκρινώς, παράλληλα, όμως, τα κύτταρα του στρώματος εκκρίνουν TIMP-1 ο οποίος δρα παρακρινώς, με αποτέλεσμα το ίδιο το μικροπεριβάλλον να συμμετέχει ενεργά στην αιμοποίηση (Lambert et al. 2003).

1.4.3.3.8 TIMP-1 και απόπτωση

Η ρύθμιση της απόπτωσης από τον TIMP-1 έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει δείχτεί ότι προστατεύει από την απόπτωση είτε με την αναστολή των MMPs είτε με την ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης, πιθανόν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Ο TIMP-1 προστατεύει από την απόπτωση τα ηπατικά κύτταρα με αναστολή των MMPs, αφού η μεταλλαγμένη μορφή του TIMP-1 όπου υπάρχει απώλεια της ικανότητας αναστολής των MMPs, δεν προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Η αναστολή των MMPs είναι απαραίτητη καθώς τα ένζυμα αυτά πρωτεολύουν την N-καδερίνη η οποία μεσολαβεί στη μεταξύ των κυττάρων επικοινωνία (Murphy et al. 2002). Τέλος έχει δείχτεί ότι η απόπτωση μειώνεται σε ποντίκια που εκφράζουν την ενεργοποιημένη μορφή της MMP-3 όταν παράλληλα υπερεκφράζουν τον αναστολέα της TIMP-1 (Alexander et al. 1996b). Η αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 στις παραπάνω περιπτώσεις οφείλεται στην ικανότητα αναστολής της δράσης των MMPs και επομένως στη διατήρηση της διασύνδεσης μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας. Η απώλεια της σύνδεσης μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας επάγει ένα είδος απόπτωσης που ονομάζεται *anoikis* (Frisch and Francis 1994).

Επιπλέον πολλές μελέτες αφορούν στην αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 ανεξάρτητα από τη δράση του ως αναστολέα των MMPs. Ο TIMP-1 προστατεύει από την απόπτωση διάφορους κυτταρικούς τύπους μεταξύ των οποίων τα παγκρεατικά νησίδια, τα B-λεμφοκύτταρα και διάφορες κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt's (Guedez et al. 1998; Han et al. 2001). Η προστασία έναντι της απόπτωσης στα κύτταρα λεμφώματος Burkitt's αναστέλλεται παρουσία κατάλληλων αντισωμάτων

έναντι του TIMP-1, ενώ η αλκυλιωμένη μορφή του TIMP-1 που δεν έχει την ικανότητα αναστολής των MMPs, προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Η παραπάνω εργασία δείχνει ότι η προστασία από την απόπτωση είναι ανεξάρτητη από τη δράση του TIMP-1 ως αναστολέα. Μία ερμηνεία αυτού του φαινομένου αφορά την ικανότητα του TIMP-1 να επάγει την έκφραση μορίων κυτταρικής επιβίωσης όπως οι πρωτεΐνες ιντερλευκίνη-10 (Interleukin-10, IL-10) και BCL-X_L.

Εναλλακτικά η αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών. Ο TIMP-1 προστατεύει τα κύτταρα στις κυτταρικές σειρές UT-7 και 32D από απόπτωση μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κινάσης JAK2 και των κινασών PI-3K/AKT/PKB, τη φωσφορυλίωση του προ-αποπτωτικού μορίου BAD που οδηγεί στην απενεργοποίησή του και την απελευθέρωση του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L. Η ενεργοποίηση του παραπάνω σηματοδοτικού μονοπατιού από τον TIMP-1 προϋποθέτει τη δέσμευσή του στην κυτταρική επιφάνεια και είναι ανεξάρτητη από τη δράση του ως αναστολέα (Lambert et al. 2003). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο TIMP-1 προστατεύει από την επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο μέσω ενεργοποίησης των κινασών PI-3K και AKT/PKB (Boulday et al. 2004). Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα του TIMP-1 στην κυτταρική σειρά μαστού ανθρώπου MCF10A, όπου δείχτηκε ότι ο TIMP-1 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από απώλεια ορού, απώλεια σύνδεσης με τον εξωκυττάριο χώρο, σταυροσπορίνη, TRAIL, H₂O₂. Η προστασία έναντι της απόπτωσης από τον TIMP-1 περιλαμβάνει τη μειωμένη ενεργοποίηση των κασπασών και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης που περιλαμβάνουν τις κινάσες ERKs, FAK, PI-3K και AKT/PKB, καθώς έχει δράση αυξητικού παράγοντα (Liu et al. 2003; Liu et al. 2005). Οι ενεργοποιημένες ERKs και Akt/PKB φωσφορυλιώνουν τα μόρια BIM και BAD αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την αναστολή της προ-αποπτωτικής δράσης τους (Ley et al. 2003; Datta et al. 1997). Επίσης οι κινάσες ERKs και AKT/PKB συμμετέχουν στην ενεργοποίηση άλλων κινασών ή μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση (Brunet et al. 1999a; Bonni et al. 1999). Είναι ενδιαφέρον ότι στην ίδια κυτταρική σειρά MCF10A η υπερέκφραση του BCL-2 προκαλεί την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1, αλλά όχι του TIMP-2 (Li et al. 1999). Η αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 είναι

ανεξάρτητη της αναστολής των MMPs, αφού μία μεταλλαγμένη μορφή που έχει χάσει την ικανότητα αναστολής προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Η προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι της απόπτωσης έχει εξακριβωθεί και στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς MBA-1 που αφορά κύτταρα του μυελού των οστών. Ο TIMP-1 αναστέλλει την απόπτωση λόγω απώλειας ορού με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και ανεξάρτητα από την αναστολή των MMPs, αφού η μεταλλαγμένη μορφή του TIMP-1 που έχει χάσει την ικανότητα αναστολής των MMPs, διατηρεί την ικανότητα προστασίας από την απόπτωση. Η αγρίου τύπου μορφή του TIMP-1 - όπως και η μεταλλαγμένη μορφή - ενεργοποιούν τις κινάσες PI-3K και JNKs, αυξάνουν το λόγο BCL-2/BAX και προκαλούν μείωση στη δραστηριότητα των κασπασών (Guo et al. 2006). Η υπερέκφραση του TIMP-1 συνδέεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του BAX και μειωμένα επίπεδα απόπτωσης (Lin et al. 2001). Τέλος αντίστοιχος μηχανισμός κυτταρικής επιβίωσης επάγεται από τον TIMP-1 ανεξάρτητα από την αναστολή των MMPs στην καρκινική σειρά κυττάρων μαστού T-47D τα οποία καλλιεργούνται απουσία ορού. Συγκεκριμένα, ο TIMP-1 επάγει τη φωσφορυλίωση της κινάσης κυτταρικής επιβίωσης AKT/PKB, μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει πρωτεΐνη G, την PI-3K και τις κινάσες τυροσίνης της οικογένειας SRC (Src Family Kinases) (Lee et al. 2003).

1.4.3.4 Ο υποδοχέας του TIMP-1 στην κυτταρική επιφάνεια

Ο μηχανισμός προστασίας των κυττάρων από την απόπτωση από τον TIMP-1 είναι ανεξάρτητος από τη δράση του ως αναστολέα των MMPs και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης. Η ενεργοποίηση των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και προϋποθέτει τη δέσμευση του TIMP-1 σε κατάλληλο υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας. Οι πρώτες αναφορές σχετικά με τη δέσμευση του TIMP-1 στην κυτταρική επιφάνεια αφορούν την κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7 όπου δείχθηκε ότι ο TIMP-1 δεσμεύεται σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και ακολούθως μετακινείται προς τον πυρήνα (Ritter et al. 1999). Αντίστοιχες παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν και στους φυσιολογικούς ινοβλάστες Gin-1, στα πυρηνικά εκχυλίσματα των οποίων εντοπίστηκε σημαντική ποσότητα

TIMP-1 που ήταν ιδιαίτερα αυξημένη όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου (Zhao et al. 1998).

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας μέσω του οποίου δεσμεύεται ο TIMP-1 και επάγει την αντι-αποπτωτική δράση στην κυτταρική σειρά MCF10A. Ο TIMP-1 αλληλεπιδρά στην κυτταρική επιφάνεια με το σύμπλοκο τετρασπανίνη CD63-ιντεγκρίνη β1 και τα επίπεδα του TIMP-1 σχετίζονται με τα επίπεδα ενεργοποίησης του μονοπατιού κυτταρικής επιβίωσης της β1 ιντεγκρίνης (Jung et al. 2006). Ο TIMP-1 μπορεί είτε να αναστέλλει την καταστολή που προκαλεί η CD63 στο μονοπάτι επιβίωσης που ενεργοποιεί η β1 ιντεγκρίνη, είτε να επάγει την ενεργοποίηση που προκαλεί η CD63 στο μονοπάτι της β1 ιντεγκρίνης. Εξάλλου η τετρασπανίνη CD63 αλληλεπιδρά με την 4-κινάση του φωσφοϊνοσιτιδίου (PhosphoInositide 4-Kinase, PI-4K) και την κινάση τυροσίνης SRC και ρυθμίζει την κυτταρική σηματοδότηση στο εσωτερικό του κυττάρου (Lin et al. 2008). Η αλληλεπίδραση του TIMP-1 με τη CD63 - όπως και η αλληλεπίδραση με την πρόδρομη μορφή της MMP-9 - γίνεται μέσω της C-τελικής περιοχής του TIMP-1. Άρα η δέσμευση του TIMP-1 με τη CD63 δρα ανταγωνιστικά στη δέσμευσή του με την pro-MMP-9. Συγκεκριμένα, ο ελεύθερα εκκρινόμενος TIMP-1 αλληλεπιδρά με τη CD63 στην κυτταρική επιφάνεια και ενεργοποιεί το σύμπλοκο CD63-β1 ιντεγκρίνη και στη συνέχεια ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, ενώ αντίθετα το σύμπλοκο TIMP-1/pro-MMP-9 υφίσταται ενδοκυττάρωση (Chirco et al. 2006). Είναι ενδιαφέρον, ότι η δέσμευση του TIMP-1 στην κυτταρική επιφάνεια των ερυθροκυττάρων UT-7 μέσω σχηματισμού συμπλόκου με τις πρωτεΐνες CD44-proMMP-9 επάγει την αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των JAK2/PI-3K/AKT/PKB (Lambert et al. 2009). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η δράση του TIMP-1 εξαρτάται από τη συγκέντρωση των MMPs ή των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας με τους οποίους αλληλεπιδρά, δηλαδή με τη σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του ιστού. Το παραπάνω μοντέλο εξηγεί και την παρατήρηση ότι στα κύτταρα ινοσαρκώματος HT-1080 η μείωση στην έκφραση της MMP-9 προκάλεσε αυξημένη ικανότητα διείσδυσης και μετάστασης (Deryugina et al. 2005).

Σε προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες έχουν αναφερθεί κι άλλοι πιθανοί υποδοχείς του TIMP-1 στην κυτταρική επιφάνεια οι οποίοι διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η διευκρίνιση των υποδοχέων αυτών είναι χρήσιμη για την

περιγραφή των πολύπλοκων μηχανισμών σηματοδότησης από τον TIMP-1 ανάλογα με το μικροπεριβάλλον του ιστού. Για παράδειγμα, στους νευρώνες έχουν αναγνωριστεί ως υποδοχείς οι υποδοχείς γλουταμινικού, ενώ στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού ανθρώπου BC61 έχει αναγνωριστεί ένας υποδοχέας μεγέθους 80 kDa (Luparello et al. 1999). Όμως ο καλύτερα μελετημένος υποδοχέας είναι το σύμπλοκο της τετρασπανίνης CD63-β1 ιντεγκρίνης.

1.5 Ιντεγκρίνες

1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά και δομή των ιντεγκρινών

Η εξωκυττάρια μήτρα παρέχει στήριξη στους ιστούς και αποτελεί ένα σύνθετο μίγμα που περιλαμβάνει το κολλαγόνο και άλλες πρωτεΐνες όπως ινωδονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεΐνες αυτές που διαπλέκονται με το κολλαγόνο, προσδιορίζουν στην εξωκυττάρια μήτρα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της και μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις όπως και η κυτταρική επικοινωνία είναι σημαντικές διότι ρυθμίζουν φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η ανοσολογική απόκριση και η ιστική μορφογένεση, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η μετάσταση, η θρόμβωση και η φλεγμονή. Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιούνται με διάφορες ομάδες υποδοχέων κυτταρικής προσκόλλησης που περιλαμβάνουν τις οικογένειες των ανοσοσφαιρινών, των καδερινών (cadherins), των σελεκτινών (selectins) και των ιντεγκρινών (integrins) (Shimaoka and Springer 2003).

Οι ιντεγκρίνες είναι γλυκοζυλιωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I. Πρόκειται για ετεροδιμερείς υποδοχείς που αποτελούνται από δύο υπομονάδες, την υπομονάδα α και την υπομονάδα β συνδεδεμένες μεταξύ τους μη ομοιοπολικά. Είναι γνωστές 18 α και 8 β υπομονάδες που σχηματίζουν 24 διαφορετικά ετεροδιμερή (Hynes 2002). Μεταξύ των α ιντεγκρινικών υπομονάδων εμφανίζεται δομική ομολογία της τάξης του 30% και μεταξύ των β υπομονάδων της τάξης του 45%, αλλά οι α και β υπομονάδες διαφέρουν μεταξύ τους. Σχετικά με τη δομή των α και β ιντεγκρινικών υπομονάδων έχει αναφερθεί ότι έχουν μία κυτταροπλασματική επικράτεια, μία διαμεμβρανική επικράτεια και μία εξωκυτταρική επικράτεια. Η κυτταροπλασματική επικράτεια των α υπομονάδων περιέχει τη χαρακτηριστική αλληλουχία GFFKR που είναι σημαντική για την αλληλεπίδρασή τους με την κυτταροπλασματική επικράτεια των β υπομονάδων. Εξάλλου, η τελευταία περιέχει τη χαρακτηριστική αλληλουχία NPxY/F (το x αντιστοιχεί σε οποιοδήποτε αμινοξύ) όπου η φωσφορυλίωση της τυροσίνης επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες και το σχηματισμό πολυμοριακών συμπλόκων με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης ή συνδέονται με τον

για τον προσδέτη. Τα ιόντα Mn^{2+} και Mg^{2+} ευνοούν τη δέσμευση του προσδέτη στην ιντεγκρίνη και την ενεργοποίησή της, ενώ τα ιόντα Ca^{2+} προκαλούν την απελευθέρωση του προσδέτη και την απενεργοποίηση της ιντεγκρίνης (Li et al. 1998). Ένα παράδειγμα που αναφέρεται στο φυσιολογικό ρόλο των μεταλλικών ιόντων στη λειτουργία των ιντεγκρινών είναι η διαδικασία της ανακατασκευής του οστού. Οι οστεοκλάστες προσκολλώνται στην επιφάνεια του οστού κυρίως μέσω της ιντεγκρίνης ανβ3 και ξεκινούν τη διαδικασία της αποικοδόμησής του. Η διαδικασία αυτή συνδέεται με την απελευθέρωση των ιόντων Ca^{2+} από το οστό που έχουν ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση των οστεοκλαστών από το οστό, πιθανόν λόγω μειωμένης ικανότητας προσκόλλησης μέσω της ιντεγκρίνης ανβ3 (Ross et al. 1993).

Ο συνδυασμός των α και β υπομονάδων καθορίζει την εξειδίκευση της ιντεγκρίνης για τον προσδέτη. Τα πλέον συνηθισμένα μόρια προσδέτες είναι τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (κολλαγόνο, λαμινίνη, ινωδονεκτίνη) και η θέση πρόσδεσής τους είναι στην κεφαλή της ιντεγκρίνης. Με κριτήριο την ειδικότητα για τον προσδέτη οι ιντεγκρίνες διακρίνονται σε ιντεγκρίνες που δεσμεύουν τη λαμινίνη ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$), σε ιντεγκρίνες που δεσμεύουν το κολλαγόνο ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$), σε ιντεγκρίνες των λευκοκυττάρων ($\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha D\beta 2$) και σε ιντεγκρίνες που αναγνωρίζουν την αλληλουχία RDG ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha IIb\beta 3$).

1.5.2 Ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και κυτταρική σηματοδότηση

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ιντεγκρίνες μεταδίδουν σήματα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και προς τις δύο κατευθύνσεις, καθώς η δέσμευση του προσδέτη ρυθμίζεται από σήματα που προέρχονται από το εσωτερικό (inside-out signalling) ή από το εξωτερικό του κυττάρου (outside-in signalling). Οι ιντεγκρίνες αφού συνδεθούν με τον προσδέτη τους, συναθροίζονται στις θέσεις πρόσδεσης και διασυνδέονται με στοιχεία του κυτταροσκελετού (ινίδια ακτίνης) προκαλώντας την αναδιοργάνωσή του. Παράλληλα, σχηματίζουν τις εστιακές επαφές καθώς συνδέονται με διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται στον κυτταροσκελετό και επιτρέπουν τη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως οι α -ακτινίνη, ταλίνη, παξιλίνη, βινκουλίνη και φιλαμίνη (Hemler 1998; van der Flier and Sonnenberg 2001). Επίσης, συνδέονται με πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο και ρυθμίζουν τη διαμόρφωση και την

ενεργοποίηση των ιντεγκρινών όπως η πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου και ιντεγκρίνης (Calcium and Integrin Binding Protein, CIB) (Barry et al. 2002). Τέλος, προκαλούν την ενεργοποίηση κομβικών κινάσων οι οποίες συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κινητικότητα, η διείσδυση και η επιβίωση. Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις ιντεγκρίνες και τα οποία έχουν μελετηθεί καλύτερα είναι αυτά που περιλαμβάνουν τις κινάσες FAK και ILK (Dedhar 2000; Schlaepfer et al. 1994).

Η FAK είναι η βασική κινάση που ενεργοποιείται μετά την άμεση ή έμμεση αλληλεπίδρασή της με τις β ιντεγκρινικές υπομονάδες, αυτοφωσφορυλιώνεται στην Tyr397 και επάγει τη δέσμευση των πρωτεϊνών SRC ή FYN. Η αλληλεπίδραση της FAK με την SRC ενισχύει τη δράση της SRC η οποία φωσφορυλιώνει περαιτέρω την FAK στις Tyr407, Tyr576, Tyr577, Tyr861 και Tyr925. Η SRC αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η παξιλίνη και πρωτεΐνες-προσαρμοστές όπως η p130^{CAS}. Η φωσφορυλίωση της FAK στην Tyr925 από την SRC οδηγεί στη δέσμευση του συμπλόκου που αποτελείται από τη δεσμευμένη σε υποδοχέα αυξητικού παράγοντα πρωτεΐνη-2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2, GRB2) και τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (Son Of sevenless, SOS) και την ενεργοποίηση των MAPKs (Schlaepfer and Hunter 1997), ενώ η φωσφορυλίωση της FAK στην Tyr397 από την SRC επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με την υπομονάδα p85 της PI-3K που οδηγεί στην ενεργοποίηση της AKT/PKB. Εναλλακτικά, η FYN που ενεργοποιείται μετά από αλληλεπίδρασή της με τις β1 και αν ιντεγκρινικές υπομονάδες, φωσφορυλιώνει την SHC. Κατόπιν, η SHC αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο GRB-2/SOS και ενεργοποιεί το μονοπάτι των πρωτεϊνών RAS και RAF και τις MAPKs (Wary et al. 1998).

Το άλλο κύριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των ιντεγκρινών εκκινείται από την αλληλεπίδραση της ILK με την β1, β2 ή β3 ιντεγκρινική υπομονάδα (Hannigan et al. 1996; Delcommenne et al. 1998). Η ILK είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που εντοπίζεται στις εστιακές επαφές με χαμηλή ενεργότητα κινάσης. Όμως η πρόσδεση των κυττάρων σε μόρια της ECM μέσω των ιντεγκρινών ή η παρουσία αυξητικών παραγόντων προκαλεί την εξαρτώμενη από την PI-3K ενεργοποίηση της ILK (Delcommenne et al. 1998). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναγνωρίσει μία σειρά πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνονται από την ενεργοποιημένη

ILK. Η ILK προκαλεί τη φωσφορυλίωση της AKT/PKB στη Ser473 και της GSK3β στη Ser9, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η πρώτη και να αναστέλλεται η δεύτερη (Troussard et al. 1999). Ακόμη, η ILK φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης και την αφιζίνη (Yamaji et al. 2001).

Επίσης οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν με μία σειρά διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όπως οι τετρασπανίνες οι οποίες δεσμεύονται στην εξωκυτταρική περιοχή των ιντεγκρινών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προκαλούν εκτεταμένη συσσωμάτωση των ιντεγκρινών και άλλων πρωτεϊνών, οπότε σχηματίζονται εκτεταμένα σύμπλοκα που επιδρούν στην κυτταρική μετανάστευση και στην έκφραση των ιντεγκρινών στην κυτταρική επιφάνεια μέσω της ρύθμισης γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών. Επιπλέον, αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων όπως οι υποδοχείς των EGF και PDGF και σχηματίζουν συσσωματώματα. Ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων αποτρέπει την αποφωσφορυλίωση και την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εκκινούνται από τους αυξητικούς παράγοντες. Εξάλλου, έχει παρατηρηθεί ταυτόχρονη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από τις ιντεγκρίνες και τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων τα οποία συγκλίνουν, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των σηματοδοτικών μονοπατιών των αυξητικών παραγόντων. Άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως κανάλια ιόντων και πρωτεάσες που αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες ρυθμίζουν τη διαμόρφωση και την ενεργοποίησή τους.

1.5.3 Ιντεγκρίνες και απόπτωση

Οι κύριες ιντεγκρίνες που σηματοδοτούν την κυτταρική επιβίωση είναι οι α1β1, α2β1, α3β1, α5β1, α6β1, α6β4 και ανβ3 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τη σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας και αν πρόκειται για καρκινικά κύτταρα το στάδιο αποδιαφοροποίησής τους (Lee and Ruoslahti 2005). Η κυτταρική επιβίωση μπορεί να εξαρτάται από την έκφραση των μορίων της οικογένειας BCL-2 καθώς, η δέσμευση των ιντεγκρινών α5β1 και ανβ3 αντίστοιχα στην ινωδονεκτίνη και την βιτρονεκτίνη αυξάνει το λόγο BCL-2/BAX και ταυτόχρονα αναστέλλει την p53 (Stromblad et al. 1996; Matter and Ruoslahti 2001). Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην ανθεκτικότητα των κυττάρων έναντι της απόπτωσης έχει μελετηθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Κύτταρικές σειρές από ωοθήκη αρουραίου, επιθηλιακά κύτταρα αρουραίου και

αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου προστατεύονται από απόπτωση λόγω απώλειας σύνδεσης με την ECM σε υπόστρωμα ινωδονεκτίνης μέσω της ιντεγκρίνης α5β1, ενώ επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα και καρκινικά κύτταρα μαστού χρησιμοποιούν την ιντεγκρίνη α2β1 σε υπόστρωμα κολλαγόνου (Saelman et al. 1995; Zhang et al. 1995). Ακόμη, η κυτταρική σειρά καρκίνου μαστού MDA-MB-435 χρησιμοποιεί την ιντεγκρίνη α6β1 και απώλεια της σύνδεσης μέσω αυτής προκαλεί αυξημένη απόπτωση και αναστολή της ικανότητας ανάπτυξης μετάστασης, ενώ η κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη PC3 μέσω αλληλεπίδρασης της ιντεγκρίνης β1 με την ινωδονεκτίνη επάγει την έκφραση της επιβιωτίνης και εμφανίζει ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση (Fornaro et al. 2003).

Αντίστοιχο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιντεγκρίνη ανβ3 η οποία έχει κρίσιμο ρόλο σε διαδικασίες αναδόμησης των ιστών και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση, καθώς και σε διάφορους τύπους καρκίνου, εξασφαλίζοντας την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση (Albelda et al. 1990; Montgomery et al. 1994). Επίσης, συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση με διάφορους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB (Bhattacharya et al. 2006; Scatena et al. 1998) και την αναστολή της δράσης της p53 που συνδέεται με τη μείωση στην έκφραση των πρωτεϊνών BAX και p21^{waf1/cip1} (Stromblad et al. 1996). Στα επιθηλιακά κύτταρα εντέρου IEC-6 η αναστολή της απόπτωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της SRC και των κινασών AKT/PKB, JAK μέσω των οποίων ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-KB και STAT3. Επιπλέον έχειδειχτεί ότι επάγει την έκφραση της MMP-2 και δεσμεύεται άμεσα στο μη καταλυτικό C-τελικό της άκρο (Bafetti et al. 1998; Levkau et al. 2002). Έτσι, συμμετέχει στην αγγειογένεση, τη διείσδυση και την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου καθώς η ικανότητα διείσδυσης των κυττάρων εξαρτάται από την ικανότητα προσκόλλησης στην εξωκυττάρια ουσία. Ειδικά σε κύτταρα μυελού των οστών η αλληλεπίδρασή της ανβ3 με την MMP-2 ενισχύεται από τη δράση της οστικής σιάλοπρωτεΐνης και ευνοεί την κινητικότητά τους (Karadag and Fisher 2006). Ακόμη, η ιντεγκρίνη ανβ3 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων όπως των υποδοχέων των PDGF και VEGF και οδηγεί σε περαιτέρω ενίσχυση της δράσης τους (Soldi et al. 1999; Woodard et al. 1998). Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές παρατηρήθηκε ένα είδος αμφι-επικοινωνίας (cross-talk) μεταξύ των ιντεγκρινικών υπομονάδων β1 και

αν, έτσι, ώστε η συνδυαστική έκφραση και ενεργοποίηση τους προκαλεί την εμφάνιση υψηλού επιπέδου ειδικότητας για τους αντίστοιχους προσδέτες. Ειδικά η διαμόλυνση των κυττάρων GD25 με την ιντεγκρινική υπομονάδα β1 προκαλεί μείωση στα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρινικής υπομονάδας β3 καθώς τροποποιεί τη σταθερότητα του mRNA της (Retta et al. 2001).

Αντίστοιχα σημαντικές ομοιότητες παρουσιάζονται στον τρόπο σηματοδότησης που εκκινείται από τις ιντεγκρίνες. Η αντι-αποπτωτική κυτταρική σηματοδότηση από τις β1 και ανβ3 περιλαμβάνει τις κινάσες FAK και ILK, οι οποίες ενεργοποιούν την AKT/PKB και τις MAPKs. Η FAK συμβάλλει στην αντοχή έναντι της απόπτωσης μέσω άμεσης αλληλεπίδρασής της με την PI-3K και την ενεργοποίηση της AKT/PKB. Έχειδειχτεί ότι η ενεργοποίηση της AKT/PKB συμβάλλει στην προστασία των ινοβλαστών από την απόπτωση λόγω απώλειας της σύνδεσής τους με το κολλαγόνο και ότι η μεσολαβούμενη από την AKT/PKB ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB συμβάλλει στην προστασία των λευχαιμικών κυττάρων HL-60 από την απόπτωση λόγω οξειδωτικού στρες (Xia et al. 2004; Sonoda et al. 2000). Ακόμη η FAK προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της JNK κινάσης και αναστολής της αλληλεπίδρασης της κινάσης RIP1 με το σύμπλοκο των υποδοχέων θανάτου (Almeida et al. 2000; Kurenova et al. 2004). Εξάλλου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ο ρόλος της κινάσης ILK στην καταστολή της απόπτωσης (Attwell et al. 2000). Είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση της ILK ή η παρατεταμένη ενεργοποίησή της οδηγεί σε ενεργοποίηση της AKT/PKB και ταυτόχρονη αναστολή της ενεργότητας της κασπάσης-9 (Persad et al. 2000; Cardone et al. 1998). Η ILK λόγω της δυνατότητάς της να φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης και την αφιβίνη πιθανόν να ρυθμίζει διαδικασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση και κινητικότητα (Yamaji et al. 2001). Γι αυτό η υπερέκφραση της ILK σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκινικών όγκων και αυξημένη ενεργότητα της ILK έχει εντοπιστεί σε περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη και σαρκώματος Ewing (Chung et al. 1998; Graff et al. 2001).

Η κυτταρική επιβίωση ιδιαίτερα στην περίπτωση των καρκινικών όγκων σχετίζεται και με τη ρύθμιση της μετάφρασης. Πρόσφατα διευκρινίστηκε ότι οι ιντεγκρίνες συμμετέχουν στη διαδικασία έναρξης της μετάφρασης και επομένως στην ανάπτυξη και τη διείσδυση των καρκινικών όγκων. Η προσκόλληση των ινοβλαστών στην ινωδονεκτίνη μέσω της ιντεγκρίνης α5β1 προκαλεί ενεργοποίηση των κινασών

PI-3K, AKT/PKB και των πρωτεϊνών 4E-BP1 και eIF4e που προκαλούν την έναρξη της μετάφρασης (Gottini et al. 2005). Αντίστοιχο ρόλο διαδραματίζουν οι ιντεγκρίνες ανβ3 και αIIbβ3 σε ενδοθηλιακά κύτταρα, σε κύτταρα μελανώματος και στα αιμοπετάλια (Lindemann et al. 2001). Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινά από την ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη ανβ3 προκαλεί την ενεργοποίηση των κινασών PI-3K, AKT/PKB και mTOR, ενώ η ιντεγκρίνη αIIbβ3 ενεργοποιεί απευθείας την mTOR, η οποία προκαλεί την αποδέσμευση της πρωτεΐνης 4EBP1 από τον παράγοντα eIF4E και επιτρέπει την έναρξη της μετάφρασης.

Τέλος η κυτταρική επιβίωση εξαρτάται και από τη διατήρηση της κυτταρικής προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων του ίδιου ή διαφορετικού τύπου, η οποία μεσολαβείται από τις καδερίνες. Οι καδερίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διακρίνονται σε διάφορες υποτάξεις όπως E-καδερίνες, N-καδερίνες και P-καδερίνες και οδηγούν σε ενεργοποίηση της AKT/PKB. Η προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων ρυθμίζει την προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα και αντίστροφα. Έτσι η μείωση των επιπέδων έκφρασης της E-καδερίνης οδηγεί σε μεταβολές στην έκφραση των ιντεγκρινών ανβ1 και ανβ5 και αντίστροφα, η ενεργοποίηση της ILK από τις ιντεγκρίνες προκαλεί μείωση στα επίπεδα έκφρασης της E-καδερίνης και ενεργοποιεί τον παράγοντα ενίσχυσης των λεμφοειδών (Lymphoid Enhancer Factor, LEF) ο οποίος σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και το μετασχηματισμό των κυττάρων (Wu et al. 1998; von Schlippe et al. 2000).

1.5.4 Βιολογικός ρόλος των ιντεγκρινών στο οστό

Η κυτταρική σηματοδότηση που μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών με την εξωκυττάρια μήτρα έχει μελετηθεί σε πρωτογενείς καλλιέργειες οστεοβλαστών. Τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών δείχνουν ότι οι ιντεγκρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακατασκευή του οστού και στη διαφοροποίηση και την επιβίωση των οστεοβλαστικών κυττάρων (Damsky et al. 1997; Globus et al. 1998; Moursi et al. 1997). Οι βασικές ιντεγκρίνες που εκφράζουν οι οστεοβλάστες είναι οι α2β1, α4β1, α5β1, ανβ3 και ανβ5. Η κυτταρική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών έχει μελετηθεί στην κυτταρική σειρά MC3T3-E1. Η κυτταρική διαφοροποίηση ενισχύεται από την αλληλεπίδραση της α2β1 με το κολλαγόνο τύπου I, οπότε προκαλείται ενεργοποίηση της FAK και της αλκαλικής φωσφατάσης και επακόλουθη έκφραση της οστεοκαλσίνης και της οστικής σιάλοπρωτεΐνης που είναι

χαρακτηριστικές πρωτεΐνες-δείκτες (Reyes and Garcia 2004), ενώ, η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών παρουσία της BMP-2 αναστέλλεται χωρίς ταυτόχρονη ενεργοποίηση της FAK από την $\alpha 2\beta 1$ (Tamura et al. 2001). Εξάλλου, στην ίδια κυτταρική σειρά οστεοβλαστών MC3T3-E1, η κυτταρική διαφοροποίηση αναστέλλεται με την υπερέκφραση της ανβ3, οπότε διαπιστώθηκε μείωση στην ενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης και στην έκφραση της οστικής σιάλοπρωτεΐνης και ταυτόχρονη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Cheng et al. 2001). Τέλος, η προσκόλληση των κυττάρων μέσω των ιντεγκρινών σε συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας ενισχύει την έκφραση των ειδικών γονιδίων του οστού όπως η οστεοκαλσίνη και ενζύμων του εξωκυττάριου χώρου όπως οι μεταλλοπρωτεάσες, που έχουν ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό του οστού (Moursi et al. 1997; Ronziere et al. 2005).

Στην επιβίωση των οστεοβλαστών είναι αξιοσημείωτος ο ρόλος της FAK, καθώς, όταν δεν ενεργοποιείται η FAK, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες από το αρθρικό υγρό κουνελιού οδηγούνται σε απόπτωση μέσω της p53. Έτσι, η p53 ενεργοποιείται σε περιπτώσεις όπου τα σήματα κυτταρικής επιβίωσης που προέρχονται από την εξωκυττάρια μήτρα διακόπτονται λόγω ανενεργού μορφής της FAK (Ilic et al. 1998). Σχετικά με την κυτταρική επιβίωση των οστεοβλαστών εξαρτάται και από το στάδιο διαφοροποίησής τους, αφού κατά τη διαφοροποίησή τους είναι απαραίτητη η σηματοδότηση μέσω της ινωδονεκτίνης και της λαμινίνης, ενώ στους ώριμους οστεοβλάστες η επιβίωση εξαρτάται κυρίως από τις πρωτεογλυκάνες (Globus et al. 1998; Moursi et al. 1997).

Τέλος, η έκφραση των ιντεγκρινών εξαρτάται από μόρια-σήματα από το μικροπεριβάλλον του οστού. Συγκεκριμένα, ο TGF- β αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της $\alpha 5\beta 1$ και ενισχύει την προσκόλληση των οστεοβλαστών σε υπόστρωμα ινωδονεκτίνης (Nesti et al. 2002), ενώ ο TNF- α μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της ανβ5 σε πρόδρομες μορφές οστεοκλαστών (Inoue et al. 2000). Σε πρόσφατη μελέτη αναφέρθηκε ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των ιντεγκρινών με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια των οστεοβλαστών. Κατά την ενεργοποίηση του FGFR2 διαπιστώθηκε ότι αλληλεπιδρά με την ιντεγκρινική υπομονάδα $\alpha 5$ και προκαλεί μείωση της έκφρασής της λόγω αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα. Η μείωση της $\alpha 5$ συνδέεται με μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης σε υπόστρωμα ινωδονεκτίνης και επαγωγή της απόπτωσης λόγω *anoikis*.

1.6 Σκοπός

Η φαρμακευτική παρέμβαση για τη θεραπεία και την πρόληψη του εκφυλισμού του οστού έχει επικεντρωθεί στη μείωση του αριθμού των οστεοκλαστών και της αποικοδομητικής τους δραστηριότητας. Εντούτοις, για τους ασθενείς με πολύ χαμηλή οστική μάζα η χορήγηση θεραπείας για την αντιμετώπιση της αποικοδόμησης του οστού δεν είναι επαρκής, αλλά απαιτείται ταυτόχρονη θεραπεία για την αύξηση της οστικής μάζας. Αυτό συνεπάγεται, είτε την αναστολή του ρυθμού απόπτωσης των οστεοβλαστών, είτε την αναστολή των ενζύμων που μετέχουν στην αποικοδόμηση του οστού. Η ρύθμιση της απόπτωσης των οστεοβλαστών εν μέρει εξαρτάται από τη δράση των MMPs, οι οποίες εκκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του οστού και μέσω της αλληλεπίδρασής τους με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου ρυθμίζουν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η δραστηριότητα των MMPs ελέγχεται από την έκκριση των ειδικών ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών, των TIMPs. Πρωταρχικός στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι να διερευνηθεί η επίδραση των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων από το μικροπεριβάλλον του οστού στην έκφραση των MMPs και TIMPs. Για τη μελέτη της έκφρασης των MMPs και TIMPs χρησιμοποιούνται υπερκείμενα υλικών καλλιέργειας κυττάρων MG63, τα οποία αποτελούν μοντέλο μελέτης των οστεοβλαστικών κυττάρων.

Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές ο TIMP-1 αναστέλλει την απόπτωση σε διάφορους τύπους φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του TIMP-1 έναντι της απόπτωσης στα ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος MG63, χρησιμοποιείται η κυτταροκίνη TNF-α ως παράγοντας του μικροπεριβάλλοντος του οστού με κυτταροτοξική δράση. Με βάση προηγούμενες ερευνητικές εργασίες, ο TNF-α ρυθμίζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, με αποτέλεσμα η επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση να οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις εκφυλισμού του οστού που οφείλονται σε μειωμένη οστική μάζα και μειωμένο αριθμό οστεοβλαστών. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη διερευνάται η επίδραση του TNF-α στην έκφραση-έκκριση των MMPs και TIMPs και ακολούθως ο ρόλος του TIMP-1 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίζονται με

πειραματικές προσεγγίσεις η βιωσιμότητα των κυττάρων και η έκφραση γνωστών βιοχημικών δεικτών απόπτωσης.

Επειδή η ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών από τους TIMPs εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με κατάλληλους κυτταρικούς υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια και την ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών, για την περαιτέρω μηχανιστική μελέτη της αντι-αποπτωτικής δράσης του TIMP-1 μελετάται, επιπλέον, η αλληλεπίδραση του TIMP-1 με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Συγκεκριμένα, διερευνάται πιθανή αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3, δεδομένου ότι έχει δειχτεί η συμβολή της στην προστασία των κυττάρων έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α με την ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης. Τέλος, για τη μελέτη του λειτουργικού ρόλου της αλληλεπίδρασης του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 στην αντοχή των κυττάρων MG63 έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α, ακολουθείται η προσέγγιση της ειδικής αναστολής της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

2 ΥΛΙΚΑ

2.1 Χημικά αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας 95-100% και ήταν από τις εταιρείες Merck (Darmstadt, Germany), Applichem (Darmstadt, Germany) και Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Ειδικότερα, οι παράγοντες TNF- α , TGF- β και IFN- γ ήταν από την R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) και ο ανασυνδυασμένος TIMP-1 από την Calbiochem (Darmstadt, Germany). Το κυκλοεξαμίδιο (CycloHeximide, CHX) και η εχιστατίνη ήταν από την Sigma Chemical Co (St. Luis, MO, USA).

Τα πλαστικά καλλιέργειας όπως φλάσκες, τριβλία και πλάκες πολλαπλών φρεατίων ήταν από τον οίκο Orange Scientific (Belgium) και το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, ο βόειος ορός καθώς και τα συμπληρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Biochrom Seromed (Berlin, Germany). Οι καλυπτρίδες καλλιέργειας μεγέθους 13 mm ήταν από την εταιρεία VWR International.

Στα πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών Coomassie Plus Protein Assay Reagent της εταιρείας Pierce (Rockford, USA). Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστών μοριακών βαρών (SM0441 με μέγεθος πρωτεϊνών 19-116 kDa) και ποσότητα από την εταιρεία Fermentas και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Hybond-ECL GE HealthCare από την εταιρεία Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Για την εμφάνιση χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας από την εταιρεία Pierce και φωτογραφικό φιλμ Super RX 24X18 της εταιρείας FujiFilm. Η επεξεργασία των φιλμ πραγματοποιήθηκε με διάλυμα εμφάνισης και διάλυμα στερέωσης της εταιρείας Kodak. Για την επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα απομάκρυνσης αντισωμάτων (Re-Blot plus Mild Solution) της εταιρείας Millipore (Temecula, California, USA). Στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη A ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια

σεφαρόζης της εταιρείας Upstate (Temecula, CA, USA). Για τα πειράματα ανοσοφθορισμού οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με το κατάλληλο διάλυμα υποστήριξης VECTASHIELD της εταιρείας Vector Laboratories (Burlingame, USA).

Για την αποσιώπηση του γονιδίου του TIMP-1 χρησιμοποιήθηκε το kit HP GenomeWide siRNA της εταιρείας Qiagen, στο οποίο περιέχεται η αλληλουχία RNA που επιτυγχάνει τη μείωση στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 (siRNA-TIMP-1), η αλληλουχία που δεν προκαλεί αποσιώπηση κάποιου γονιδίου (siRNA-scrambled) και το αντιδραστήριο μετασχηματισμού των κυττάρων RNAiFect.

2.2 Αντισώματα

Στα πειράματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western, ανοσοφθορισμού, ανοσοκατακρήμνισης και κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα:

-α2 ιντεγκρινική υπομονάδα κλώνος P1E6: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε ποντικό και προέρχεται από τη σύντηξη μυελωματικών κυττάρων ποντικού με σπληνοκύτταρα ποντικού ανοσοποιημένου με την α2β1 ιντεγκρίνη ανθρώπου (MAB1950Z, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-α3 ιντεγκρινική υπομονάδα κλώνος P1B5: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε ποντικό και προέρχεται από τη σύντηξη μυελωματικών κυττάρων ποντικού με σπληνοκύτταρα ποντικού ανοσοποιημένου με την α3 ιντεγκρινική υπομονάδα ανθρώπου (MAB1952Z, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-α5 ιντεγκρινική υπομονάδα κλώνος P1D6: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε ποντικό ανοσοποιημένο με την α5 ιντεγκρινική υπομονάδα ανθρώπου (MAB1956Z, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-β1 ιντεγκρινική υπομονάδα κλώνος P5D2: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε ποντικό έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αναγνωρίζει την β1 ιντεγκρινική υπομονάδα ανθρώπου (MAB1959, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-ανβ3 ιντεγκρίνη κλώνος LM609: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε ποντικό που αναγνωρίζει έναν επίτοπο στη διαμόρφωση που προκύπτει μετά από τη

μετα-μεταφραστική διασύνδεση των ιντεγκρινικών υπομονάδων αν και β3 ανθρώπου (MAB1976Z, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-MMP-9: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της MMP-9 που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι της καταλυτικής περιοχής της ενεργής MMP-9 εκφρασμένης σε *E.coli*. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και αντιδρά ακόμη με την πρόδρομη και την ενεργή μορφή της MMP-9 (AB19016, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-MMP-2: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της MMP-2 ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου της περιοχής hinge της MMP-2. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και αντιδρά ακόμη με την φυσιολογική και τη μετουσιωμένη μορφή της MMP-2 (AB809, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-TIMP-1: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την τρίτη θηλιά (loop3) του TIMP-1 (AB800, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-TIMP-2: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-2 ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την καρβοξυτελική περιοχή του TIMP-2 (AB801, Chemicon International, Temecula, CA, USA).

-Ενεργή κασπάση-3 : πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεολυμένης στο αμινοξύ Asp175 κασπάσης-3 του ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει το μεγάλο θραύσμα της ενεργής κασπάσης-3 (9661, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-PARP: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αναγνωρίζει την περιοχή πρωτεόλυσης του PARP ανθρώπου από τις κασπάσες. Το αντίσωμα αναγνωρίζει το ακέραιο PARP και τα θραύσματα που προκύπτουν μετά από πρωτεόλυση από τις κασπάσες (9542, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-NF-KB p65: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της p65 υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την καρβοξυτελική περιοχή της p65 υπομονάδας (sc-372, Santa Cruz Biotechnology).

-phospho-AKT/PKB: μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης (Ser473) μορφής της κινάσης AKT/PKB ποντικού που παρασκευάζεται σε κουνέλι με ανοσοποίηση με συνθετικό φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα

γύρω από την Ser473 (4060S, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-AKT/PKB: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της κινάσης AKT/PKB ποντικού που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την καρβοξυτελική περιοχή της κινάσης AKT/PKB (9272, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-phospho-JNK: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της διπλά φωσφορυλιωμένης (Thr183, Tyr185) μορφής των JNKs που παρασκευάζεται σε ποντικό με ανοσοποίηση με συνθετικό φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα γύρω από τις Thr183, Tyr185 (9251, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-JNK: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι των JNKs που παρασκευάζεται σε ποντικό με ανοσοποίηση με συνθετικό προϊόν σύντηξης GST/JNK2 (9252, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-phospho-p38: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της διπλά φωσφορυλιωμένης (Thr180, Tyr182) μορφής της κινάσης p38 που παρασκευάζεται σε κουνέλι με ανοσοποίηση με συνθετικό φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα γύρω από τις Thr180, Tyr182 (9211, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-p38: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της κινάσης p38 που παρασκευάζεται σε κουνέλι με ανοσοποίηση με συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί σε αμινοξική αλληλουχία της κινάσης p38 (9212, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-phospho-ERK: μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της διπλά φωσφορυλιωμένης (Thr202, Tyr204) μορφής των κινασών ERK1/2 ποντικού που παρασκευάζεται σε κουνέλι με ανοσοποίηση με συνθετικό φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα γύρω από την Tyr204 (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology).

-ERK: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι των κινασών ERK1/2 που παρασκευάζεται σε κουνέλι με ανοσοποίηση με συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα γύρω από τη C-τελική περιοχή των κινασών ERK1/2 (9102, Cell Signalling Technology, Beverly, MA 01915, USA).

-BAX: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του BAX ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την αμινοτελική περιοχή του BAX ανθρώπου. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ακόμη το BAX α , BAX β και BAX δ (sc-493, Santa Cruz Biotechnology).

-BCL-2: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του BCL-2 ανθρώπου που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στην αμινοτελική περιοχή του BCL-2 ανθρώπου (αμινοξέα 1-205) (sc-492, Santa Cruz Biotechnology).

-BAD: πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του BAD ποντικού που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την αμινοτελική περιοχή του BAD (sc-942, Santa Cruz Biotechnology).

-BCL-X_L: μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του BCL-X_L ανθρώπου που παρασκευάζεται σε ποντικό και αναγνωρίζει την καρβοξυτελική περιοχή του BCL-X_L (sc-8392, Santa Cruz Biotechnology).

Ακόμη χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β-τουμπουλίνης/σωληνίνης που παράγεται από τον κλώνο υβριδωμάτων TUB 2.1 από τη Sigma. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β-τουμπουλίνης προέρχεται από τη σύντηξη μυελωματικών κυττάρων ποντικού με σπληνοκύτταρα ποντικού ανοσοποιημένου με τουμπουλίνη από τον εγκέφαλο του αρουραίου.

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αντισώματα έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG ποντικού και κουνελιού συζευγμένα με την υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horseradish Peroxidase: HRP) της εταιρείας Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα δευτερογενή αντισώματα AlexaFluor 488 (πράσινη φθορίζουσα χρωστική) έναντι των ανοσοσφαιρινών ποντικού (A11029) με μέγιστο απορρόφησης στα 495 nm και μέγιστο εκπομπής στα 519 nm και AlexaFluor 568 (κόκκινη φθορίζουσα χρωστική) έναντι των ανοσοσφαιρινών κουνελιού (A11036) με μέγιστο απορρόφησης στα 578 nm και μέγιστο εκπομπής στα 603 nm από την εταιρεία Molecular Probes, Invitrogen (Eugene, OR, USA) και αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG ποντικού συζευγμένο με την ισοθειοκυανιούχα φλουορεσκίνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) της εταιρείας Cappel, ICN Pharmaceuticals.

2.3 Όργανα

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Επωαστικός κλίβανος (HEPAfilter, ThermoForma)
- Θάλαμος νηματικής ροής MICROFLOW Advanced Bio Safety Cabinet-Class II
- Αυτόκαυστο

- Αιματοκυτταρόμετρο Bright-Line της εταιρείας Hausser Scientific (Horsham, PA, USA).
- Οπτικό μικροσκόπιο με δυνατότητα αντίθετης φάσης Olympus H22105
- Συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο τύπου MRC 1024 ES της εταιρείας Bio-Rad
- Μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiophot ProgRes CFscan
- Κυτταρομετρητής ροής FACSCalibur της εταιρείας Becton Dickinson
- Φασματοφωτόμετρο Helios α της εταιρείας Thermo Electron Corporation
- Υπερκαταψύκτης της εταιρείας Thermo Electron Corporation
- Ψυχόμενες φυγόκεντροι (Eppendorf Centrifuge 5417R και Heraeus Instruments Function Line Labofuge 400R)
- Συμπυκνωτής (Speed Vac SC110, Savant)
- Παγίδα κενού (Refrigerated Vapor Trap, Savant)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών μικρού μεγέθους (Mini Protean III Electrophoresis Cell, Bio-Rad)
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Trans-blot SD, Bio-Rad)
- Τροφοδοτικά μηχανήματα (Consort E861, Bio-Rad)
- Πυκνομετρικός Αναλυτής (Image Analyzer) FujiFilm LAS-4000, με λογισμικό κάμερας (BioCapt Vilber Loumart) και λογισμικό επεξεργασίας εικόνας (Bioprofil Vilber Loumart).

2.4 Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν οστεοβλαστικά κύτταρα οστεοσαρκώματος της κυτταρικής σειράς MG63 (ATCC Catalog No.CRL-1427) (Heremans et al. 1978). Τα κύτταρα MG63 προέρχονται από οστεοσάρκωμα 14χρονου ανθρώπου και μορφολογικά μοιάζουν με ινοβλάστες. Αν και χρησιμοποιούνται ως κύτταρα-μοντέλα μελέτης οστεοβλαστικών κυττάρων παρουσιάζουν χαρακτηριστικές διαφορές από αυτούς. Σε σύγκριση με τους οστεοβλάστες, τα κύτταρα MG63 πολλαπλασιάζονται ταχύτερα, είναι πιο επίπεδα και έχουν λιγότερες εστιακές επαφές με αποτέλεσμα να έχουν μικρότερη ικανότητα προσκόλλησης σε κολλαγόνο τύπου I. Τα κύτταρα MG63 εμφανίζουν μεταλλάξεις στον υποδοχέα DR4 σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς οστεοβλάστες (Dechant et al. 2004). Εντούτοις, τα κύτταρα MG63 παρουσιάζουν

αυξημένη δράση αλκαλικής φωσφατάσης μετά τη χορήγηση 1,25-διυδροξυ βιταμίνης D3 όπως και οι πρωτογενείς οστεοβλάστες (Clover and Gowen 1994; Pautke et al. 2004).

3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Καλλιέργεια κυττάρων

3.1.1 Αποστείρωση

Προκειμένου να αποφεύγεται ο κίνδυνος της μόλυνσης και να διασφαλίζεται η διατήρηση της σταθερής κυτταρικής σειράς η καλλιέργεια και η επεξεργασία των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, που διασφαλίζει άσηπτες συνθήκες, αφού αποστειρώνει τον αέρα με τη μέθοδο της διήθησης με κατάλληλα φίλτρα υψηλής απόδοσης. Επιπλέον, όλα τα αναλώσιμα υλικά και τα διαλύματα αποστειρώθηκαν. Η αποστείρωση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταρικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με διήθηση μέσα από φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2 μm , τα οποία δεν επιτρέπουν τη διέλευση των βακτηρίων ή των σπορίων τους. Με τη μέθοδο της διήθησης αποστειρώνονται υλικά τα οποία είναι ευαίσθητα στην υψηλή θερμοκρασία. Αντίθετα η αποστείρωση των ανθεκτικών στην υψηλή θερμοκρασία αναλώσιμων υλικών όπως τα γυάλινα και πλαστικά είδη μπορεί να γίνει με υγρή ή ξηρή θερμότητα. Η αποστείρωση με υγρή θερμότητα είναι ταχεία και επιτυγχάνει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών των μικροοργανισμών, ενώ η αποστείρωση με ξηρή θερμότητα απαιτεί περισσότερο χρόνο, αφού η μεταφορά της θερμότητας απουσία υδρατμών γίνεται πιο αργά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής θερμότητας για την αποστείρωση των γυάλινων και πλαστικών αναλώσιμων η οποία πραγματοποιείται στους 121 °C για 20 min. Η τέταρτη μέθοδος αποστείρωσης που χρησιμοποιείται είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η οποία είναι ταχεία και προκαλεί καταστροφή των μικροοργανισμών καθώς εμποδίζει το διπλασιασμό του DNA. Η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αποστείρωσης των πλαστικών ειδών αλλά και του χώρου εργασίας, ο οποίος ακτινοβολούνταν με υπεριώδη ακτινοβολία για 15 min πριν από κάθε χρήση.

3.1.2 Συντήρηση των κυττάρων

Τα κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο HEPAfilter της εταιρείας ThermoForma σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα περιεκτικότητας σε CO₂ 5%. Το θρεπτικό υλικό ήταν RPMI1640 εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοδιού (Fetal Calf Serum), 2 mM L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Ο ορός πριν τη χρήση απενεργοποιείται με θέρμανση στους 56 °C για 40 min, προκειμένου να αδρανοποιηθούν συστατικά του συμπληρώματος.

Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν σε φλάσκες των 75 cm² ή 25 cm² ή τρυβλία καλλιέργειας μέχρι να καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας, ώστε να μην περιορίζεται η ανάπτυξή τους από την έλλειψη χώρου. Όταν παρατηρείται έλλειψη χώρου, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται και οι μεταβολικές διεργασίες τροποποιούνται. Το φαινόμενο αυτό, αν και κατά κανόνα δεν παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα που έχουν αθανатоποιηθεί, πρέπει να αποφεύγεται. Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα μπορεί να γίνει με μηχανικό τρόπο, με χημικό τρόπο ή με ενζυμικό τρόπο (θρυψινοποίηση).

Τα κύτταρα MG63 ανακαλλιεργούνταν δυο φορές την εβδομάδα ενζυμικά με θρυψινοποίηση. Η συγκεκριμένη διαδικασία έχει ως ακολούθως: αφού απομακρυνθεί το υλικό καλλιέργειας των κυττάρων, τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα θρυψίνης 0.05% (w/v)/Na₂EDTA 0.02% (w/v) και στη συνέχεια αφήνονται για 3 min στους 37 °C με το ίδιο διάλυμα προκειμένου να διακοπουν οι διακυτταρικές συνδέσεις καθώς και η σύνδεση των κυττάρων με το υπόστρωμα. Ακολούθως, στα κύτταρα προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% ορό βόειου εμβρύου (Fetal Bovine Serum, FBS) για να αδρανοποιηθεί το ένζυμο, δεδομένου ότι στον ορό περιέχονται αναστολείς της θρυψίνης. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10 min, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μοιράζονται σε κατάλληλες φλάσκες καλλιέργειας. Τα κύτταρα πριν χρησιμοποιηθούν σε οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία ανακαλλιεργούνται δύο φορές. Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αιμοκυτταρόμετρο.

3.1.3 Μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Προκειμένου να διασφαλίζεται κατά προσέγγιση ο ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα προσδιορίζονταν αριθμητικά με μέτρηση με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Η χρήση του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer είναι η πιο άμεση, απλή και αποδοτική μέθοδος μέτρησης του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα.

Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι μία τροποποιημένη και διαβαθμισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα στην οποία βρίσκονται δύο κατάλληλα επεξεργασμένες και διαγραμμισμένες, λείες επιφάνειες. Σε καθεμία από τις επιφάνειες διακρίνεται ένα τετραγωνικό πλέγμα, στο οποίο σχηματίζονται 4 κύρια τετράγωνα με πλευρά 1 mm ή εμβαδού 1 mm². Επιπλέον το αιμοκυτταρόμετρο περιέχει δύο ακόμη λείες, προεξέχουσες επιφάνειες με επίπεδο παράλληλο προς τις διαγραμμισμένες που ονομάζονται ράχες. Οι ράχες βρίσκονται 0,1 mm υψηλότερα από τις διαγραμμισμένες επιφάνειες και στηρίζουν την καλυπτρίδα. Το εναιώρημα των κυττάρων που πρόκειται να μετρηθεί τοποθετείται σε κατάλληλη κοίλη επιφάνεια (αυλάκωση) στα άκρα της διαγραμμισμένης επιφάνειας και καλύπτει ολόκληρη την διαγραμμισμένη επιφάνεια με τριχοειδή φαινόμενα. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει κάθε τετράγωνο και πρόκειται να μετρηθεί είναι 0.1 mm³ (0.1 mm x 1 mm²) ή 1 x 10⁻⁴ ml. Επομένως ο αριθμός των κυττάρων ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος είναι ο αριθμός των κυττάρων που μετριούνται σε κάθε τετράγωνο x 10.000.

Στην παρούσα εργασία τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε κατάλληλες αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας αποτελούμενες από 6, 12, 24 ή 96 φρεάτια, όπου τοποθετούνταν αντίστοιχα 300 x 10³, 150 x 10³, 60 x 10³ ή 5 x 10³ κύτταρα ανά φρεάτιο.

3.1.4 Κατάψυξη και απόψυξη των κυττάρων

Η ψύξη των κυττάρων εξασφαλίζει τη διατήρηση των κυττάρων νεαρής γενιάς για μεγάλα χρονικά διαστήματα και την απόψυξή τους όταν απαιτείται από τις πειραματικές ανάγκες. Τα κύτταρα νεαρής γενιάς διατηρούν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, ενώ τα κύτταρα μεγαλύτερης γενιάς πολλαπλασιάζονται πιο αργά. Η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε υγρό άζωτο σταδιακά (4 °C, -20 °C, -80 °C, -196 °C) προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή μεγάλου αριθμού

κυττάρων, η οποία οφείλεται στη δημιουργία κρυστάλλων και την επακόλουθη καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων λόγω αλλαγής του pH και της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών. Επίσης για την κατάψυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα, που περιέχει διμέθυλοσουλφοξείδιο (DiMethyl SulfOxide, DMSO), μία κρυοπροστατευτική ουσία η οποία μειώνει το σημείο τήξης του διαλύματος, σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα που αναφέρουν λεπτομέρειες σχετικά με τον χειρισμό των κυτταροκαλλιιεργειών (Ausubel 1989; Freshney 1994).

Αναλυτικότερα, τα κύτταρα ανασηκώνονται από την επιφάνεια της φλάσκας με θρυψινοποίηση, όπως περιγράφηκε, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρούνται στις 1200 rpm για 10 min. Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 2 ml υλικού κατάψυξης (90% v/v FBS, 10% v/v DMSO) και τοποθετούνται σε ειδικά αποστειρωμένα φιαλίδια ανθεκτικά σε χαμηλές θερμοκρασίες (cryovials). Ακολουθεί η διαδοχική ψύξη των κυττάρων για 1 ώρα στους 4 °C, 1 ώρα στους -20 °C, 16 ώρες στους -80 °C και φύλαξη στο υγρό άζωτο (-196 °C).

Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται από το υγρό άζωτο απευθείας στους 37 °C, ώστε η απόψυξη των σχηματιζόμενων κρυστάλλων να «τραυματίσει» όσο το δυνατόν λιγότερο τα κύτταρα. Τα φιαλίδια όπου φυλάσσονται τα κύτταρα μεταφέρονται γρήγορα από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37 °C και φυγοκεντρούνται στις 1200 rpm για 10 min. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος κατάψυξης, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται σε φλάσκα καλλιέργειας των 25 cm².

3.1.5 Κυτταρική καλλιέργεια παρουσία παραγόντων

Τα κύτταρα MG63 (3x10⁵) καλλιιεργήθηκαν σε πλάκες 6 φρεατίων για 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά το πέρας του χρόνου καλλιέργειας, τα φρεάτια εκπλύθηκαν τρεις φορές με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και στη συνέχεια τα κύτταρα συγχρονίστηκαν με καλλιέργεια για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού (starvation). Στην συνέχεια, τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν για 6-48 ώρες ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες, σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού και παρουσία των διαφόρων παραγόντων στις συγκεντρώσεις όπως αναλυτικά αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Μετά το πέρας του χρόνου καλλιέργειας ακολουθούσε συλλογή των υπερκειμένων της καλλιέργειας και λύση των κυττάρων

MG63 για περαιτέρω πειραματική χρήση. Στις πειραματικές διαδικασίες που ακολούθησαν, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού και παραγόντων αποτέλεσαν τα κύτταρα ελέγχου.

3.1.6 Καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες μετα-μεταγραφικής γονιδιακής αποσιώπησης

Η γονιδιακή αποσιώπηση σε μεταγραφικό επίπεδο βασίζεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης και χημικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικιτινίλωση. Εντούτοις, είναι δυνατό να συμβεί μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση, δηλαδή γονίδια να είναι σε σίγηση ενώ είναι μεταγραφικά ενεργά. Πιστεύεται ότι η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση εξυπηρετεί στην προστασία των κυττάρων από τους ιούς και τα μεταθετά στοιχεία και ότι πρόκειται για πρώιμους αντικικούς μηχανισμούς ανοσίας που παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση, την εξελικτική βιολογία και τη διατήρηση του γονιδιώματος. Όμως, η ανωτέρω μεθοδολογία χρησιμοποιείται πλέον ερευνητικά με σκοπό τον προσδιορισμό και τη μελέτη της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων.

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές με τις οποίες μπορεί να συμβεί γονιδιακή αποσιώπηση. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία του αντικωδικού RNA (antisense RNA, asRNA) που βασίζεται στο ότι το asRNA υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό του mRNA, με αποτέλεσμα να οδηγεί στην αναστολή της μετάφρασής του. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι η καταστολή του mRNA επιτυγχάνεται είτε με κωδικό RNA (sense RNA) είτε με αντικωδικό RNA (anti-sense RNA) και μάλιστα είναι μεγαλύτερη, όταν οι δύο αλυσίδες χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα. Η παραπάνω παρατήρηση οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνικής του επεμβατικού RNA ή RNA interference ή RNAi (Fire et al. 1998). Το 2006 οι Fire και Mello βραβεύτηκαν με το Νόμπελ Ιατρικής για την ανακάλυψη και την έρευνα στο μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης RNAi.

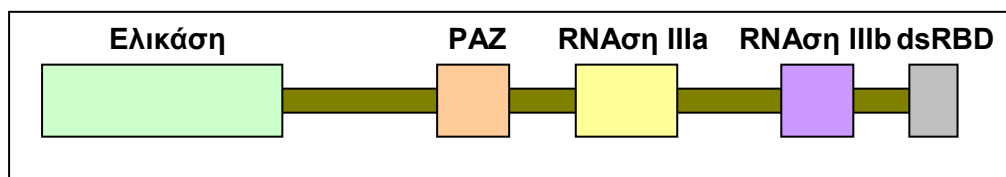
Η απομόνωση του RNA που προκαλεί τη γονιδιακή αποσιώπηση στα φυτά απέδειξε ότι πρόκειται για μία ομάδα μικρών μορίων RNA με μέγεθος 21-23 νουκλεοτίδια, καθώς τα μικρά αυτά μόρια RNA ανιχνεύονταν αποκλειστικά στα φυτά όπου συνέβαινε μετα-μεταγραφική σίγηση. Αντίθετα στα φυτά στα οποία δε συνέβαινε γονιδιακή αποσιώπηση δεν ανιχνεύονταν τα μικρού μεγέθους μόρια RNA

και το mRNA του γονιδίου-στόχος παρέμενε ακέραιο (Hamilton and Baulcombe 1999). Τα δίκλωνα μόρια RNA με μέγεθος 21-23 νουκλεοτίδια μπορούσαν να επιτύχουν αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου με μεγάλη ειδικευση, έτσι, ώστε οι μελέτες έχουν επεκταθεί σε διάφορα είδη κυττάρων όχι μόνο για ερευνητικούς σκοπούς ενώ πιστεύεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθούν και για θεραπευτικούς σκοπούς.

Ο μηχανισμός της γονιδιακής αποσιώπησης βασίζεται σε μία ομάδα μορίων RNA μεγέθους 21-25 ζευγών βάσεων που είναι απαραίτητα για την αποσιώπηση του μορίου mRNA που αποτελεί στόχο και ονομάζονται μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (short interfering RNA, siRNA). Η δομή των μορίων είναι χαρακτηριστική, καθώς έχουν μία φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο και δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (Elbashir et al. 2001). *In vivo*, τα μόρια siRNA προέρχονται από μεγάλα δίκλωνα μόρια RNA με κατανάλωση ATP. Ειδικά στη Δροσόφylla τα μόρια siRNA προέρχονται από τη δράση της DICER ενός ενζύμου που ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών (RNAσων) τύπου III, οι οποίες έχουν ειδικότητα για το dsRNA (Bernstein et al. 2001). Το ένζυμο DICER αποικοδομεί το dsRNA αφήνοντας μια φωσφορική ομάδα στο 5'-άκρο, μία υδροξυλομάδα στο 3'-άκρο και δύο ή τρία χαρακτηριστικά προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3'-άκρο. Το ίδιο ένζυμο (DICER) δημιουργεί τα miRNA που έχουν μήκος περίπου 22 ζευγών βάσεων και προέρχονται από τη διάσπαση μεγαλύτερων μεταγραφημάτων. Τα miRNA προκαλούν αποσιώπηση στην έκφραση του mRNA, καθώς δεσμεύονται στο mRNA-στόχο και δημιουργούν δίκλωνες περιοχές επιδεκτικές στη διάσπαση από ενδονουκλεάσες. Η αποικοδόμηση του mRNA-στόχου παρεμποδίζει και την έκφρασή του.

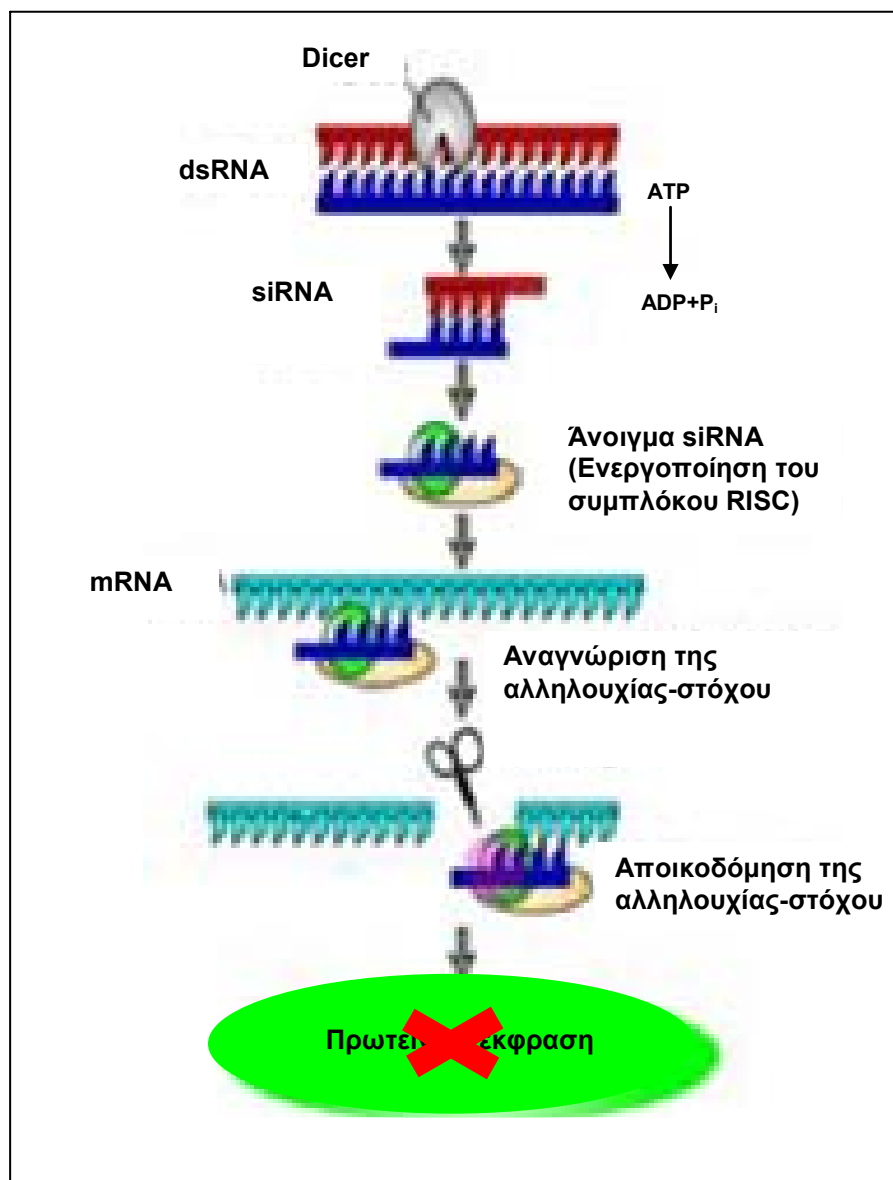
Η πρωτεΐνη DICER έχει χαρακτηριστική δομή που περιλαμβάνει τέσσερις διακριτές επικράτειες: μία επικράτεια ελικάσης στο N-τελικό άκρο, δύο επικράτειες ομόλογες με την RNaseIII των βακτηρίων (RNAση IIIa και RNAση IIIb) που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση του RNA, μία επικράτεια πρόσδεσης και αναγνώρισης του dsRNA, dsRBD (dsRNA binding domain) και μία επικράτεια πρόσδεσης RNA που ονομάζεται PAZ. Η επικράτεια PAZ είναι μεγέθους περίπου 110 αμινοξέων και εντοπίζεται και σε άλλες πρωτεΐνες όπως AGO και PIWI (**Εικόνα 12**). Η DICER έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την AGO-2, που είναι μέλος την οικογένειας των Αργοναυτών (Argonaute proteins, AGO) (Hammond et al.

2001). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις πρωτεΐνες AGO και τέσσερις πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τις AGO, οι PIWI.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης DICER (Macrae et al. 2006).

Σχετικά με τον μηχανισμό σχηματισμού και δράσης των siRNA διευκρινίστηκε από τους Nykanen και συν. Στο πρώτο στάδιο με τη δράση της DICER σχηματίζονται τα siRNA μετά από πέψη του dsRNA και κατανάλωση ATP. Στο δεύτερο στάδιο τα τμήματα siRNA αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και συμμετέχουν στη δημιουργία και ενεργοποίηση του επαγόμενου από RNA συμπλόκου αποσιώπησης (RNA-Induced Silencing Complex, RISC) μεγέθους 360 kDa. Η αρχική μορφή του συμπλόκου RISC περιλαμβάνει τα τμήματα siRNA καθώς και πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων την R2D2, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο dsRNA και τη DICER-2 (Tomari et al. 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι απαραίτητες για το διαχωρισμό των αλυσίδων του RNA. Στο τρίτο στάδιο το σύμπλοκο RISC ενεργοποιείται και γίνεται διαχωρισμός των δύο αλυσίδων siRNA με τη δράση ελικάσης και κατανάλωση ATP. Με το άνοιγμα των δύο αλυσίδων siRNA, απομακρύνεται το ετεροδιμερές R2D2-DICER-2 από το σύμπλοκο και αντικαθίσταται από την πρωτεΐνη AGO-2. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των Αργοναυτών αποτελούν πρωτεΐνες-κορμό του συμπλόκου RISC και συμμετέχουν στον μηχανισμό της κατάλυσης. Τέλος το σύμπλοκο RISC αναγνωρίζει το συμπληρωματικό RNA-στόχος χρησιμοποιώντας ως οδηγό την αλυσίδα των siRNA και το αποικοδομεί χρησιμοποιώντας την ενεργότητα της RNAσης αντίστοιχα. Η ενεργότητα RNAσης οφείλεται στην περιοχή PIWI της AGO-2 και απαιτεί για τη δράση της ιόντα Mg^{2+} (Nykanen et al. 2001; Tijsterman and Plasterk 2004). Το mRNA-στόχος κόβεται σε δύο ανενεργά τμήματα από το ένζυμο SLICER του συμπλόκου RISC, ενώ το σύμπλοκο RISC παραμένει άθικτο προκειμένου να δεσμεύσει νέα συμπληρωματικά μόρια mRNA (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού αποσιώπησης γονιδίων με τη χρήση των αλυσίδων siRNA (Nykanen et al. 2001).

Η τεχνική της αποσιώπησης γονιδίου με τη χρήση των αλυσίδων siRNA χρησιμοποιείται στην έρευνα προκειμένου να επιτύχει καταστολή των ευκαρυωτικών γονιδίων. Επίσης χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς προκειμένου να αντιμετωπιστεί η ιική προσβολή και η καρκινική ανάπτυξη. Όμως η τεχνική δεν έχει ευρεία εφαρμογή ακόμη διότι οι αλυσίδες siRNA δεν είναι σταθερές για μεγάλο χρονικό διάστημα και διότι συμβαίνει εισαγωγή της κωδικής αλυσίδας στο σύμπλοκο RISC με αποτέλεσμα αυτό να μην είναι λειτουργικό. Ένα ακόμη σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής είναι ότι η εισαγωγή των dsRNA μπορεί να προκαλέσει την επαγωγή της ιντερφερόνης και να προκαλέσει ευρεία αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης.

Η γονιδιακή αποσιώπηση με τα μόρια siRNA είναι παροδική και διατηρείται για μία κυτταρική γενιά (περίπου 48 ώρες). Γι αυτό το λόγο τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει γονιδιακή αποσιώπηση με τη χρήση siRNA, επεξεργάζονται άμεσα με την κατάλληλη πειραματική διαδικασία.

Για το σχεδιασμό των αλυσίδων siRNA θα πρέπει ο ερευνητής να χρησιμοποιήσει αλυσίδες με τη δομή AA(N₁₉)TT με τη φωσφορική ομάδα στο 5'-άκρο και την υδροξυλομάδα στο 3'-άκρο. Το μήκος των αλυσίδων είναι 21 νουκλεοτίδια και συνήθως περιλαμβάνει περιοχή 50-100 ζεύγη βάσεων καθοδικά του κωδικού έναρξης, ενώ αποφεύγονται οι 5'- και 3'- UTR περιοχές. Το περιεχόμενο των αλυσίδων σε GC είναι συνήθως 30-70% και επίσης θα πρέπει να ληφθούν υπόψη το μήκος και η αλληλουχία των αλυσίδων.

Στη συγκεκριμένη εργασία η γονιδιακή αποσιώπηση με τη χρήση των αλυσίδων siRNA χρησιμοποιήθηκε για τη σίγηση του γονιδίου του TIMP-1 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen (HP GenomeWide siRNA). Για την αποσιώπηση του TIMP-1 επιλέχτηκε η αλληλουχία 5'-TCCCATCTTTCTTCCGGACAA-3' όπως σχεδιάστηκε από την εταιρεία Qiagen. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen 8x10⁵ ή 4x10⁵ κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 12 ή 24 φρεατίων αντίστοιχα με πλήρες θρεπτικό μέσο για 24 ώρες (πληρότητα 50-80%). Στα κύτταρα προστέθηκε 1 μg siRNA της αλληλουχίας αποσιώπησης του TIMP-1 και 1 μg siRNA της αλληλουχίας που δεν προκαλεί αποσιώπηση κάποιου γονιδίου (scrambled siRNA). Η επιμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το κατάλληλο αντιδραστήριο της Qiagen, RNAiFect. Για κάθε 1 μg siRNA χρησιμοποιήθηκαν 6 μl RNAiFect, προκειμένου να σχηματιστούν τα σύμπλοκα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες για ακόμη 24 ώρες. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό, τα φρεάτια πλύθηκαν 3 φορές με υλικό χωρίς FBS και αφέθηκαν στην καλλιέργεια με 300 μl υλικού χωρίς ορό για 24 ώρες προκειμένου να συγχρονιστούν. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με TNF-α 100 ng/ml για ακόμη 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των κυττάρων, ακολούθησε συλλογή των υπερκειμένων της καλλιέργειας και λύση των κυττάρων MG63 για περαιτέρω πειραματική χρήση. Στις πειραματικές διαδικασίες που ακολούθησαν τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με την αλληλουχία που δεν προκαλεί αποσιώπηση οποιοδήποτε γονιδίου αποτέλεσαν τα κύτταρα ελέγχου.

3.2 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων (MTT)

Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MTT που είναι απλή και ταχεία και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 (Mosmann 1983). Το MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide ή βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο είναι μία υδατοδιαλυτή ουσία κίτρινου χρώματος. Το MTT ανάγεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης μη υδατοδιαλυτοί, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η αναγωγή του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη DMSO και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά με μέτρηση στα 570 nm. Η ένταση του μπλε χρώματος αποτελεί μέτρο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

Η μέθοδος MTT έχει το μειονέκτημα ότι γίνεται εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων από την μεταβολική δραστηριότητα, πράγμα που μπορεί να επιφέρει σύγχυση ανάμεσα σε ένα μικρό, έντονα ενεργό κυτταρικό πληθυσμό και σε μεγάλο αριθμό λιγότερο ενεργών κυττάρων.

Για τον υπολογισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων MG63, τα κύτταρα (5000 κύτταρα/φρεάτιο) καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων για 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά τον συγχρονισμό των κυττάρων για 24 ώρες απουσία ορού, το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε τους διάφορους προς μελέτη παράγοντες όπως TNF-α, CHX, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TIMP-1 και αναστολείς των ιντεγκρινών (αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 και εχιστατίνη) στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, όπως αναλυτικά αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Μετά το τέλος της επεξεργασίας των κυττάρων με τους κατάλληλους παράγοντες και την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού προστέθηκε το MTT σε συγκέντρωση 0.5 mg/ml. Τα κύτταρα επώστηκαν με το MTT για 4 h στους 37 °C για το σχηματισμό των κρυστάλλων φορμαζάνης. Μετά τον έλεγχο για το σχηματισμό των κρυστάλλων στο μικροσκόπιο, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με

ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS). Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO υπό ανάδευση για 30 min. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570 nm με κατάλληλο φασματοφωτόμετρο. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό % επί των κυττάρων αναφοράς.

3.3 Χρώση πυρήνων με DAPI

Ο προσδιορισμός των αποπτωτικών κυττάρων βασίζεται σε βασικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του φαινομένου της απόπτωσης. Τα κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση του κυττάρου και η εμφάνιση στην κυτταρική επιφάνεια των μεμβρανικών κύστεων και της φωσφατιδυλοσερίνης. Επιπλέον ο πυρήνας του αποπτωτικού κυττάρου διασπάται και στο εσωτερικό του συμβαίνει συμπύκνωση της χρωματίνης και θραύση του DNA με την παραγωγή θραυσμάτων DNA μεγέθους 180 bp, ενώ παράλληλα ο πυρηνίσκος φαίνεται κοκκιώδης και η πυρηνική μεμβράνη συσπειρώνεται (Enari et al. 1998). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του πυρήνα του αποπτωτικού κυττάρου μπορεί να παρατηρηθούν εύκολα με χρώση του πυρήνα με κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Οι χρωστικές εισάγονται με μεγαλύτερη ευκολία στα αποπτωτικά κύτταρα και προκαλούν εντονότερη χρώση σε σύγκριση με τα μη αποπτωτικά κύτταρα. Η χρώση του πυρήνα για τη μελέτη της απόπτωσης είναι μία απλή και ταχεία τεχνική που επιτρέπει την παρατήρηση του αποπτωτικού φαινομένου στα κύτταρα με τη χρήση κατάλληλου μικροσκοπίου. Όμως θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χρώση του πυρήνα δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική για τον προσδιορισμό των αποπτωτικών κυττάρων και η μελέτη της απόπτωσης γίνεται με συνδυασμό κι άλλων τεχνικών.

Οι κύριες χρωστικές που βάφουν τον πυρήνα είναι οι 4', 6-διάμινο-2-φαινυλο-διυδροχλωριδική ινδόλη (4', 6-DiAmidine-2-PhenylIndole dihydrochloride, DAPI) και Hoechst 33258. Είναι φθορίζουσες χρωστικές από τις οποίες το DAPI είναι πιο σταθερό στο φως. Το DAPI έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται σε περιοχές πλούσιες σε AT στο δίκλωνο DNA και να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα τα οποία φθορίζουν 20 φορές περισσότερο από ότι το DAPI μόνο του λόγω της απομάκρυνσης των μορίων νερού. Το σύμπλοκο που σχηματίζει το DAPI με το DNA έχει μέγιστο απορρόφησης στα 358 nm και μέγιστο εκπομπής στα 461 nm. Αντίστοιχα το DAPI έχει την ιδιότητα

να δεσμεύεται σε περιοχές πλούσιες σε AU στο RNA και να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με μέγιστο εκπομπής στα 500 nm.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε χρώση των πυρήνων με DAPI, προκειμένου να εντοπιστεί η συρρίκνωση του κυττάρου, η συμπύκνωση και η θραύση της χρωματίνης και του πυρήνα που είναι βασικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση. Ειδικότερα, τα κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε πλάκες 24 φρεατίων όπου προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί καλυπτρίδες (13 mm) αποστειρωμένες με UV ακτινοβολία. Μετά το πέρας του χρόνου καλλιέργειας, τα φρεάτια εκπλύθηκαν τρεις φορές με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες ακόμη με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα απουσία ορού με θρεπτικό υλικό που περιείχε CHX (5 µg/ml), TNF-α (100 ng/ml) ή προεπώαση με CHX πριν την επεξεργασία με TNF-α. Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας τα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα PBS και μονιμοποιήθηκαν με το διάλυμα μονιμοποίησης για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η βαφή με το διάλυμα DAPI για 10 min στο σκοτάδι και οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα PBS. Κατόπιν, οι καλυπτρίδες σκουπίστηκαν προσεκτικά με διηθητικό χαρτί και στερεώθηκαν με το κατάλληλο διάλυμα υποστήριξης VECTASHIELD. Η παρατήρηση των δειγμάτων ήταν άμεση, αν και οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις καλυπτρίδες μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C στο σκοτάδι χωρίς να μειωθεί σημαντικά ο φθορισμός τους.

Διαλύματα

διάλυμα χρώσης

0.5 µg DAPI / ml PBS

διάλυμα μονιμοποίησης

4% φορμαλδεϋδη σε PBS

3.4 Απομόνωση πρωτεϊνών

3.4.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα

Η εκχύλιση των πρωτεϊνών από τα κύτταρα συμβαίνει με τη δομική καταστροφή της μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. Η λύση των κυττάρων και η απομόνωση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει είτε με τη μηχανική καταστροφή των κυττάρων είτε με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που απομονώνονται θα πρέπει να έχουν διατηρήσει την ανοσοδραστικότητά τους και να μην έχουν υποστεί αποικοδόμηση. Επειδή η μηχανική καταστροφή των κυττάρων μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών πρωτεασών και επομένως αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, επιλέγεται η χρήση κατάλληλων διαλυμάτων λύσης των κυττάρων. Η επιλογή των διαλυμάτων λύσης παίζει σημαντικό ρόλο και κυρίως έχει σημασία το pH, η ιονική ισχύς του διαλύματος, το είδος και η συγκέντρωση του απορρυπαντικού, καθώς επίσης η παρουσία δισθενών κατιόντων και αναστολέων πρωτεασών. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν οι πειραματικές συνθήκες, οπότε θα πρέπει να διατηρείται χαμηλή θερμοκρασία (4 °C), ώστε να μειωθεί η δραστηριότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων.

3.4.1.1 Απομόνωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα MG63 επιλέχτηκε το διάλυμα TNE το οποίο περιείχε επιπλέον το απορρυπαντικό TritonX-100 και μίγμα αναστολέων ευρείας εξειδίκευσης, όπως πεπστατίνη, λευπεπτίνη και απροτινίνη. Ειδικά για την απομόνωση των φωσφορυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών επιλέχτηκε κατάλληλο διάλυμα λύσης που περιείχε επιπλέον τους αναστολείς των φωσφατασών NaF και NaVO₄.

Για τη λύση των κυττάρων, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με κρύο διάλυμα PBS και επωάζονται με το κατάλληλο διάλυμα λύσης για 1 h στον πάγο. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 13000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στο κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών διατηρείται στους -20 °C, ενώ σε δείγμα από αυτό γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Ενότητα 3.4.2).

3.4.1.2 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με κρύο διάλυμα PBS και επωάζονται με το κατάλληλο διάλυμα λύσης για την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών (διάλυμα A) για 15 min στον πάγο. Στο μίγμα προστίθεται NP-40 και το ελαιώδες φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 10000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται ως το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Στο ίζημα των πυρήνων προστίθεται το κατάλληλο διάλυμα λύσης για την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών (διάλυμα B) και τα δείγματα αναδεύονται για 30 λεπτά στους 4 °C. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 10000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C και τα υπερκείμενα της φυγοκέντρωσης υφίστανται διαπίδυση με το διάλυμα διαπίδυσης για 16 h σε θερμοκρασία 4 °C. Το προϊόν της διαπίδυσης φυλάσσεται στους -80 °C για περαιτέρω χρήση ως το πυρηνικό εκχύλισμα.

3.4.1.3 Απομόνωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών γίνεται συλλογή του μέσου καλλιέργειας των κυττάρων στους 4 °C και προσθήκη κρύου διαλύματος 1 mM Na₂EDTA, pH 8.0, το οποίο αναστέλλει τη δράση των μεταλλοπρωτεασών. Ακολούθως τα υπερκείμενα καλλιέργειας φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 3000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C και τα υπερκείμενα της φυγοκέντρωσης όπου περιέχονται οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διατηρούνται στους -20 °C.

Διαλύματα

ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline, PBS) pH7.4.

136,8mM NaCl
2,68mM KCl
6,46mM Na₂HPO₄
2mM KH₂PO₄

διάλυμα κυτταρικής λύσης για απομόνωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (TNE)

25mM Tris-HCl, pH7.5
150mM NaCl
1mM EDTA
1% TritonX-100
10μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών/10⁶ κύτταρα

διάλυμα κυτταρικής λύσης για απομόνωση φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών

20mM Tris-HCl, pH7.5

150mM NaCl

1mM EDTA, pH8.0

10mM NaF

1mM NaVO₄

1mM PMSF

1% TritonX-100

10μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών/10⁶ κύτταρα

διάλυμα κυτταρικής λύσης για απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών (διάλυμα A)

10mM HEPES, pH7.9

10mM KCl

0.2mM EDTA

0.1mM EGTA

1mM DTT

0.5mM PMSF

10μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών/10⁶ κύτταρα

διάλυμα κυτταρικής λύσης για απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών (διάλυμα B)

20mM HEPES, pH7.9

0.4M NaCl

1mM EDTA

1mM DTT

0.5mM PMSF

0.02% NP-40

10μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών/10⁶ κύτταρα

διάλυμα διαπίδυσης

20mM HEPES, pH7.9

1mM EDTA

1mM DTT

3.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών γίνεται στα κυτταρικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976). Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιεί τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue η οποία προσδένεται σε κατάλοιπα αμινοξέων που φέρουν βασικές πλευρικές ομάδες όπως αργινίνη, ιστιδίνη, λυσίνη ή αρωματικές πλευρικές ομάδες όπως τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη γίνεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών Van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο σε όξινο περιβάλλον σχηματίζει έγχρωμο προϊόν με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Με τη μέθοδο Bradford μπορούν να μετρηθούν 1-100 μg πρωτεΐνης και η

απορρόφηση είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης. Η μέθοδος Bradford είναι απλή, ταχεία και ευαίσθητη και πλεονεκτεί σε σύγκριση με τις μεθόδους Lowry και Biurety διότι παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε έτοιμο αντιδραστήριο (Coomassie Plus Protein Assay Reagent) και το πρωτόκολλο με ευαισθησία ανίχνευσης από 1-25 μg πρωτεΐνης (Micro Protocol). Τα δείγματα από τα κυτταρικά εκχυλίσματα αραιώθηκαν σε 1 ml H_2O και 1 ml της έτοιμης χρωστικής οπότε σχηματίζονταν τα έγχρωμα σύμπλοκα πρωτεΐνης-χρωστικής. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 1 ml της έτοιμης χρωστικής αραιωμένο σε 1 ml H_2O . Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησής τους στα 595 nm και με αντιπαράθεση σε πρότυπη καμπύλη απορρόφησης σταθερών συγκεντρώσεων αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumine, BSA). Η BSA ήταν διαλυμένη σε διάλυμα ίδιας σύστασης με το διάλυμα των άγνωστων δειγμάτων. Οι ακριβείς τιμές της απορρόφησης επηρεάζονται από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή των διαλυμάτων έως τη στιγμή της μέτρησης.

3.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών

3.5.1 Ανοσοεντοπισμός

Η παραπάνω μέθοδος ανάλυσης των πρωτεϊνών εκτελείται σε τρία στάδια, που περιλαμβάνουν το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ενός μίγματος με ηλεκτροφόρηση, τη μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και τον εντοπισμό των πρωτεϊνών με τη βοήθεια ειδικών σηματοδοτούμενων αντισωμάτων.

3.5.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι η μετανάστευση ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων ή ιόντων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα βιολογικά μόρια όπως αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα μπορούν να μετακινηθούν είτε προς την άνοδο είτε προς την κάθοδο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και να διαχωριστούν.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι μία μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους. Ο διαχωρισμός γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου/N,N-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου (N,N- methylene bis-acrylamide), όπου αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του N,N'-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου και σχηματίζουν πόρους κατάλληλου μεγέθους. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του δισακρυλαμιδίου και μπορεί να είναι 3-30%. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου καθορίζει το μέσο μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς και το bis καθορίζει την έκταση του σχηματισμού των γεφυρών (cross-links). Έτσι και τα δύο παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικών ιδιοτήτων του πηκτώματος όπως η πυκνότητα, η ελαστικότητα, η μηχανική αντοχή και το μέγεθος των πόρων. Για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου προστίθεται υπερθεϊκό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS), το οποίο παρέχει ελεύθερες ρίζες και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (N,N,N',N'-TEtraMethylEthyleneDiamine, TEMED) που δρα ως καταλύτης της αντίδρασης. Το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές. Στη δεύτερη περίπτωση, που είναι η συνήθης, το πήκτωμα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) με μεγάλο μέγεθος πόρων και το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving/separating gel) με κατάλληλο μέγεθος πόρων. Τα δείγματα των πρωτεϊνών αναδιαλύονται σε κατάλληλο διάλυμα που περιέχει χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης προκειμένου να είναι ευδιάκριτες οι πρωτεΐνες και στη συνέχεια εισάγονται στο πήκτωμα επιστοίβαξης με το διάλυμα φόρτωσης που περιέχει γλυκερόλη, προκειμένου να τοποθετηθούν εύκολα. Τα δείγματα των πρωτεϊνών συμπίεζονται στο πήκτωμα επιστοίβαξης υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και εισάγονται ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού όπου διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS), το οποίο είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό. Το αρνητικά φορτισμένο SDS προσδένεται στις αποδιαταγμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε αναλογία μάζας 1,4:1 (1,4 gr SDS ανα gr πρωτεΐνης) και τους προσδίδει ισχυρό αρνητικό φορτίο. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών παραγόντων όπως β-μερκαπτοαιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλης (Dithiothreitol, DTT) έχουν ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη θέρμανση των πρωτεϊνικών

δειγμάτων για 5 min στους 100 °C, παρουσία όλων των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων. Οι ισχυρά αρνητικά φορτισμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες κινούνται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου προς την κάθοδο με διαφορετική κινητικότητα που εξαρτάται από το μέγεθός τους και οι πρωτεΐνες μικρού μεγέθους κινούνται ταχύτερα από τις πρωτεΐνες μεγαλύτερου μεγέθους.

Τέλος, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος μιας άγνωστης πρωτεΐνης, αν ηλεκτροφορηθεί μαζί με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους διαχωρίζονται με την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και από το διάγραμμα της συνάρτησης $\log MB=f(Rf)$, όπου Rf είναι ο λόγος της απόστασης που έχει διανύσει η πρωτεΐνη προς την ολική απόσταση που έχει διανύσει το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης, μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος της άγνωστης πρωτεΐνης. Έτσι, αν μία πρωτεΐνη άγνωστου μοριακού βάρους ηλεκτροφορηθεί παρουσία δύο ή περισσότερων άλλων πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, τότε μπορούμε να υπολογίσουμε το δικό της με σφάλμα 5-10%.

Στην παρούσα εργασία η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης όπου σχηματίζεται ασυνεχές πήκτωμα ανάμεσα σε γυάλινες πλάκες, καθαρισμένες με αιθανόλη. Το πήκτωμα διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν σύστασης 7.5%, 10%, 12% ή 15%, ανάλογα με το μέγεθος της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού τοποθετήθηκε στην επιφάνειά του νερό προκειμένου να σχηματιστεί ομοιόμορφα και να ευθυγραμμιστεί. Μετά τον πολυμερισμό το νερό αφαιρέθηκε και προστέθηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης, στο οποίο τοποθετήθηκε κατάλληλο εργαλείο που σχηματίζει τα φρεάτια όπου εισάγονται τα πρωτεϊνικά δείγματα. Σε κάθε διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν ισόποσα πρωτεϊνικά δείγματα από κυτταρικά εκχυλίσματα ή υπερκείμενα μέσων καλλιέργειας τα οποία είχαν επεξεργαστεί με διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Παράλληλα με τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε στο ίδιο πήκτωμα μίγμα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστών μοριακών βαρών και ποσότητας προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του μεγέθους της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστών μοριακών βαρών:

- β-γαλακτοσιδάση (116 kDa)
- Αλβουμίνης βόειου ορού (86 kDa)
- Οβαλβουμίνη (47 kDa)

- Καρβονική ανυδράση (34 kDa)
- β-λακτοσφαιρίνη (26 kDa)
- Λυσοζύμη (19 kDa)

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού «Molecular Cloning» που βασίζεται σε τροποποιήσεις δημοσιευμένων πρωτοκόλλων (Laemmli 1970) σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε σταθερή τάση 80 Volts όσο τα δείγματα βρίσκονταν στο πήκτωμα επιστοίβαξης και 150 Volts όταν εισάγονταν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Ο τερματισμός της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από την υπό εξέταση πρωτεΐνη και ρυθμίζεται με τη βοήθεια της χρωστικής.

3.5.1.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα του ακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου και οι πρωτεΐνες μεταφέρονται και αποτυπώνονται στη μεμβράνη όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης. Η μεμβράνη πλεονεκτεί διότι είναι απλή στο χειρισμό και διότι τα μόρια των πρωτεϊνών βρίσκονται στην επιφάνειά της οπότε είναι εύκολο να επεξεργαστούν με κατάλληλα διαλύματα, σε αντίθεση με το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης όπου οι πρωτεΐνες βρίσκονται μέσα στο πλέγμα του πολυακρυλαμιδίου. Συνήθως χρησιμοποιούνται μεμβράνες νιτροκυτταρίνης που είναι υδρόφιλες και επιτρέπουν την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών, αν και μπορεί να χρησιμοποιηθούν και υδρόφοβες μεμβράνες. Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στις μεμβράνες ισχυρά κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η μέθοδος της μεταφοράς των πρωτεϊνών και ακινητοποίησής τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επιτρέπει την ανίχνευσή τους με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (Towbin et al. 1979). Οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες διατηρούν όλες τους τις ιδιότητες, με αποτέλεσμα, όταν επωαστούν με ειδικά αντισώματα που τις αναγνωρίζουν δημιουργούνται ανοσοσύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος που επιτρέπουν τον εντοπισμό των πρωτεϊνών με τη χρήση ιχνηθετών. Οι ιχνηθέτες μπορεί να είναι ραδιενεργοί (^{131}I) ή ενζυμικοί (υπεροξειδάση). Η μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιείται με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Προηγουμένως, το πήκτωμα επωάζεται για 10 λεπτά σε κατάλληλο διάλυμα

μεταφοράς το οποίο περιέχει μεθανόλη, οπότε απομακρύνεται το SDS από το πήκτωμα και αυξάνεται η ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς είναι αρκετά αλκαλικό ~8.3, έτσι, ώστε οι πρωτεΐνες να είναι αρνητικά φορτισμένες και να μετακινούνται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου προς την κάθοδο όπου έχει τοποθετηθεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους εργαστηριακούς οδηγούς της Amersham και της BioRad που δίνονται συμπληρωματικά με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς αντίστοιχα, και βασίζονται σε τροποποιήσεις ήδη δημοσιευμένων πρωτοκόλλων (Towbin et al. 1979). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα διαχωρισμού, χαρτιά Whatman στο μέγεθος του πηκτώματος διαχωρισμού, τα σφουγγαράκια της συσκευής και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν για 10 λεπτά στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Ακολούθως τοποθετήθηκαν ανάμεσα στα σφουγγαράκια στη συσκευή μεταφοράς από την άνοδο προς την κάθοδο ως εξής: χαρτί Whatman, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πήκτωμα διαχωρισμού, χαρτί Whatman. Για την ηλεκτρομεταφορά εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 390 mA για 90 min στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα αντισώματα και το σύστημα της χημειοφωταύγειας.

3.5.1.3 Εντοπισμός των πρωτεϊνών με χρήση χημειοφωταύγειας

Ο εντοπισμός της υπό εξέταση πρωτεΐνης γίνεται ανοσολογικά με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Η τεχνολογία παρασκευής αντισωμάτων επιτρέπει την ανίχνευση παρόμοιων δομικά πρωτεϊνών όπως πρωτεΐνες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια ή πρωτεΐνες που διαφέρουν στη φωσφορυλίωση ενός ή περισσότερων αμινοξέων. Ο εντοπισμός της υπό εξέταση πρωτεΐνης γίνεται έμμεσα με τη χρήση κατάλληλου πρωτογενούς αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύεται ειδικά σε συγκεκριμένο επίτοπο της πρωτεΐνης-αντιγόνου και δευτερογενούς μονοκλωνικού αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στη σταθερή περιοχή Fc του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού (HorseRadish Peroxidase, HRP) προκειμένου να ανιχνευτεί η υπό εξέταση πρωτεΐνη. Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-

αντισώματος βασίζεται στην αρχή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο αντιγόνου-πρώτου αντισώματος-δεύτερου αντισώματος προστίθεται το αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας το οποίο αποτελείται από H_2O_2 και λουμινόλη, σε αναλογία 1:1. Κατά την αντίδραση χημειοφωταύγειας η HRP οξειδώνεται παρουσία H_2O_2 και η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου αντιδρά με το υπόστρωμά της τη λουμινόλη και προκαλεί την οξείδωση της λουμινόλης και ταυτόχρονη παραγωγή φωτός με εκπομπή φωτονίων. Η παραγωγή φωτός αποτυπώνεται σαν μαύρη ζώνη σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και η θέση όπου εμφανίζεται η μαύρη ζώνη στο φιλμ αντιστοιχεί στη θέση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισωμάτων στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Επιπλέον η πυκνότητά της ζώνης εξαρτάται από την πυκνότητα της πρωτεΐνης-αντιγόνου και επομένως, επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό εξέταση πρωτεΐνης στην περίπτωση που, ενώ αναλύονται ισόποσα δείγματα ολικής πρωτεΐνης, εμφανίζεται μεταβολή στην πυκνότητας της ζώνης της υπό εξέταση πρωτεΐνης (Thorpe et al. 1985). Εναλλακτικά, ο εντοπισμός του συμπλόκου αντιγόνου-αντισωμάτων μπορεί να γίνει με την προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης παρουσία χρωμογόνου, το οποίο ανάγεται και παράγει έγχρωμο προϊόν που κατακρημνίζεται στις θέσεις όπου βρίσκεται το σύμπλοκο. Ως χρωμογόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (3,3'-DiAminoBenzidine, DAB).

Ο ανοσοεντοπισμός της υπό εξέταση πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με βάση την αρχή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας και σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού της Pierce που δίνεται συμπληρωματικά με τη σειρά έτοιμων αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τα φίλτρα επώστηκαν σε διάλυμα κορεσμού για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να κορεστούν οι ελεύθερες θέσεις και να εμποδιστεί η μη ειδική δέσμευση στη μεμβράνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα που περιείχε το αντίσωμα έναντι της υπό εξέταση πρωτεΐνης σε κατάλληλη αραιώση. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα πραγματοποιήθηκε για 16 h στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση και μετά γίνονταν τρεις εκπλύσεις για 15 min, 5 min και 5 min. Ακολουθούσε επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα που περιείχε το δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με την HRP για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και μετά γίνονταν τρεις εκπλύσεις για 15 λεπτά, 5 λεπτά και 5 λεπτά. Για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών στο φιλμ

αυτοραδιογραφίας η μεμβράνη επώαστηκε με το μίγμα έτοιμων αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας που περιέχουν H_2O_2 και λουμινόλη για 5 min. Η έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας εντός κατάλληλης κασέτας αποτυπώνει την παραγωγή φωτονίων, οπότε επιτρέπει την ανίχνευση της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Ο χρόνος έκθεσης στο φιλμ εξαρτάται από την ένταση της ζώνης του συμπλόκου και καθορίζεται από τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στο σύστημα και από την συγγένεια που παρουσιάζει το πρώτο αντίσωμα για την πρωτεΐνη. Στη συνέχεια για την εμφάνιση του φιλμ και τη σταθεροποίηση του σήματος, το φιλμ επωαζόταν σε διάλυμα εμφανιστή και σε διάλυμα στερεωτή.

Προκειμένου να διερευνηθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων μετά την πρώτη εμφάνιση του φιλμ, η μεμβράνη επωαζόταν με έτοιμο αντιδραστήριο απομάκρυνσης αντισωμάτων (Reblot buffer) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει τα αντισώματα αλλά όχι τις πρωτεΐνες που είναι ακινητοποιημένες στη μεμβράνη και επιτρέπει την επαναχρησιμοποίησή της. Ακολούθως η μεμβράνη επωαζόταν με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης με την ίδια διαδικασία - όπως περιγράφηκε προηγουμένως - ξεκινώντας από το στάδιο του κορεσμού. Η τουμπουλίνη είναι μία πρωτεΐνη της οποίας η ποσότητα θεωρείται ότι δε μεταβάλλεται στις υπό μελέτη πειραματικές συνθήκες. Η ποσότητα της τουμπουλίνης που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της ποσότητας της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα δείγματα.

Διαλύματα

πήκτωμα επιστοίβαξης 5% (stacking gel)

0.125M Tris-HCl pH6.8
5% w/v Acrylamide/Bis-acrylamide
1% APS
0.1% SDS
0.1% TEMED

πήκτωμα διαχωρισμού 10% (resolving/separating gel)

0.375M Tris-HCl pH8.8
10% w/v Acrylamide/Bis-acrylamide
0.1% SDS
0.1% APS
0.04% TEMED

διάλυμα φόρτωσης

50mM Tris-HCl pH6.8
2% (w/v) SDS
0.1% (w/v) Bromophenol Blue
10% (v/v) Glycerol
± 5% β-μερκαπτοαιθανόλη

ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

250mM Tris-HCl pH 8.3
192mM γλυκίνη
0.1 %w/v SDS

ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς

25mM Tris pH8.3
192mM γλυκίνη
20 % (v/v) μεθανόλη

ρυθμιστικό διάλυμα TBS

20mM Tris-HCl pH7.6
137mM NaCl

διάλυμα κορεσμού

TBS pH7.6
5% άπαχο γάλα
0.1% Tween-20

διάλυμα πλύσης

TBS pH7.6
0.1% Tween-20

διάλυμα επώασης

TBS, pH7.6
5% άπαχο γάλα

3.5.2 Ανοσοκατακρήμνιση

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη ανοσοχημική μέθοδος που ανιχνεύει πολύ χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών, αφού προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσής τους έως 10.000 φορές. Έτσι χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μικρής ποσότητας μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης (~100 pg). Ακόμη μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη πιθανών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών.

Στην ανοσοκατακρήμνιση το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που απομονώνεται με το κατάλληλο διάλυμα λύσης από τα κύτταρα ή από τους ιστούς επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της κατάλληλης πρωτεΐνης και με σφαιρίδια σεφαρόζης τα οποία είναι συζευγμένα με πρωτεΐνη A-, G- ή L- ή δευτερογενές αντίσωμα. Το κύριο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών A, G ή L είναι ότι εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για τη σταθερή περιοχή Fc των αντισωμάτων IgG και έχουν αρκετές θέσεις δέσμησης για τη μεταβλητή περιοχή Fab. Η επιλογή της πρωτεΐνης A, G ή L που συζευγνύεται με τα σφαιρίδια εξαρτάται από το είδος του οργανισμού όπου παράγεται το αντίσωμα και τον ισότυπο του αντισώματος. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη A δεσμεύεται ισχυρά σε IgGs που προέρχονται από κουνέλι, γάτα, άνθρωπο ή χοιρίδια αλλά και IgG_{2a} και IgG_{2b} ποντικού και η πρωτεΐνη G δεσμεύεται ισχυρά σε IgGs βοός, αλόγου, κουνελιού, χοιριδίου, αιγός αλλά και IgG₁ και IgG₂ ποντικού. Κατά συνέπεια σχηματίζονται σταθερά ανοσοσύμπλοκα μεταξύ του αντιγόνου, του αντισώματος και των σφαιριδίων που επιτρέπουν την απομόνωση του αντιγόνου.

Ειδικότερα για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών, η τεχνική βασίζεται στην ακινητοποίηση του συμπλόκου της μίας πρωτεΐνης με το αντίσωμά της στα σφαιρίδια και στη συνέχεια τη δέσμηση της άλλης πρωτεΐνης στο σύμπλοκο αυτό. Αν οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν δημιουργείται σύμπλοκο το οποίο αποδεσμεύεται από τα σφαιρίδια με βρασμό, αναγωγικές ή όξινες συνθήκες. Στη συγκεκριμένη εργασία η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ιντεγκρινικών υπομονάδων που πιθανόν αλληλεπιδρούν με τον TIMP-1. Αναλυτικότερα, υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων από πλάκες 6 φρεατίων σε πληρότητα 80% συλλέχθηκαν στους 4 °C με προσθήκη κρύου διαλύματος 1 mM Na₂EDTA, pH 8.0 και συμπυκνώθηκαν υπό κενό. Παράλληλα τα κύτταρα αφού εκπλύθηκαν με κρύο διάλυμα PBS, λύθηκαν με κρύο διάλυμα TNE που περιείχε 1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών.

Τα σφαιρίδια σεφαρόζης όπου ήταν ακινητοποιημένη η πρωτεΐνη A εκπλύθηκαν με διάλυμα TNE 6 φορές και σε αυτά προστέθηκε το συμπυκνωμένο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας παρουσία αντισώματος έναντι του TIMP-1 ή έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (IgG) σαν αρνητικός μάρτυρας. Το μίγμα αφέθηκε για 16

h στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση ώστε να σχηματιστούν τα ανοσοσύμπλοκα του TIMP-1 με το αντίσωμά του και να ακινητοποιηθούν στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Αντίστοιχα το προϊόν της λύσης επώαστηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης για 1 ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση, προκειμένου να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση στα σφαιρίδια (preclearing). Μετά από έκλουση, το επεξεργασμένο προϊόν της λύσης των κυττάρων επώαστηκε για 2 ώρες στους 4 °C με τα σφαιρίδια σεφαρόζης όπου είχαν προσροφηθεί τα ανοσοσύμπλοκα του TIMP-1. Με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες από τα κυτταρικά εκχυλίσματα που αλληλεπιδρούν με το ακινητοποιημένο ανοσοσύμπλοκο του TIMP-1 και του αντισώματός του δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια της σεφαρόζης. Η έκλουση των ανοσοσυμπλόκων πραγματοποιήθηκε με βρασμό των σφαιριδίων αгарόζης σε διάλυμα Laemmli (2x) και τα ανακτώμενα ανοσοσύμπλοκα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 ή έναντι του αντισώματος IgG ποντικού.

Για την ακινητοποίηση της ιντεγκρίνης ανβ3, τα κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 φρεατίων μέχρι 80% πληρότητα. Ακολούθως τα κύτταρα εκπλύθηκαν με κρύο διάλυμα PBS και λύθηκαν με κρύο διάλυμα TNE που περιείχε 1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών. Τα σφαιρίδια σεφαρόζης όπου ήταν ακινητοποιημένη η πρωτεΐνη A εκπλύθηκαν με διάλυμα TNE 6 φορές και σε αυτά προστέθηκε το προϊόν της κυτταρικής λύσης, που είχε επωαστεί με σφαιρίδια σεφαρόζης για 1 ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση, προκειμένου να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση στα σφαιρίδια (preclearing). Τα επεξεργασμένα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν παρουσία αντισώματος έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 ή έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (IgG) σαν αρνητικός μάρτυρας, για 16 h στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση ώστε να σχηματιστούν τα ανοσοσύμπλοκα της ιντεγκρίνης ανβ3 με το αντίσωμά της και να ακινητοποιηθούν στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Αντίστοιχα τα υπερκείμενα της καλλιέργειας επώαστηκαν για 2 ώρες στους 4 °C με τα σφαιρίδια σεφαρόζης όπου είχαν προσροφηθεί τα ανοσοσύμπλοκα της ιντεγκρίνης ανβ3. Με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες από τα υπερκείμενα καλλιέργειας που αλληλεπιδρούν με το ακινητοποιημένο ανοσοσύμπλοκο της ιντεγκρίνης ανβ3 δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια της σεφαρόζης. Η έκλουση των ανοσοσυμπλόκων πραγματοποιήθηκε με βρασμό των σφαιριδίων σεφαρόζης σε διάλυμα Laemmli (2x) και τα ανακτώμενα ανοσοσύμπλοκα

ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση κατάλληλων πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι του TIMP-1 ή έναντι του αντισώματος IgG κουνελιού.

Διαλύματα

ρυθμιστικό διάλυμα TNE

25 mM Tris-HCl pH 7.6

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % TritonX-100

10 μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών/10⁶ κύτταρα

3.6 Τεχνικές μικροσκοπίας

3.6.1 Φωτονική μικροσκοπία

Η φωτονική μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκε κατά την καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Η τεχνική βασίζεται στη διέλευση ορατού φωτός το οποίο διαπερνά το αντικείμενο παρατήρησης ή ανακλάται από αυτό, μέσα από ένα φακό ή μια σειρά φακών. Τα κυριότερα μέρη ενός φωτονικού μικροσκοπίου διέλευσης είναι ο προσοφθάλμιος φακός ο οποίος φέρει ένα χαραγμένο αριθμό που δείχνει τη μεγέθυνσή και είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του μικροσκοπίου, ο συγκεντρώτης φακός ο οποίος εστιάζει τη φωτεινή πηγή στο επίπεδο του παρασκευάσματος και η περιστρεφόμενη κεφαλή με τους αντικειμενικούς φακούς. Επίσης περιλαμβάνει τον μοχλό ρύθμισης της ίριδας (διαφράγματος) ο οποίος φωτίζει το παρασκεύασμα έτσι που αυτό να δέχεται τις ακτίνες που δεν προέρχονται από περίθλαση ή διάθλαση και ακόμη την τράπεζα όπου τοποθετείται το παρασκεύασμα, κοχλίες εστίασης και τη βάση του μικροσκοπίου με ενσωματωμένο σύστημα φωτισμού.

Το χρώμα των γραμμμάτων του φακού είναι ενδεικτικά του οπτικού τύπου του φακού π.χ. κόκκινα γράμματα συμβολίζουν φακό πολωμένου φωτός και πράσινα γράμματα συμβολίζουν φακό αντίθεσης φάσης. Συνήθως υπάρχουν 3-6 φακοί, το χρώμα των οποίων δείχνει τη μεγέθυνση (**Πίνακας 1**).

Πίνακας 1: Αντιστοιχία μεταξύ μεγέθυνσης και χρώματος του φακού.

<i>Μεγέθυνση</i>	<i>Χρώμα</i>
1-1.25	Μαύρο
1.6-2	Γκρι
2.5-3.2	Καφέ
4-5	Κόκκινο
6.3-8	Πορτοκαλί
10-12.5	Κίτρινο
16-20	Ανοιχτό πράσινο
25-32	Σκούρο πράσινο
40-50	Ανοιχτό μπλε
63-80	Σκούρο μπλε
100	Άσπρο

Το φωτονικό μικροσκόπιο επιτρέπει μεγέθυνση εκατοντάδων φορές. Το μειονέκτημα της φωτονικής μικροσκοπίας είναι η περιορισμένη διακριτική ικανότητα η οποία εκφράζει την ελάχιστη απόσταση που πρέπει να έχουν δύο σημεία έτσι, ώστε τα είδωλά τους να γίνονται αντιληπτά ως δύο ανεξάρτητα σημεία. Η ελάχιστη λεπτομέρεια που μπορεί να διακριθεί είναι περίπου 200 nm και οφείλεται στην κυματική φύση του ορατού φωτός. Επίσης μειονεκτεί διότι τα βιολογικά υλικά, όπως βιομόρια και κυτταρικά συστατικά είναι διαφανή στο ορατό φάσμα και οι αντιθέσεις των παρατηρούμενων αντικειμένων είναι μικρές. Για την παρατήρηση των συστατικών αυτών απαιτούνται ειδικές χρωστικές που εισάγονται τεχνητά στο βιολογικό δείγμα.

Η τροποποίηση του φωτονικού μικροσκοπίου είναι το μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων με το οποίο μπορούν να παρατηρηθούν βιολογικά υλικά, χωρίς να απαιτείται η εισαγωγή χρωστικής. Η λειτουργία του μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων βασίζεται στην ιδιότητα της ύλης να ελαττώνει την ταχύτητα του φωτός και να αλλάζει τη φάση των ακτίνων που περνούν μέσα από αυτήν, ως αποτέλεσμα της διαφοράς του δείκτη διάθλασης. Σε σχέση με άλλη ακτίνα που τρέχει τον ίδιο δρόμο χωρίς να περνά από το υλικό αυτό αποκτά διαφορά φάσης. Η διαφοράς φάσης του φωτός (αόρατη στο μάτι) που συμβαίνει όταν αυτό περνά από τις κυτταρικές δομές μετατρέπεται σε

διαφορά έντασης του φωτός (ορατή στο μάτι) με το φαινόμενο της συμβολής. Το σύνολο των ακτίνων οδηγείται σε συμβολή με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ειδώλου που κάθε σημείο του εμφανίζεται φωτεινότερο ή σκοτεινότερο ανάλογα με το δείκτη διάθλασης της παρατηρούμενης περιοχής. Αν η αντίθεση είναι θετική, το αντικείμενο φαίνεται φωτεινό σε σκοτεινό πεδίο, ενώ, αν η αντίθεση είναι αρνητική, το αντικείμενο φαίνεται σκοτεινό σε φωτεινό πεδίο.

3.6.2 Μικροσκοπία φθορισμού

Ο φθορισμός είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο πολλών ουσιών (βιολογικών και μη) και για να εκδηλωθεί πρέπει το μόριο να φωτισθεί με ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος. Οι φθορίζουσες ουσίες απορροφούν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος και εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος. Επομένως οι φθορίζουσες ουσίες μπορεί να διεγερθούν με μια ακτινοβολία της περιοχής του υπεριώδους που είναι αόρατη και να παραχθεί μία ακτινοβολία που εμπίπτει στην ορατή περιοχή του φάσματος. Οι φθορίζουσες ουσίες διακρίνονται σε αυτοφθορίζουσες (χλωροφύλλη) και φθορίζουσες χρωστικές. Η μικροσκοπία φθορισμού βασίζεται στην εισαγωγή στο δείγμα κατάλληλης φθορίζουσας χρωστικής με μηχανικό ή γενετικό τρόπο, ώστε να επιτρέπει το φθορισμό ορισμένων μόνο περιοχών, ουσιών ή οργανιδίων του δείγματος. Η φθορίζουσα χρωστική έχει την ιδιότητα να απορροφά ακτινοβολία σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και να εκπέμπει σε ένα άλλο. Τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι τα εξής: α. μπορούμε να συνδέσουμε τις φθορίζουσες χρωστικές με συγκεκριμένα μέρη του δείγματός μας και να παρατηρήσουμε μόνο τις πληροφορίες που θέλουμε, χωρίς οπτική παρεμβολή από άλλες κυτταρικές δομές οι οποίες δεν αποτελούν το αντικείμενο της μελέτης, β. μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες χρωστικές, γ. με την αλλαγή του φωτός διέγερσης μπορούμε να αναγκάσουμε έναν τύπο φθορίζουσας ουσίας να φθορίζει και στη συνέχεια έναν άλλο, προκειμένου να διακρίνουμε δύο διαφορετικά μέρη του δείγματός μας.

Το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα κοινό μικροσκόπιο στο οποίο όμως το παρασκεύασμα μπορεί να φωτίζεται εκτός από τον κλασικό τρόπο και με υπεριώδη ακτινοβολία. Για τη μελέτη των φθορίζουσών ουσιών απαιτούνται κατάλληλα φίλτρα και αντικειμενικοί φακοί. Ανάλογα με την τοποθέτηση της πηγής του υπεριώδους φωτός τα μικροσκόπια φθορισμού διακρίνονται σε δύο τύπους, το μικροσκόπιο

φθορισμού διέλευσης και το μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στο μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας η προσπίπτουσα ακτινοβολία οδεύει μέσα από το παρασκεύασμα προς τα κάτω και χάνεται, με αποτέλεσμα να μη συγχέονται η προσπίπτουσα ακτινοβολία και η ακτινοβολία από φθορισμό. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μικροσκοπίας φθορισμού είναι η υψηλή ευαισθησία, καθώς απαιτείται πολύ μικρή συγκέντρωση φθορίζουσας χρωστικής με αποτέλεσμα την προστασία του παρασκευάσματος και ακόμη η εξειδίκευση, η ταχύτητα και η ευκολία στην προετοιμασία των παρασκευασμάτων. Το βασικότερο μειονέκτημα της μικροσκοπίας φθορισμού είναι ότι το δείγμα ακτινοβολείται ολόκληρο από τη δέσμη διέγερσης.

Η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού επιτρέπει τον εντοπισμό της υπό εξέταση πρωτεΐνης που βρίσκεται ακινητοποιημένη σε σταθερό υπόστρωμα με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί ο εντοπισμός της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB. Αναλυτικότερα, κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 φρεατίων όπου προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί καλυπτρίδες (13 mm) αποστειρωμένες με UV ακτινοβολία. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στις καλυπτρίδες και αφού είχε αρχίσει η προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα προστέθηκε το θρεπτικό υλικό σε κάθε φρεάτιο της πλάκας καλλιέργειας. Μετά από 24 ώρες καλλιέργειας τα κύτταρα εκπλύθηκαν με διάλυμα PBS, επώαστηκαν με το διάλυμα μονιμοποίησης για 10 min και κατόπιν με το διάλυμα κορεσμού για 30 λεπτά. Ακολούθως τα κύτταρα επώαστηκαν με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της υπομονάδας p65 του NF-KB (10 µg/ml) σε διάλυμα PBS-1% BSA για 16 h στους 4 °C. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα PBS. Ακολούθως τα κύτταρα επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα AlexaFluor 568 για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (1:500 σε διάλυμα PBS-1% BSA). Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα PBS και επώαση των κυττάρων με διάλυμα DAPI 0.5 µg/ml σε PBS. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία δεν είχαν επωαστεί με το πρωτογενές αντίσωμα, οπότε ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα του αυτοφθορισμού των κυττάρων ή της μη ειδικής δέσμευσης του δεύτερου αντισώματος. Για την παρατήρηση των κυττάρων οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα PBS και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με κατάλληλο διάλυμα υποστήριξης. Οι καλυπτρίδες σκουπίστηκαν προσεκτικά με διηθητικό χαρτί και στερεώθηκαν με το κατάλληλο

διάλυμα υποστήριξης VECTASHIELD. Η παρατήρηση των δειγμάτων ήταν άμεση, αν και οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις καλυπτρίδες μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C στο σκοτάδι χωρίς να μειωθεί σημαντικά ο φθορισμός τους. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στο φωτονικό μικροσκόπιο Zeiss Axiophot Progres CFscan.

3.6.3 Συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία Laser

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού που επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξετάσει πιθανό συνεντοπισμό δύο πρωτεϊνών. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται και επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της υπό εξέταση πρωτεΐνης και μετά με το δευτερογενές αντίσωμα έναντι της σταθερής περιοχής του πρώτου αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με κατάλληλη φθορίζουσα ουσία που επιτρέπει την ανίχνευση του συμπλόκου πρωτεΐνη-πρωτογενές αντίσωμα-δευτερογενές αντίσωμα (Beutner 1961; Coons 1961).

Στην περίπτωση που η τεχνική χρησιμοποιείται για να εξεταστεί η πιθανότητα συνεντοπισμού δύο πρωτεϊνών θα πρέπει τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται να φέρουν διαφορετική φθορίζουσα ουσία, προκειμένου να διακρίνεται ξεχωριστά η καθεμία. Οι φθορίζουσες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η FITC με μέγιστο απορρόφησης στο μπλε (490 nm) και εκπομπής στο πράσινο (520 nm) και η σουλφοροδαμίνη (Texas Red) με μέγιστο απορρόφησης στο κίτρινο (595 nm) και εκπομπής στο κόκκινο (620 nm). Οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να έχουν διαφορετικά μέγιστα απορρόφησης και με την ακτινοβολία εκπομπής γίνεται η απεικόνιση των κυττάρων στα οποία έχει σχηματιστεί το σύμπλοκο πρωτεΐνη-πρωτογενές αντίσωμα-δευτερογενές αντίσωμα. Επιπλέον χρησιμοποιείται μία φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται στο DNA για την παρατήρηση των πυρήνων όπως το DAPI. Η παρατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο φθορισμού και σε συνεστιακό μικροσκόπιο laser.

Η συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία laser αποτελεί εξέλιξη της φωτονικής μικροσκοπίας και επιτρέπει την τρισδιάστατη απεικόνιση κυττάρων και κυτταρικών συστατικών με μεγάλη διακριτική ικανότητα. Αντίθετα με τον κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή

μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος που μπορεί να είναι μικρότερο από 10 μm στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρώτη φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Συγκεκριμένα η δέσμη laser σαρώνει το παρασκεύασμα είτε κινούμενη η ίδια (beam scanning) ή με μετακίνηση του παρασκευάσματος (object scanning), οπότε έχει τη μοναδική δυνατότητα για ανάλυση του βάθους του παρασκευάσματος (οπτική τομή).

Το συνεστιακό μικροσκόπιο laser αποτελείται από ένα υψηλής ποιότητας οπτικό μικροσκόπιο και μία συνεστιακή μονάδα. Η δέσμη laser από τη συνεστιακή μονάδα εισέρχεται στο οπτικό μικροσκόπιο μέσω μιας μικρής οπής εστιάζεται σε ένα μικρό σημείο του φθορίζοντος παρασκευάσματος. Το φως μετά την αλληλεπίδρασή του με το δείγμα, ανακλάται από αυτό και επιστρέφει περνώντας μέσα από μία δεύτερη μικρή οπή για να συλλεχθεί από κατάλληλο φωτοανιχνευτή. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές, αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου.

Οι ακτίνες laser που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η ακτίνα laser αργού, κυρίως τα μήκη κύματος 488 nm και 514 nm όπου διεγείρονται στο μέγιστο η ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη και η ροδαμίνη αντίστοιχα και η ακτίνα laser ηλίου- νέου με μήκος κλυματος 633 nm.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες.

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί ο τυχόν συνεντοπισμός του TIMP-1 με κάποια από τις ιντεγκρίνες. Αναλυτικότερα, κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 φρεατίων όπου προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί καλυπτρίδες (13 mm) αποστειρωμένες με UV ακτινοβολία. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στις καλυπτρίδες και αφού είχε αρχίσει η προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα προστέθηκε το θρεπτικό υλικό σε κάθε φρεάτιο της πλάκας καλλιέργειας. Μετά από 24 ώρες καλλιέργειας τα κύτταρα εκπλύθηκαν με διάλυμα PBS,

επώαστηκαν με το διάλυμα μονιμοποίησης για 10 λεπτά και κατόπιν με το διάλυμα κορεσμού για 30 min. Ακολούθως τα κύτταρα επώαστηκαν με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 (10 µg/ml) σε διάλυμα PBS ή/και με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 (10 µg/ml) σε διάλυμα PBS για 16 h στους 4 °C. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα PBS. Για τον ανοσοεντοπισμό του TIMP-1, τα κύτταρα επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα AlexaFluor 568 (κόκκινη φθορίζουσα χρωστική, ανάλογη της ροδαμίνης) με μέγιστο απορρόφησης στα 578 nm και μέγιστο εκπομπής στα 603 nm για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (1:500). Για τον ανοσοεντοπισμό της ανβ3 επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα AlexaFluor 488 (πράσινη φθορίζουσα χρωστική, ανάλογη της ισοθειοκυανικής φλουρεσκίνης) με μέγιστο απορρόφησης στα 495 nm και μέγιστο εκπομπής στα 519 nm για 1 h σε (1:500). Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα PBS και επώαση των κυττάρων με διάλυμα DAPI 0.5 µg/ml σε PBS. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία είχαν επωαστεί με μη ειδικές ανοσοσφαιρίνες ποντικού ή κουνελιού, οπότε ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα του αυτοφθορισμού των κυττάρων ή της μη ειδικής δέσμευσης των δευτερογενών αντισωμάτων. Για την παρατήρηση των κυττάρων οι καλυπτρίδες εμβapτίστηκαν σε διάλυμα PBS και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με το κατάλληλο διάλυμα υποστήριξης VECTASHIELD. Οι καλυπτρίδες σκουπίστηκαν προσεκτικά με διηθητικό χαρτί και στερεώθηκαν κατάλληλα. Η παρατήρηση των δειγμάτων ήταν άμεση, αν και οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις καλυπτρίδες μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C στο σκοτάδι χωρίς να μειωθεί σημαντικά ο φθορισμός τους. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στο φωτονικό μικροσκόπιο Zeiss AxioPhot και στο συνεστιακό μικροσκόπιο της Bio-Rad (MRC 1024ES) με καθορισμένες ρυθμίσεις (άνοιγμα ίριδας: 2.2, φίλτρο Kalman: 5, Gain: ~1000, Black Level: 4-5) Οι οπτικές τομές X-Y πραγματοποιήθηκαν με βήμα 0.5 µm. Για την επεξεργασία των εικόνων που προέκυψαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Confocal Assistant.

Διαλύματα

διάλυμα κορεσμού

5% άπαχο γάλα/PBS

διάλυμα χρώσης

0.5μg DAPI/ml PBS

διάλυμα μονιμοποίησης

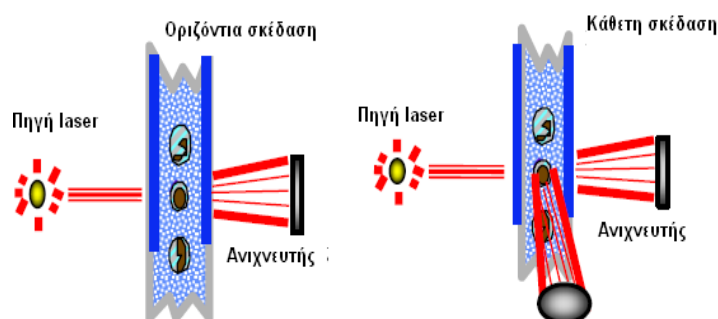
2% φορμαλδεΰδη/PBS (v/v)

3.7 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική που εκμεταλλεύεται τη μέτρηση ορισμένων βιοφυσικών και βιοχημικών παραμέτρων των κυττάρων και επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων όπως κύτταρα, πυρήνες ή χρωμοσώματα και την ανάλυση τους σχετικά με το μέγεθος και τον όγκο ή ακόμη την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, DNA και RNA. Ακόμη μπορεί να μετρηθεί κάθε κυτταρικό συστατικό ή λειτουργία που μπορεί να σημανθεί με φθορίζουσες ουσίες. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που ταξινομεί τα κύτταρα ποιοτικά ή ποσοτικά.

Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τα εξής μέρη: πηγή φωτός (ακτίνα laser Argon-ion), υδραυλικό σύστημα που αναγκάζει τα κύτταρα να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά στην ακτίνα laser, ανιχνευτές φωτός και φθορισμού και μονάδα ηλεκτρονικού υπολογιστή για την επεξεργασία των σημάτων. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, καθώς τα κύτταρα διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο, όπου προσπίπτει μία ακτίνα laser. Συγκεκριμένα το υπό εξέταση υλικό εγχύεται μέσα σε ένα άλλο αδρανές υγρό και στη συνέχεια με υδροδυναμικές ρυθμίσεις επιτυγχάνεται η κίνηση των κυττάρων του ενός πίσω από το άλλο στο κέντρο της ροής. Η διάμετρος του αυλού μειώνεται σταδιακά όσο πλησιάζει προς το σημείο της ανάλυσης. Στο σημείο ανάλυσης ένα-ένα κύτταρο έρχεται σε επαφή με μια ακτίνα που εκπέμπεται από μία πηγή ακτινοβολίας laser. Εντός της κάθε μιας σταγόνας που διέρχεται από το σημείο εστίασης βρίσκεται ένα και μονό κύτταρο και από το σημείο εστίασης διέρχονται περίπου 500 κύτταρα το δευτερόλεπτο. Γι αυτό είναι απαραίτητη προϋπόθεση τα κύτταρα να βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος, προκειμένου να εστιάζονται ένα-ένα στο σημείο της ανάλυσης. Το κύριο χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι βασίζεται σε διαφορετικές μετρήσεις για κάθε κύτταρο και όχι σε μετρήσεις

για το μέσο όρο του πληθυσμού. Κατά την ανάλυση η ακτίνα laser χτυπά μεμονωμένα κύτταρα με αποτέλεσμα τη σκέδαση της ακτίνας, δηλαδή τη διάχυση της ακτίνας προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο μετά τη σύγκρουσή της με το κύτταρο. Το σκεδασμένο φως ανιχνεύεται με ειδικούς ανιχνευτές (βολταϊκές φωτοδιόδους), ώστε αν η φωτοδίοδος βρίσκεται μπροστά από το κύτταρο μετράται το οριζόντια σκεδαζόμενο φως, ενώ αν βρίσκεται κάθετα προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία μετράται το κάθετα σκεδαζόμενο φως. Το οριζόντια σκεδαζόμενο φως δίνει πληροφορίες για τον όγκο (μέγεθος) του κυττάρου, ενώ το κάθετα σκεδαζόμενο φως δίνει πληροφορίες για την υφή του εσωτερικού του κυττάρου και κυρίως για την κοκκίωσή του (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Η φωτοδίοδος επιτρέπει ανάλογα με τη σκέδαση του φωτός να περιγραφεί το μέγεθος και η κοκκίωση του κυττάρου (Διδακτορική Διατριβή Ειρήνης Μάμαλη, 2008).

Η ισχύς της πηγής κυμαίνεται από 0.5 mW-5.0 W, ενώ το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι μεταξύ 400-600 nm. Το μήκος κύματος της δέσμης που εκπέμπουν αυτές οι πηγές παίζει πρωτεύοντα ρόλο, διότι τα κύτταρα πριν αναλυθούν από τον κυτταρομετρητή ροής υφίστανται επεξεργασία με αντισώματα που δεσμεύονται σε χαρακτηριστικά αντιγόνα των κυττάρων και είναι συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες. Άρα το μήκος κύματος της πηγής laser καθορίζει ποιες ουσίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές. Οι συνηθέστερες φθορίζουσες χρωστικές είναι η FITC με πράσινο φθορισμό και η ισοθειοκυανιούχα τετραμέθυλοροδαμίνη (Tetramethyl Rhodamine IsoThioCyanate, TRITC) με κόκκινο φθορισμό. Οι κυτταρομετρητές ροής χρησιμοποιούν ακτινοβολία laser, το μήκος κύματος του οποίου πρέπει να βρίσκεται μέσα στα όρια του φάσματος διέγερσης των φθορίζουσών ουσιών. Όταν χρησιμοποιούνται μαζί τα φάσματα διέγερσης πρέπει να επικαλύπτουν το μήκος κύματος του laser, αλλά τα φάσματα εκπομπής πρέπει να διαφέρουν.

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία ταχεία και αξιόπιστη τεχνική που απαιτεί ελάχιστη παρέμβαση από το χειριστή και γι αυτό χρησιμοποιείται όχι μόνο στη βασική έρευνα αλλά και στην κλινική πράξη. Όμως η κυτταρομετρία ροής έχει ορισμένους περιορισμούς, δηλαδή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετρήσεις με το χρόνο, ούτε μπορεί να γίνει επανάληψη των μετρήσεων στο ίδιο δείγμα, διότι τα κύτταρα μπορούν να μετρηθούν μόνο μία φορά. Ακόμη σε μετρήσεις φθορισμού παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ένταση του φθορισμού, αλλά όχι σχετικά με τον εντοπισμό των φθορίζουσών χρωστικών στο κύτταρο. Τέλος, λόγω των επαναλαμβανόμενων εκπλύσεων και φυγοκεντρήσεων συμβαίνει σημαντική απώλεια κυττάρων κατά την επεξεργασία του δείγματος.

Με την κυτταρομετρία ροής μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των παρατηρήσεων που λαμβάνονται με το μικροσκόπιο φθορισμού. Η τεχνική βασίζεται στη μετατροπή της ακτινοβολίας εκπομπής σε ηλεκτρικό σήμα και την ποσοτικοποίησή του σε αυθαίρετες μονάδες μέσης έντασης φθορισμού, ώστε να επιτρέπει τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται η ποιοτική μελέτη οπότε ταξινομούνται τα κύτταρα ανάλογα με το αν εκφράζουν την πρωτεΐνη ή όχι καθώς και η ποσοτική μελέτη οπότε ποσοτικοποιείται η έκφραση της πρωτεΐνης.

3.7.1 Προσδιορισμός της έκφρασης των ιντεγκρινικών υπομονάδων στην επιφάνεια των κυττάρων MG63.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε έμμεση μέθοδος για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των ιντεγκρινών που κυρίως εκφράζει η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά στην κυτταρική επιφάνεια. Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των ιντεγκρινών και με δευτερογενή αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά τα πρώτα αντισώματα και είναι συζευγμένα με τη φθορίζουσα ουσία FITC, η οποία απορροφά στα 490 nm και εκπέμπει στα 520 nm.

Συγκεκριμένα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 6 φρεατίων για 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά το συγχρονισμό για 24 ώρες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα απουσία ορού με θρεπτικό υλικό που περιείχε CHX (5 µg/ml), TNF-α (100 ng/ml) ή προεπώση με CHX πριν την επεξεργασία με TNF-α. Ακολούθως, τα κύτταρα συλλέχτηκαν από τα φρεάτια με το

κατάλληλο εργαλείο (scraper) και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1200 στροφές στους 4 °C. Ακολούθως εκπλύθηκαν για δύο φορές με διάλυμα PBS και τελικά το ίζημα εναιωρήθηκε σε 50 μl διαλύματος κυτταρομετρίας. Στα 50 μl του εναιωρήματος προστέθηκαν 50 μl διαλύματος κυτταρομετρίας, όπου περιέχονταν το κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της κάθε ιντεγκρινικής υπομονάδας σε συγκέντρωση κορεσμού όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

Τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 45 λεπτά για επώαση και ακολούθως τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα κυτταρομετρίας, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος κυτταρομετρίας που περιείχε το δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με FITC, με τελική συγκέντρωση 10 μg/ml. Τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 45 λεπτά και τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα κυτταρομετρίας. Τελικά τα κύτταρα εναιωρήθηκαν σε 1 ml διαλύματος μονιμοποίησης. Ως ομάδα αρνητικού ελέγχου της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό εναιώρημα της ίδιας περιεκτικότητας με το εξεταζόμενο δείγμα το οποίο επώαστηκε μόνο με το δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με FITC. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στον κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur (Becton Dickinson) με τη χρήση του λογισμικού CELL QUEST, όπου ελήφθησαν 6000 μετρήσεις-γεγονότα (κύτταρα).

3.7.2 Προσδιορισμός των θραυσμάτων DNA

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των αποπτωτικών κυττάρων και βασίζεται σε χαρακτηριστικά βιοχημικά και μορφολογικά γνωρίσματά τους. Στα κύτταρα που έχουν οδηγηθεί σε απόπτωση συμβαίνει ενεργοποίηση των ενδονουκλεασών και θραύση του DNA, οπότε η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανιχνεύσει την αποικοδόμηση του DNA και την απελευθέρωση μικρού μοριακού βάρους DNA από το κύτταρο. Τα θραύσματα DNA έχουν μέγεθος μικρότερο από το μέγεθος του DNA της G1 φάσης και ο προσδιορισμός του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων βασίζεται στην ανίχνευση των θραυσμάτων αυτών (υπο-διπλοειδής κορυφή, sub-diploid peak). Η κορυφή αυτή εμφανίζεται πριν την κορυφή που αντιστοιχεί στη G1 φάση.

Η ανάλυση των κυττάρων για το περιεχόμενο του DNA απαιτεί χρώση με κατάλληλη χρωστική γι αυτό τα κύτταρα μονιμοποιούνται ή επεξεργάζονται με κατάλληλο απορρυπαντικό προκειμένου να γίνει η κυτταρική μεμβράνη διαπερατή.

Για τη χρώση του πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική διωδικό 3,8-διάμινο-5-[3-(διαίθυλομέθυ λαμμώνιο)προπυλο]-6-φαινυλοφαινανθρένιο [(3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide, ή Propidium Iodide, PI) η οποία φυσιολογικά είναι αδιαπέραστη από την πλασματική μεμβράνη. Εντούτοις σε νεκρά κύτταρα ή κύτταρα στα τελευταία στάδια της απόπτωσης όπου έχει χαθεί η ακεραιότητα της μεμβράνης η χρωστική PI βάφει το DNA του πυρήνα (Riccardi and Nicoletti 2006). Κατά συνέπεια η ένταση του φθορισμού συνδέεται με τα επίπεδα αποικοδόμησης του DNA.

Το PI δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία των βάσεων με στοιχειομετρία ένα μόριο χρωστικής ανά 4-5 ζεύγη βάσεων. Η δέσμευση του PI στο DNA συνδέεται με την ενίσχυση του φθορισμού 20-30 φορές, ενώ το σύμπλοκο που δημιουργείται εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 535 nm και μέγιστο εκπομπής στα 617 nm. Επειδή το PI έχει την ιδιότητα να προσδένεται και στο RNA του πυρήνα πριν την επεξεργασία με τη χρωστική, γίνεται ενζυμική επεξεργασία με RNAάση, προκειμένου το PI να δεσμευτεί αποκλειστικά στο DNA.

Η επεξεργασία των κυττάρων περιελάμβανε την καλλιέργεια των κυττάρων όπως προηγουμένως περιγράφηκε. Μετά το συγχρονισμό για 24 ώρες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα απουσία ορού με θρεπτικό υλικό που περιείχε CHX (5 µg/ml), TNF-α (100 ng/ml) ή προεπώαση με CHX πριν την επεξεργασία με TNF-α. Ακολούθως, τα κύτταρα συλλέχτηκαν από τα φρεάτια με το κατάλληλο εργαλείο (scraper) και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1200 στροφές στους 4 °C. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με διάλυμα PBS και μονιμοποιήθηκαν με 70% αιθανόλη για 30 λεπτά στους 4 °C. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν άλλες δύο φορές με PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1200 στροφές στους 4 °C. Τέλος επεξεργάστηκαν με το διάλυμα χρώσης του DNA PI για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στον κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur (Becton Dickinson) με τη χρήση του λογισμικού CELL QUEST. Για τον προσδιορισμό των θραυσμάτων DNA με μέγεθος μικρότερο από τη φάση G1 προσδιορίστηκαν 6000 κύτταρα (μετρήσεις-γεγονότα). Ακολούθησε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου όπου εντοπίστηκε το ποσοστό DNA με μέγεθος μικρότερο από το μέγεθος του DNA της G1 φάσης. Η ποσοστιαία αναλογία των θετικών κυττάρων και η μέση ένταση φθορισμού στα θετικά κύτταρα υπολογίστηκε στην περιοχή που

οριοθετείται από τον δείκτη M1, προκειμένου να αφαιρεθεί από τον υπολογισμό η ένταση φθορισμού των κυττάρων αρνητικού ελέγχου.

Διαλύματα

ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline, PBS) pH7.4.

136,8mM NaCl

2,68mM KCl

6,46mM Na₂HPO₄

2mM KH₂PO₄

διάλυμα χρώσης PI

PI (20 µg/ml), RNάση A (200 µg/ml)

3.8 Πυκνομετρική ανάλυση

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης φωτογραφήθηκαν με τη χρήση κάμερας και του λογισμικού BioCapt Vilber Loumart και οι πυκνότητες των ζωνών αναλύθηκαν με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού επεξεργασίας εικόνας Bioprofil Vilber Loumart.

3.9 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων, προέκυψαν μετά από επανάληψη όλων των δοκιμασιών τουλάχιστον τρεις φορές. Η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων, ενώ για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση μεταξύ των επιλεγόμενων μέσων σε κάθε δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η στατιστική ανάλυση πολλαπλού εύρους, Newman-Keuls (SNK post-hoc test).

3.10 Λογισμικά Προγράμματα

Κατά την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά προγράμματα Microsoft Office-Word, Microsoft Office-Excel, Bioprofil Vilber Loumart, ImageJ, GraphPad Prism, Adobe Photoshop, Confocal Assistant.

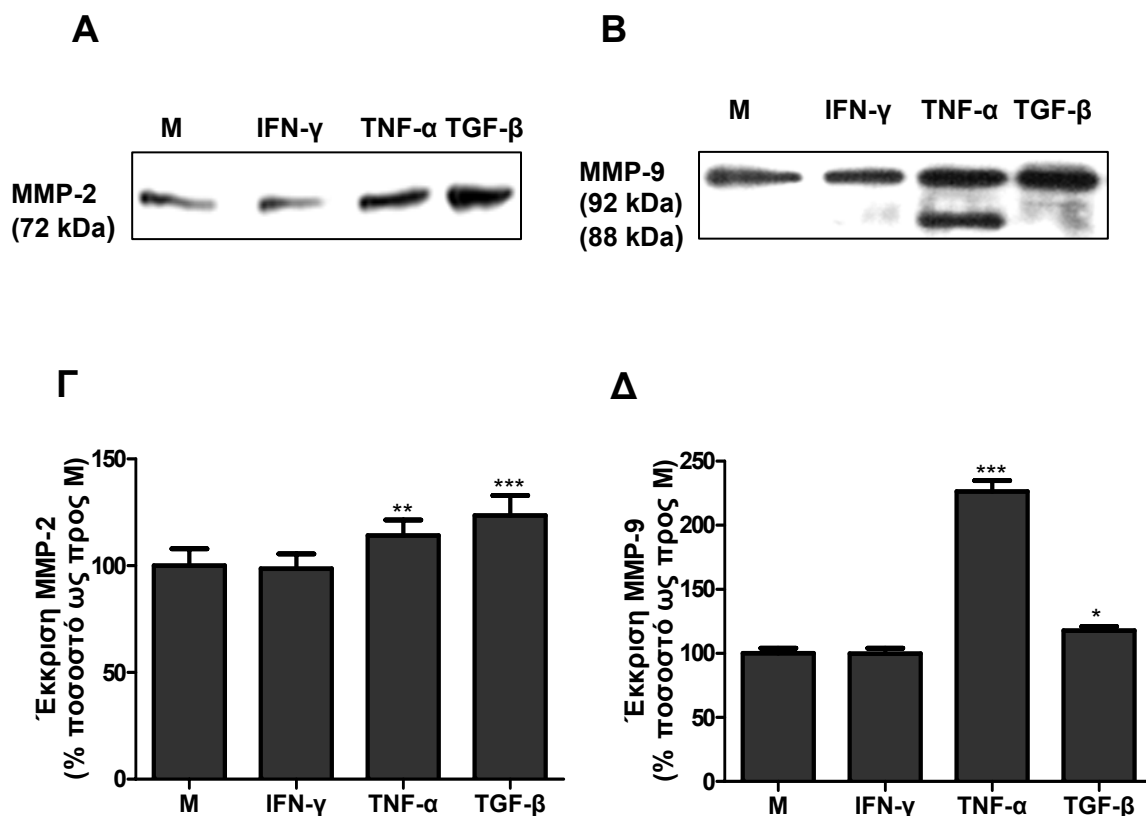
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιδραση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στην έκφραση των μεταλλοπρωτεασών και των ιστικών αναστολέων τους

Όπως αναφέρθηκε, η ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστών-οστεοκλαστών είναι σημαντική για τη διατήρηση και ανακατασκευή του οστού και σημαντικός παράγοντας σε αυτό είναι η απόπτωση. Επειδή στη ρύθμιση της απόπτωσης των οστεοβλαστών συμμετέχουν πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ομοιοστασίας της εξωκυττάριας μήτρας όπως οι MMPs και TIMPs, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος του οστού (Zhou et al. 2003; Karsdal et al. 2002; Sanceau et al. 2002; Uchida et al. 2000). Για τη μελέτη αυτή, ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63 που αποτελεί πρότυπο μελέτης των οστεοβλαστικών κυττάρων. Ως παράγοντες με προ- και αντι-αποπτωτική δράση χρησιμοποιήθηκαν οι IFN- γ , TNF- α και TGF- β . Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια προκαταρτική σειρά πειραμάτων, όπου εξετάστηκε η ρύθμιση της έκφρασης των MMPs και TIMPs παρουσία κάθε παράγοντα με ανάλυση κατά Western, ενώ παράλληλα τα κύτταρα εξετάζονταν μορφολογικά, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά χαρακτηριστικά απόπτωσης.

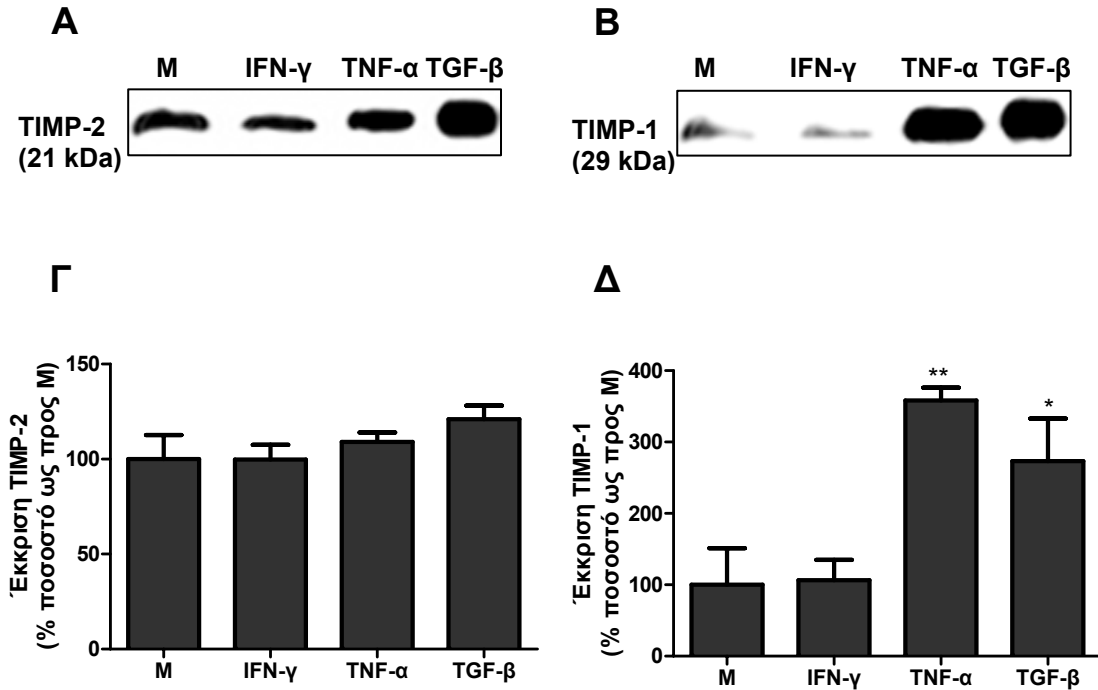
Συγκεκριμένα τα κύτταρα MG63 καλλιιεργήθηκαν μέχρι 80% πληρότητα για διάστημα 48 ωρών σε πλήρες θρεπτικό υλικό και για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε ορό προκειμένου να συγχρονιστούν ως προς τον κυτταρικό κύκλο. Στη συνέχεια επώαστηκαν με IFN- γ (40 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) ή TGF- β (10 ng/ml) για ακόμη 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού και συνελέγησαν τα υπερκείμενα της καλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων από θρεπτικά υλικά καλλιέργειας κυττάρων επεξεργασμένων ή όχι με κάθε παράγοντα και σε αυτά ακολούθησε ανάλυση τύπου Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ειδικά τις προς μελέτη πρωτεΐνες. Η MMP-2

ανιχνεύτηκε ως μία ζώνη μεγέθους 72 kDa και η MMP-9 ως μία ζώνη μεγέθους 92/88 kDa (πρόδρομη και ενεργή μορφή, αντίστοιχα). Από την ανάλυση του ανοσοστυπώματος (**Εικόνα 15A**) παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκκρισης της MMP-2 δε διαφοροποιούνται παρουσία IFN- γ , ενώ παρουσιάζουν αύξηση παρουσία TNF- α και TGF- β σε ποσοστό 14% και 24%, αντίστοιχα (**Εικόνα 15A**). Για την MMP-9 διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκκρισής της δεν μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά παρουσία IFN- γ . Αντίθετα, παρουσία TNF- α παρατηρείται αύξηση κατά 125% με ταυτόχρονη επαγωγή της ενεργής μορφής του ενζύμου, ενώ παρουσία TGF- β παρατηρείται αύξηση σε ποσοστό 20% σε σύγκριση με το μάρτυρα (M) (**Εικόνα 15B**).



Εικόνα 15. Διαφοροποίηση των επιπέδων έκκρισης των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 παρουσία IFN-γ, TNF-α και TGF-β. (Α-Β) Δείγματα υλικού καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 40 ng/ml IFN-γ, 10 ng/ml TNF-α, 10 ng/ml TGF-β, συμπυκνώθηκαν και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των MMP-2 και MMP-9 σε αραιώση 1:500. (Γ-Δ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων πρωτεΐνης της MMP-2 και της MMP-9 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$. (**): $p < 0.01$. (***): $p < 0.001$.

Η ενζυμική ενεργότητα των ζελατινολών MMP-9 και MMP-2 ρυθμίζεται από τους ενδογενείς αναστολείς τους TIMP-1 και TIMP-2 αντίστοιχα, οι οποίοι συνιστούν ένα επιπλέον μέσον ελέγχου της ομοιόστασης της εξωκυττάριας μήτρας. Έτσι, εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι αναστολείς παρουσία των παραγόντων IFN- γ , TNF- α και TGF- β στις παραπάνω πειραματικές συνθήκες. Για τον προσδιορισμό του προτύπου έκφρασης των TIMP-1 και TIMP-2 πραγματοποιήθηκε ανάλυση τύπου Western στα ίδια δείγματα κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία ή απουσία κάθε παράγοντα. Όπως και στην περίπτωση των MMPs, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων. Με τη χρήση κατάλληλου πολυκλωνικού αντισώματος ανιχνεύτηκε μία ζώνη με μέγεθος 21 kDa που αντιστοιχεί στον εκκρινόμενο αναστολέα TIMP-2, ο οποίος έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την MMP-2. Σύμφωνα με την πυκνομετρική ανάλυση του ανοσοστυπώματος (**Εικόνα 16A**), οι παράγοντες IFN- γ , TNF- α ή TGF- β δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-2. Στα ίδια δείγματα κυττάρων μελετήθηκε η έκφραση του TIMP-1, ο οποίος έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την MMP-9 και ανιχνεύτηκε με αντίστοιχο πολυκλωνικό αντίσωμα ως μία ζώνη μεγέθους 29 kDa. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν παρουσία IFN- γ η έκφραση του TIMP-1 δε διαφοροποιήθηκε, ενώ στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία TNF- α ή TGF- β η έκφραση του TIMP-1 αυξήθηκε κατά 3 και 2 φορές, αντίστοιχα (**Εικόνα 16B**). Από τη μικροσκοπική εξέταση των κυττάρων μετά από χρώση με DAPI δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στον πυρήνα των κυττάρων σε καμία από τις συνθήκες καλλιέργειας, ούτε παρουσία TNF- α , μιας κυτταροκίνης που κυρίως προκαλεί απόπτωση.



Εικόνα 16. Διαφοροποίηση των επιπέδων έκκρισης των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών TIMP-2 και TIMP-1 παρουσία IFN- γ , TNF- α και TGF- β . (A-B) Δείγματα υλικού καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 40 ng/ml IFN- γ , 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml TGF- β , συμπυκνώθηκαν και αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών, με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των TIMP-2 και TIMP-1 σε αραιώση 1:500. (Γ-Δ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων πρωτεΐνης των TIMP-2 και TIMP-1 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$. (**): $p < 0.01$.

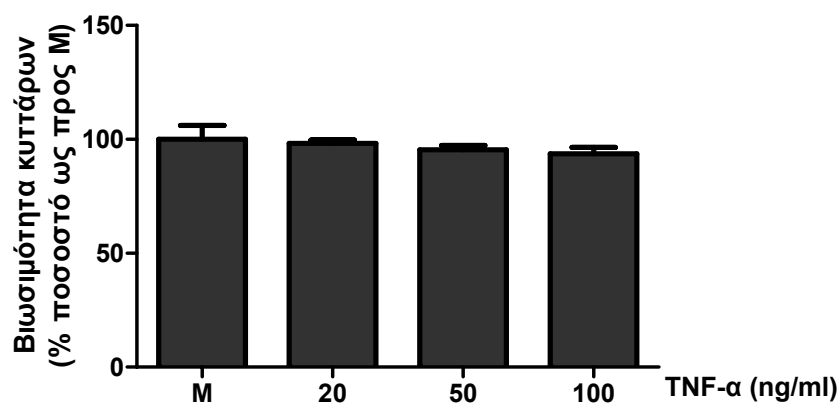
Συνδυάζοντας την αύξηση στην έκφραση του TIMP-1 παρουσία TNF-α, ο οποίος κυρίως σηματοδοτεί απόπτωση, και λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που αποδίδουν στον TIMP-1 δράση αυξητικού παράγοντα στα κύτταρα MG63 (Yamashita et al. 1996), αλλά και αντι-αποπτωτική δράση σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Liu et al. 2005; Liu et al. 2003; Li et al. 1999; Lee et al. 2003; Lambert et al. 2003; Han et al. 2001; Guo et al. 2006; Guedez et al. 1998; Boulday et al. 2004), θεωρήθηκε σημαντικό να εξεταστεί κατά πόσον η αύξηση του TIMP-1 μπορεί να συνδεθεί με την αντοχή των κυττάρων MG63 στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση. Προκειμένου να διερευνηθεί η ανωτέρω υπόθεση τα κύτταρα οστεοσαρκώματος οδηγήθηκαν σε απόπτωση και μελετήθηκε η πιθανή αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1.

4.2 Επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα MG63 από τον TNF-α

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι ο TNF-α επάγει την απόπτωση στην κυτταρική σειρά των οστεοβλαστών ποντικού MC3T3-E1, αλλά όχι στην καρκινική σειρά οστεοσαρκώματος MG63 (Chua et al. 2002; Tsuboi et al. 1999). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν με μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία του παράγοντα και προσδιορισμό της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2.

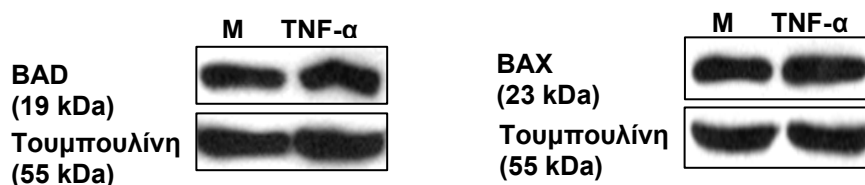
Στην παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων MG63 παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TNF-α (20 ng/ml, 50 ng/ml και 100 ng/ml) πραγματοποιήθηκε με την τεχνική MTT όπως αναλυτικά αναφέρεται στο κεφάλαιο των μεθόδων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διάστημα 48 ωρών σε πλήρες θρεπτικό υλικό και για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε ορό. Κατόπιν επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις TNF-α για 24 ώρες και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των κρυστάλλων φορμαζάνης με μέτρηση της έντασης του μπλε χρώματος στα 570 nm. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων εκφράστηκε το ποσοστό % των ζωντανών κυττάρων σε σύγκριση με το μάρτυρα (M) (Εικόνα 17). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα κύτταρα MG63 είναι ανθεκτικά έναντι της απόπτωσης ακόμη και κατά την επεξεργασία με την υψηλότερη συγκέντρωση TNF-α (100 ng/ml).

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα ίσης συνολικής πρωτεΐνης, που προήλθαν από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία TNF-α στην υψηλότερη συγκέντρωση. Όπως φαίνεται και στα ανοσοστοιβάματα της Εικόνας 18, τα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών BAD και BAX, όπως επίσης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2 και BCL-X_L δεν αλλάζουν σε σύγκριση με το μάρτυρα.

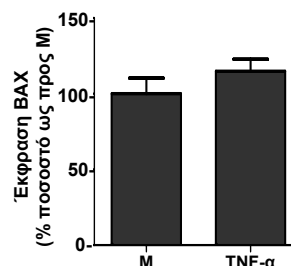
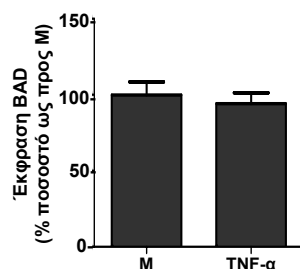


Εικόνα 17. Βιωσιμότητα των κυττάρων MG63 έναντι αυξανόμενων συγκεντρώσεων TNF-α. Κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TNF-α (20-100 ng/ml) επεξεργάστηκαν με το διάλυμα MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό % ως προς τα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων απορρόφησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

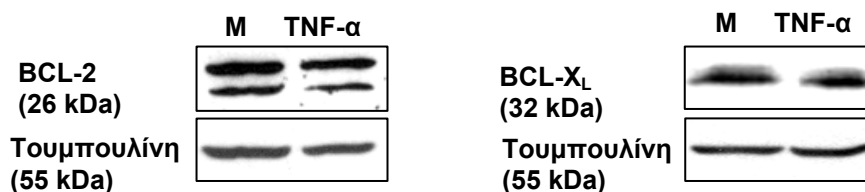
A



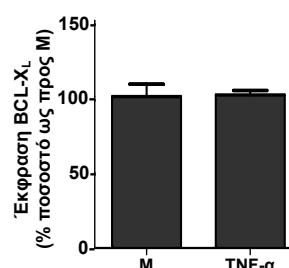
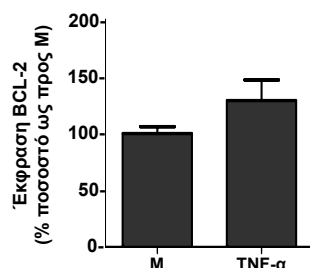
B



Γ



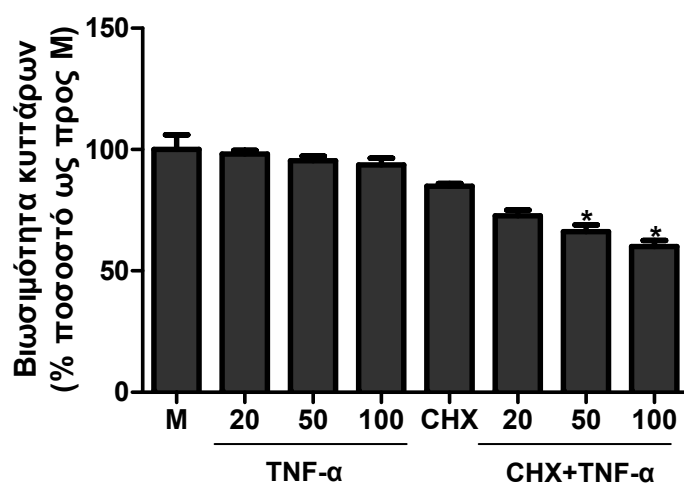
Δ



Εικόνα 18. Επίδραση του TNF-α στην έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2. (Α-Γ) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα ίσης ολικής πρωτεΐνης που προέρχονταν από κύτταρα MG63 που καλλιιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες και ανοσοαποτυπώθηκαν με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών BAD, BAX, BCL-2 και με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης BCL-X_L σε αραιώση 1:100. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε συγκέντρωση 1:3000. (B-Δ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων πρωτεΐνης των BAD, BAX, BCL-2 και BCL-X_L με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

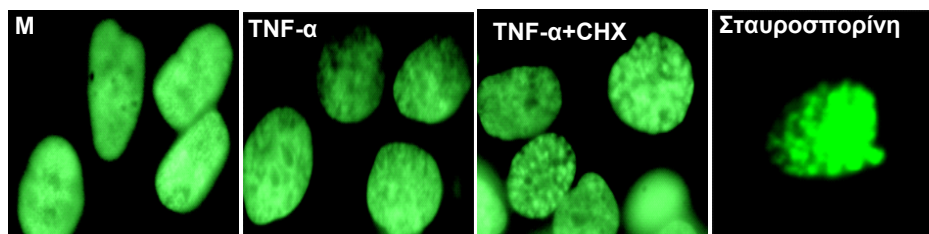
Για την ευαισθητοποίηση των κυττάρων MG63 στην απόπτωση έναντι του TNF-α χρησιμοποιήθηκε CHX, ως αναστολέας της πρωτεϊνσύνθεσης, καθώς είναι γνωστό ότι η ανθεκτικότητα των κυττάρων εξαρτάται εν μέρει από την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-KB, και την επαγωγή στην έκφραση πρωτεϊνών με αντι-αποπτωτική δράση (Beg and Baltimore 1996). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια προεπώσθησαν ή όχι για 1 ώρα με 5 $\mu\text{g/ml}$ CHX πριν την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων TNF-α για 24 ώρες. Από τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας με MTT παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 37% παρουσία CHX στην υψηλή συγκέντρωση του TNF-α (100 ng/ml) (Εικόνα 19).

Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών της απόπτωσης στον πυρήνα, τα κύτταρα μετά από καλλιέργεια για 24 ώρες απουσία ορού υποβλήθηκαν σε επεξεργασία ή όχι με CHX και αναπτύχθηκαν παρουσία TNF-α για ακόμη 24 ώρες. Ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων και η χρώση με το διάλυμα DAPI, προκειμένου να παρατηρηθούν οι πυρήνες των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού. Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, εντοπίστηκε συμπύκνωση της χρωματίνης που είναι χαρακτηριστικό της απόπτωσης μόνο στο δείγμα των κυττάρων που είχε προεπωαστεί με CHX πριν την προσθήκη του TNF-α (Εικόνα 20Α). Ως θετικός μάρτυρας της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί παρουσία σταυροσπορίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο TNF-α ή το CHX δεν επέφεραν αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων όταν χορηγήθηκαν ξεχωριστά στα κύτταρα MG63. Εξάλλου, προεπάση των κυττάρων με CHX και ανάπτυξη τους παρουσία TNF-α για 48 ώρες προκάλεσε την πλήρη απόπτωση των κυττάρων όπως διαπιστώθηκε με κυτταρομετρία ροής με την οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα θραύσης του DNA του πυρήνα. Εξάλλου, είναι γνωστό ότι ένα κύριο χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυττάρων είναι η θραύση του DNA που προκαλεί την εμφάνιση μιας υπο-διπλοειδούς κορυφής. Από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής προέκυψε ότι μόνο τα κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία με CHX πριν την προσθήκη του TNF-α είχαν υποστεί θραύση του DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση της υπο-διπλοειδούς κορυφής (Εικόνα 20Β). Έτσι, για τη συνέχεια των πειραμάτων επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 100 ng/ml TNF-α παρουσία CHX σε συγχρονισμένα κύτταρα και καλλιέργεια σε αυτές τις συνθήκες για 24 ώρες.

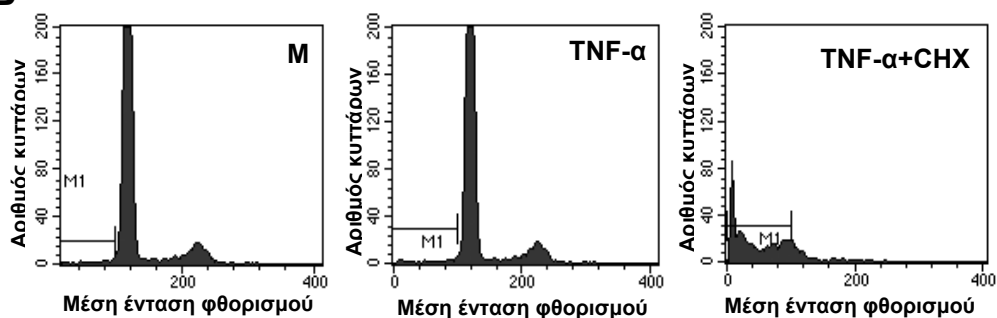


Εικόνα 19. Ευαισθητοποίηση των κυττάρων MG63 σε απόπτωση έναντι TNF-α. Κύτταρα MG63 προεπώαστηκαν ή όχι με CHX για 1 ώρα πριν την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων TNF-α (20-100 ng/ml) για 24 ώρες. Ακολούθως προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με την μέθοδο MTT. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό % ως προς τα κύτταρα αναφοράς (M) τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων απορρόφησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.

A



B

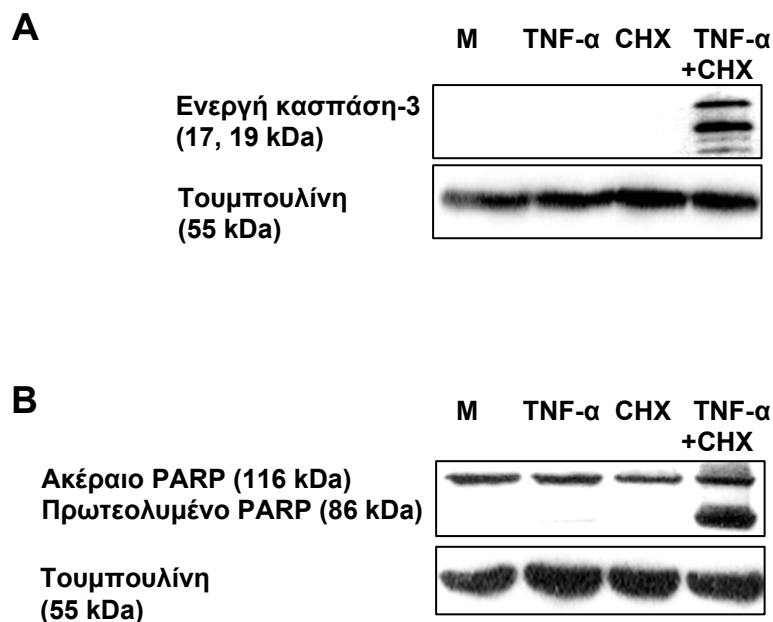


Εικόνα 20. Προσδιορισμός της απόπτωσης με χρώση DAPI και κυτταρομετρία ροής. (A) Κύτταρα MG63 που επωάστηκαν ή όχι με CHX για 1 ώρα και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες, μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν με DAPI για τον εντοπισμό της συμπυκνωμένης χρωματίνης. Ως θετικός μάρτυρας απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε σταυροσπορίνη. Οι παρατηρήσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στο φωτομικροσκόπιο Zeiss Axiophot. Οι εικόνες επεξεργάστηκαν με ψευδοχρωματισμό. (B) Κύτταρα MG63 που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία ή όχι με CHX για 1 ώρα και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία 100 ng/ml TNF-α για 48 ώρες, μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν με PI. Ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για να προσδιοριστούν τα θραύσματα DNA.

4.2.1 Μελέτη πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν την απόπτωση

Ένα από τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η ενεργοποίηση ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων κυστεΐνης, των κασπάσων (Nicholson et al. 1995). Οι κασπάσες βρίσκονται στο κύτταρο με την ανενεργή μορφή του ζυμογόνου που ονομάζεται προκασπάση και μετά το αποπτωτικό ερέθισμα μετατρέπονται στην ενεργή κασπάση. Οι ενεργές κασπάσες διαμεσολαβούν την απόπτωση με πρωτεόλυση διαφόρων υποστρωμάτων μεταξύ των οποίων και του PARP, ο οποίος εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικού στρες (Lazebnik et al. 1994).

Με τη χρήση της ανοσοδοκιμασίας κατά Western και κατάλληλων αντισωμάτων εξετάστηκε η ενεργοποίηση της τελεστικής κασπάσης-3 και η αποικοδόμηση του PARP. Εκχυλίσματα κυττάρων MG63 που καλλιιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία TNF-α ή TNF-α+CHX, αναλύθηκαν κατά Western με κατάλληλα αντισώματα έναντι της ενεργής μορφής της κασπάσης-3 και του PARP. Η ανάλυση των δειγμάτων κατά Western επέτρεψε την ανίχνευση διπλής ζώνης στα 17-19 kDa που αντιστοιχεί στην ενεργή μορφή της κασπάσης-3 στο δείγμα των κυττάρων που είχε υποστεί επεξεργασία με TNF-α+CHX, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα του μάρτυρα, του TNF-α ή του CHX (**Εικόνα 21A**). Επίσης με την ίδια τεχνική και στο ίδιο δείγμα (TNF-α+CHX) ανιχνεύτηκε η ζώνη του PARP στα 86 kDa που αντιστοιχεί στην πρωτεολυμένη μορφή (**Εικόνα 21B**) και ενισχύει το συμπέρασμα της ενεργοποίησης των κασπασών. Η ζώνη με μέγεθος 86 kDa αντιστοιχεί στο μεγάλο θραύσμα που προκύπτει από την αποικοδόμηση του PARP από τις κασπάσες, ενώ δεν εντοπίστηκε το μικρό θραύσμα με μέγεθος 25 kDa. Επιπλέον δεν εντοπίστηκε η πρωτεολυμένη μορφή του PARP στον αρνητικό μάρτυρα ή στα δείγματα των κυττάρων που είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία μόνο με TNF-α ή CHX (**Εικόνα 21B**). Η ανίχνευση του μεγάλου θραύσματος μεγέθους 86 kDa που προέρχεται από την πρωτεόλυση του PARP εντοπίστηκε με ταυτόχρονη μείωση της ποσότητας του ακέραιου PARP μεγέθους 116 kDa, γεγονός που υποδηλώνει επίσης, την ενεργοποίηση των κασπασών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 παρατηρήθηκε στις 6 ώρες επεξεργασίας με τους αποπτωτικούς παράγοντες, καθώς πρόκειται για χαρακτηριστικό που συμβαίνει στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, ενώ η πρωτεόλυση του PARP ανιχνεύτηκε 24 ώρες μετά την προσθήκη του παράγοντα, διότι συμβαίνει στα τελικά στάδια της απόπτωσης.

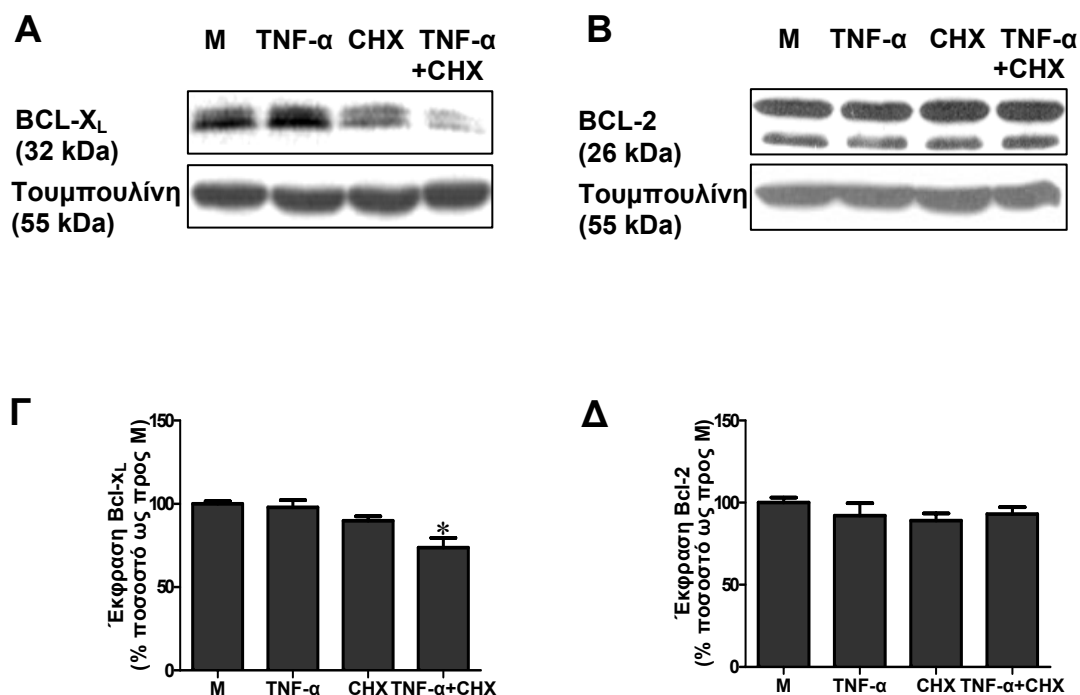


Εικόνα 21. Προσδιορισμός της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και πρωτεόλυσης του υποστρώματος των κασπασών PARP. Κύτταρα MG63 επωάστηκαν ή όχι με CHX και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες. Δείγματα ίσης ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης από κάθε συνθήκη ανάπτυξης, αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες και ανοσοαποτυπώθηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενεργής μορφής της κασπάσης-3 σε αραίωση 1:500. (B) Δείγματα ίσης ολικής πρωτεΐνης από τις ανωτέρω συνθήκες αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες και ανοσοαποτυπώθηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακέραιας και πρωτεολυμένης μορφής του PARP σε αραίωση 1:1000. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραίωση 1:3000.

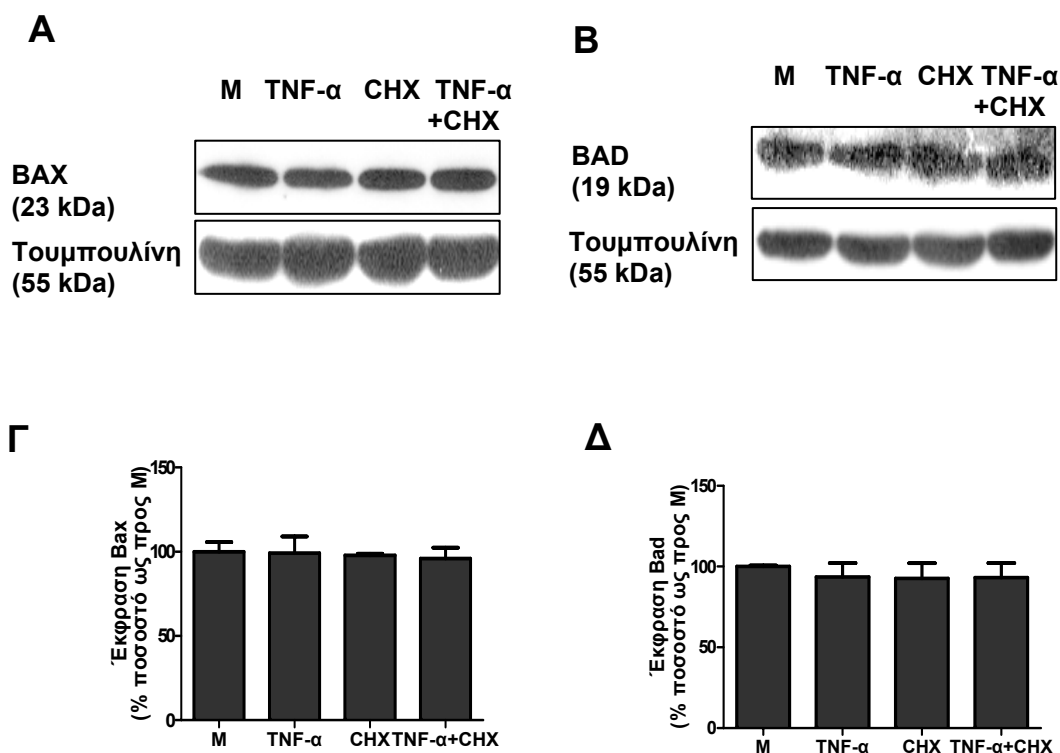
Τέλος προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης μορίων της οικογένειας BCL-2 με ανάλυση τύπου Western, ώστε να καταγραφούν τα μέλη που συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία. Με τη χρήση κατάλληλου μονοκλωνικού αντισώματος, ανιχνεύτηκε μία πρωτεϊνική ζώνη με μέγεθος 32 kDa που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη BCL-X_L, η οποία έχει αντι-αποπτωτική δράση (Boise et al. 1993). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα MG63 που είχαν επεξεργαστεί με TNF-α+CHX οδηγούνται σε απόπτωση η οποία μεσολαβείται από τη μείωση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-X_L. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης BCL-X_L σε συνθήκες απόπτωσης (TNF-α+CHX) μειώθηκαν κατά 26% σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης BCL-X_L στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία TNF-α ή CHX δε μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 22Α**).

Στα ίδια δείγματα κυττάρων μελετήθηκε η έκφραση του BCL-2 που ανήκει στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών και έχει αντι-αποπτωτική δράση, με ανοσοδοκιμασία κατά Western και τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει μία διπλή ζώνη μεγέθους 26 kDa. Από την ανάλυση του ανοσοστυπώματος (**Εικόνα 22Β**) δείχτηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης BCL-2 στα δείγματα κυττάρων που είχαν αναπτυχθεί παρουσία TNF-α, CHX ή TNF-α+CHX.

Αντίστοιχες παρατηρήσεις προέκυψαν κατά τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών BAX και BAD με προ-αποπτωτική δράση. Με τη χρήση των πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών BAX και BAD που αναγνωρίζουν αντίστοιχα μία πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους 23 kDa και μία πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους 19 kDa ανιχνεύτηκαν οι προς μελέτη πρωτεΐνες. Από την πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων βρέθηκε ότι η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TNF-α, CHX ή TNF-α+CHX δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών BAX και BAD σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνες 23Α και 23Β, αντίστοιχα**).

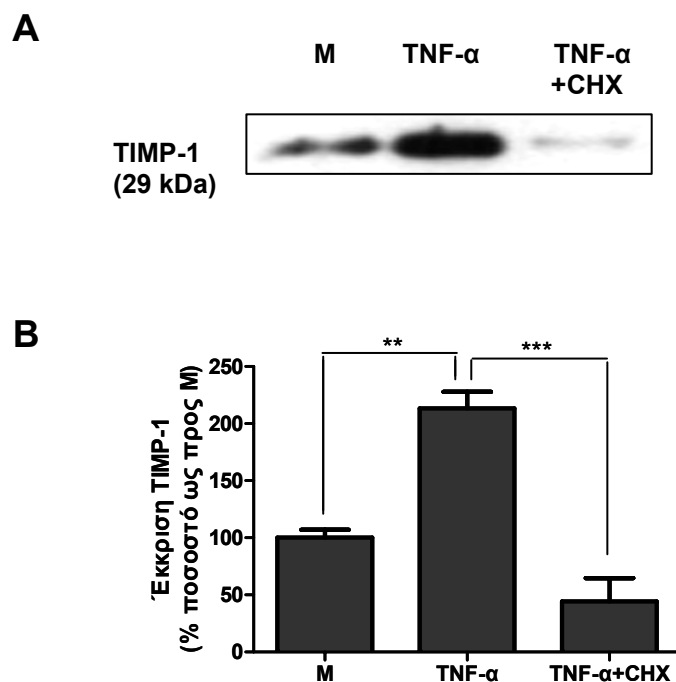


Εικόνα 22. Προσδιορισμός της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 που διαμεσολαβούν την απόπτωση. Κύτταρα MG63 επωάστηκαν ή όχι με CHX και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες. Δείγματα ίσης ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης από κάθε συνθήκη ανάπτυξης, αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες και ανοσοαποτυπώθηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης BCL-X_L (A) ή πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της BCL-2 (B) σε αραιώση 1:100. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραιώση 1:3000. (Γ-Δ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών BCL-X_L και BCL-2 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.



Εικόνα 23. Προσδιορισμός της έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 που διαμεσολαβούν την απόπτωση. Κύτταρα MG63 επωάστηκαν ή όχι με CHX και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες. Δείγματα ίσης ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης από κάθε συνθήκη ανάπτυξης, αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες και ανοσοαποτυπώθηκαν με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης BAX (A) ή έναντι της BAD (B) σε αραίωση 1:100. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραίωση 1:3000. (Γ-Δ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών BAX και BAD με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι ο TNF-α δε μπορεί να προκαλέσει απόπτωση στα κύτταρα MG63 ακόμη κι αν χορηγηθεί σε μεγάλη συγκέντρωση και για μεγάλους χρόνους επώασης. Αντίθετα, τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση από τον TNF-α μόνο αν έχουν προ-επωαστεί με έναν αναστολέα της πρωτεϊνολύσεως, όπως το CHX. Συνεπώς, η προσθήκη του TNF-α στα κύτταρα MG63 συνδέεται με τη σύνθεση πρωτεϊνών που δρουν προστατευτικά έναντι της απόπτωσης. Επειδή παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του TIMP-1 παρουσία TNF-α και στον TIMP-1 έχουν αποδοθεί αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, στη συνέχεια της μελέτης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του TIMP-1 σε συνθήκες απόπτωσης. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 ακολουθήθηκε ανάλυση με ανοσοδοκιμασία κατά Western σε υπερκείμενα που αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό κυττάρων. Σύμφωνα με την ανάλυση, σε αποπτωτικές συνθήκες προεπώασης με CHX πριν την προσθήκη του TNF-α παρατηρείται σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 (**Εικόνα 24**). Επομένως, η επαγωγή της έκφρασης του TIMP-1 παρουσία TNF-α (βλ. **Εικόνα 16B**, σελ. 126) οφείλεται στη σύνθεση νέας πρωτεΐνης.



Εικόνα 24. Μείωση των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες. (A) Δείγματα υλικού καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων MG63 που προεπώαστηκαν παρουσία ή απουσία 5 μ g/ml CHX και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία 100 ng/ml TNF- α , συμπυκνώθηκαν και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυταρίνης και έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 σε αραίωση 1:500. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης TIMP-1 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (**): $p < 0.01$. (***): $p < 0.001$.

4.3 Η επαγόμενη από τον TNF-α αύξηση στα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1 συνδέεται με την ενεργοποίηση του NF-κB και τη σηματοδότηση μονοπατιών επιβίωσης

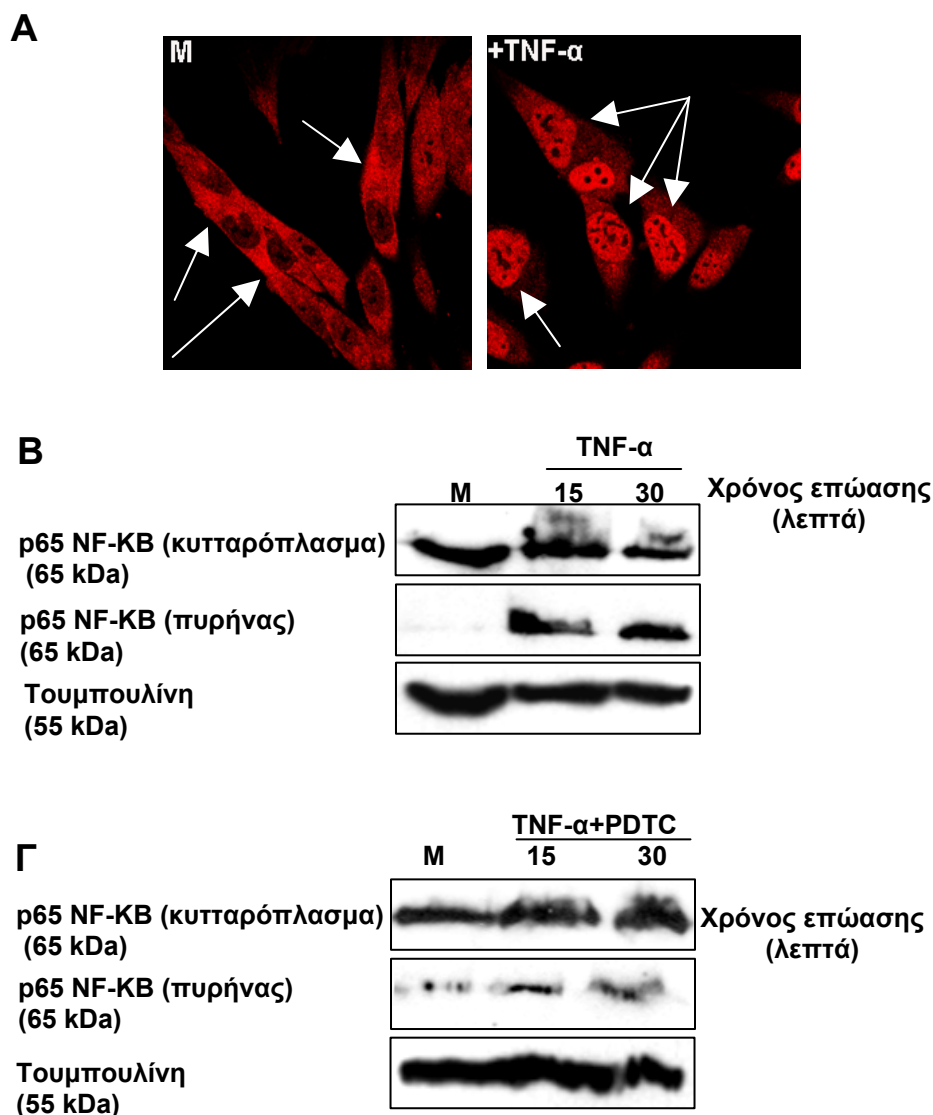
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες, προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης-έκκρισης του TIMP-1. Η έκφραση του TIMP-1 επάγεται από μόρια της εξωκυττάριας μήτρας όπως ο ορός, οι αυξητικοί παράγοντες (FGF, PDGF, EGF) και οι κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, IL-1β, TNF-α) και ελέγχεται από πλήθος μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων οι NF-KB, AP-1, ETS-1 και SP-1. Επειδή η ενεργοποίηση του NF-KB είναι κύριο αποτέλεσμα της σηματοδότησης του TNF-α, διερευνήθηκε η ενεργοποίηση της p65 υπομονάδας του NF-KB με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας για τη μελέτη της κατανομής της στα κύτταρα MG63.

Για τον έλεγχο της πιθανής ενεργοποίησης του NF-KB, τα κύτταρα μετά από συγχρονισμό 24 ωρών, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία ή όχι με TNF-α (100 ng/ml) για 30 λεπτά. Ακολούθως επώσθηκαν με το κατάλληλο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της p65 υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB. Βρέθηκε ότι απουσία TNF-α, η p65 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ μετά την επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TNF-α για 30 λεπτά παρατηρείται σημαντική μετατόπιση της υπομονάδας p65 στον πυρήνα των κυττάρων MG63 (**Εικόνα 25Α**).

Επιπλέον, η κατανομή της p65 υπομονάδας του NF-KB στα κύτταρα MG63 που είχαν επεξεργαστεί παρουσία ή απουσία TNF-α όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πιστοποιήθηκε και με τον υποκυτταρικό προσδιορισμό της. Για τον έλεγχο της πιθανής ενεργοποίησης του NF-KB, τα κύτταρα μετά από συγχρονισμό 24 ωρών, επεξεργάστηκαν με TNF-α (100 ng/ml) για 15 και 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού και απομονώθηκαν οι πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Στα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα ακολούθησε ανάλυση τύπου Western με τη χρήση του κατάλληλου πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της p65 υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που αντιστοιχούσαν σε ίσο ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο σύμφωνα με προσδιορισμό στο κυτταροπλασματικό κλάσμα των δειγμάτων.

Από την ανάλυση του ανοσοστυπώματος της **Εικόνας 25Β**, ήδη στα πρώτα 15 λεπτά παρατηρείται μετατόπιση της κυτταροπλασματικής p65 στον πυρήνα η οποία

διαρκεί έως τουλάχιστον 30 λεπτά επεξεργασίας των κυττάρων με τον παράγοντα TNF- α . Η μετατόπιση της p65 υπομονάδας του NF-KB στον πυρήνα υποδεικνύει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του NF-KB πιστοποιήθηκε με τη χρήση του αναστολέα διθειοκαρβαμιδική πυρρολιδίνη (Pyrrolidine DiThioCarbamate, PDTC). Τα κύτταρα προεπώστηκαν με 100 μ M PDTC για 1 ώρα πριν την προσθήκη του TNF- α . Όπως φαίνεται στο ανοσοστύψωμα της **Εικόνας 25Γ**, παρουσία PDTC αναστέλλεται η μετατόπιση της p65 υπομονάδας του NF-KB στον πυρήνα ακόμα και μετά από 30 λεπτά επεξεργασίας των κυττάρων με τον παράγοντα TNF- α .



Εικόνα 25. Μετατόπιση της p65 υπομονάδας του NF-KB από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα παρουσία TNF-α (Α)-Προσδιορισμός με ανοσοφθορισμό: Κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε καλυπτρίδες και αναπτύχθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 30 λεπτά, μονιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν με αντίσωμα έναντι της p65 υπομονάδας του NF-KB σε αραιώση 1:100. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάστηκαν με αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικού AlexaFluor 568 σε αραιώση 1:500 και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiovert. (Β)-Προσδιορισμός με βιοχημική μέθοδο: Κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα ίσης συνολικής πρωτεΐνης από κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 15 και 30 λεπτά αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE υπό αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της p65 υπομονάδας του NF-KB σε αραιώση 1:1000. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραιώση 1:3000. (Γ) Προσδιορισμός της p65 υπομονάδας του NF-KB σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων που επεξεργαστήκαν όπως στο (Β) μετά από προεπώαση με 100 μM PDTC για 1 ώρα.

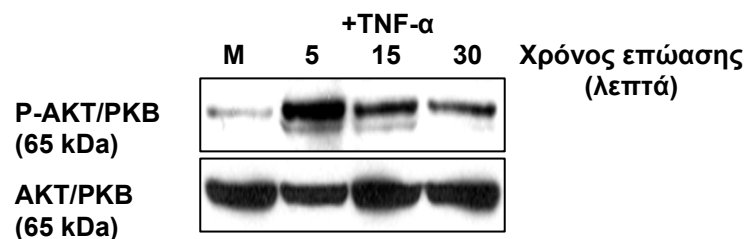
Στις παραπάνω συνθήκες μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον TNF-α και σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση. Για την ανίχνευση κινασών που ενεργοποιούνται μετά από την επίδραση με TNF-α, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν για 5, 15 και 30 λεπτά με TNF-α σε συγκέντρωση 100 ng/ml. Στα παραπάνω δείγματα ακολούθησε ανάλυση τύπου Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Η ανάλυση του ανοσοστυπώματος (**Εικόνα 26**) έδειξε ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία TNF-α παρουσίασαν αύξηση στη ζώνη 65 kDa που αντιστοιχεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή (Ser473) της κινάσης AKT/PKB κατά 3 φορές σε σύγκριση με το μάρτυρα στα πρώτα 5 λεπτά επεξεργασίας με τον παράγοντα TNF-α και κατά 1,5 φορά σε σύγκριση με το μάρτυρα στα 15 λεπτά επεξεργασίας. Η επεξεργασία των κυττάρων για 30 λεπτά με TNF-α δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της AKT/PKB. Τα συνολικά επίπεδα της κινάσης εξετάστηκαν με τη χρησιμοποίηση αντισώματος που αναγνωρίζει ειδικά την AKT/PKB ανεξάρτητα από το βαθμό φωσφορυλίωσής της και βρέθηκε ότι αυτά δε μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά στις υπό μελέτη συνθήκες. Επομένως τα συγκεκριμένα ανοσοστυπώματα μπορούν να αποτελέσουν μάρτυρες για τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στα παραπάνω δείγματα.

Αντίστοιχα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί πιθανή ενεργοποίηση των MAPKs. Με βάση την πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων (**Εικόνα 27**) φαίνεται ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία TNF-α παρουσίασαν, ήδη στα πρώτα 5 λεπτά χορήγησης του παράγοντα, αύξηση σε μία διπλή ζώνη στα 43 kDa που αντιστοιχεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή (Tyr180, Thr182) της κινάσης p38-MAPK κατά 36 φορές σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38-MAPK μετά από 15 λεπτά επεξεργασίας με TNF-α αυξάνονται κατά 21 φορές, ενώ στα 30 λεπτά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38-MAPK σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η εμφάνιση διπλής ζώνης οφείλεται στις ισομορφές της p38-MAPK. Όταν εξετάστηκαν τα συνολικά επίπεδα της p38 με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου αντισώματος βρέθηκε ότι αυτά δε μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά στις υπό μελέτη συνθήκες. Επομένως τα ανοσοστυπώματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν μάρτυρες για τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στα παραπάνω δείγματα.

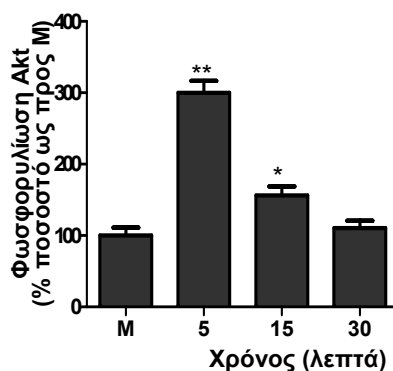
Τέλος, με βάση την πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοοτυπωμάτων της **Εικόνας 28** φαίνεται ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία TNF-α παρουσίασαν αύξηση σε μία διπλή ζώνη στα 46-54 kDa που αντιστοιχεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή (Thr183, Tyr185) των ισομορφών των JNKs. Στα 5 πρώτα λεπτά επεξεργασίας με 100 ng/ml TNF-α η φωσφορυλίωση των JNKs αυξήθηκε κατά 25 φορές, στα 15 λεπτά κατά 12 φορές και στα 30 λεπτά κατά 2.5 φορές σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η εμφάνιση διπλής ζώνης οφείλεται στις ισομορφές της JNK-MAPK. Όταν εξετάστηκαν τα συνολικά επίπεδα των JNKs με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου αντισώματος βρέθηκε ότι αυτά δε μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά στις υπό μελέτη συνθήκες. Επομένως τα ανοσοοτυπώματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν μάρτυρες για τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στα παραπάνω δείγματα.

Στις παραπάνω συνθήκες επεξεργασίας των κυττάρων MG63 με TNF-α παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο ενεργοποίησης των κινασών p38 και JNK, ενώ, δε διαπιστώθηκε διαφοροποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERKs σε σύγκριση με το μάρτυρα με βάση την κανονικοποίηση των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε με τα ολικά επίπεδα των ERKs (**Εικόνα 29**).

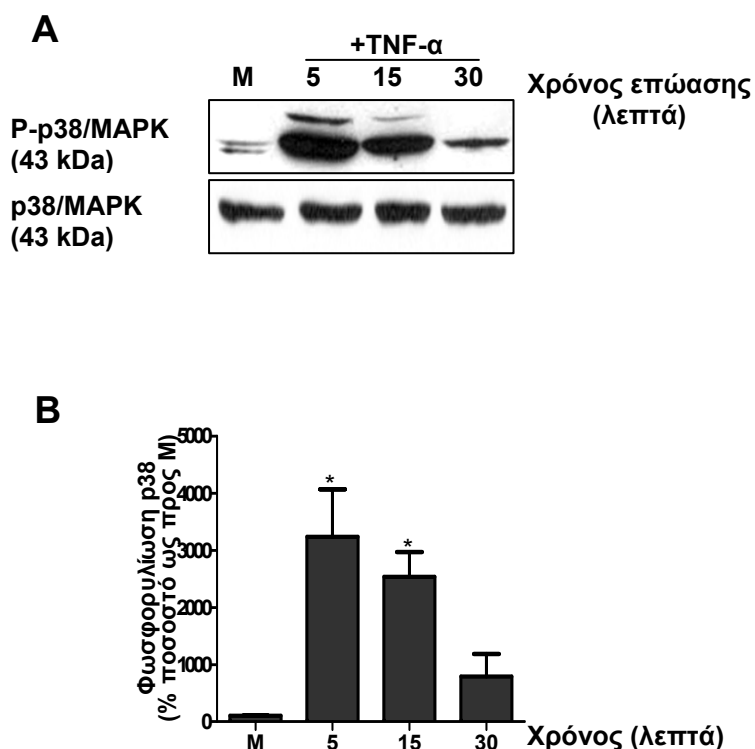
A



B

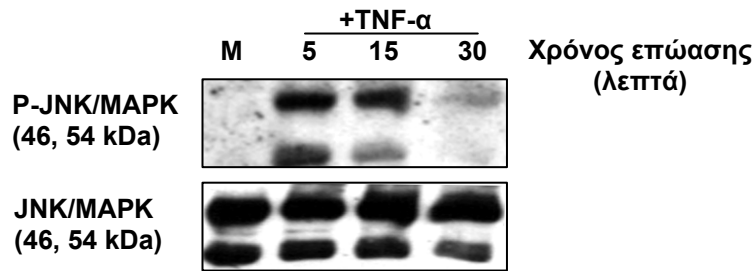


Εικόνα 26. Φωσφορυλίωση της κινάσης AKT/PKB (Ser473) παρουσία TNF-α. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 5, 15 και 30 λεπτά αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης AKT/PKB (Ser473) σε αραιώση 1:500. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της συνολικής πρωτεΐνης AKT/PKB σε συγκέντρωση 1:1000. (B): Ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της κινάσης AKT/PKB με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$. (**): $p < 0.01$.

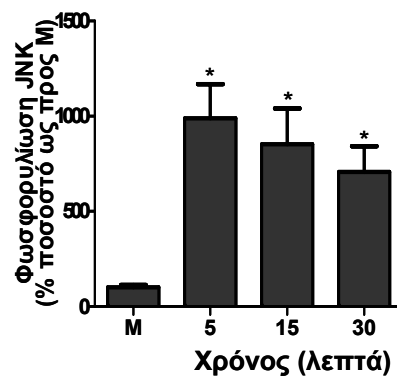


Εικόνα 27. Φωσφορυλίωση της κινάσης p38/MAPK (Tyr180, Thr182) παρουσία TNF-α. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 5, 15 και 30 λεπτά αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης p38/MAPK. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της συνολικής πρωτεΐνης p38/MAPK. Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:1000. (B): Ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της κινάσης p38/MAPK με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.

A

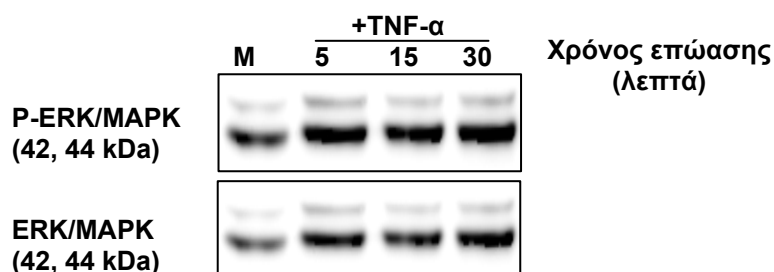


B

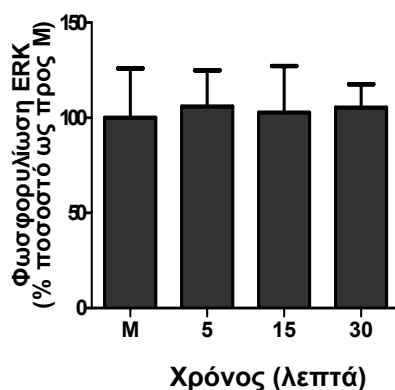


Εικόνα 28. Φωσφορυλίωση της κινάσης JNK/MAPK (Thr183, Tyr185) παρουσία TNF-α. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 5, 15 και 30 λεπτά αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης JNK/MAPK (Thr183/Tyr185). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της συνολικής πρωτεΐνης JNK/MAPK. Τα πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:1000. (B): Ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της κινάσης JNK/MAPK με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.

A



B



Εικόνα 29. Φωσφορυλίωση της κινάσης ERK/MAPK (Thr202, Tyr204) παρουσία TNF-α. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 5, 15 και 30 λεπτά αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης ERK/MAPK (Thr202/Tyr204). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της συνολικής πρωτεΐνης ERK/MAPK. Τα πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:1000. (B): Ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της κινάσης ERK/MAPK με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Επομένως, η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με τον παράγοντα TNF-α προκαλεί την ενεργοποίηση της κινάσης AKT/PKB που είναι μία κομβική κινάση κυτταρικής επιβίωσης. Ειδικότερα η AKT/PKB έχει ήδη συνδεθεί με την προστασία έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α σε ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που ξεκινά από την ιντεγκρίνη ανβ3 της κυτταρικής επιφάνειας (Bieler et al. 2007).

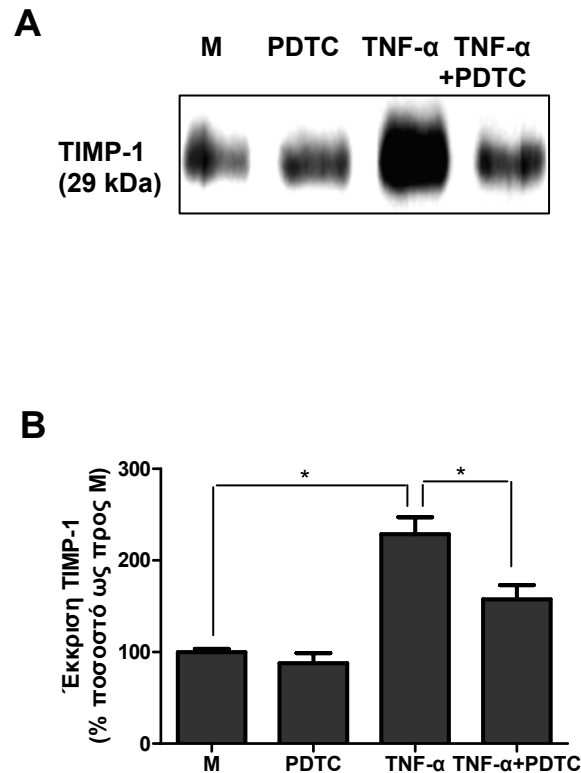
Ακόμη η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TNF-α προκάλεσε την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπου συμμετέχουν οι JNKs/MAPKs και p38/MAPKs. Οι κινάσες JNKs και p38 ενεργοποιούνται από εξωγενή ερεθίσματα και παράγοντες φλεγμονής και στρες, μεταξύ των οποίων ο TNF-α, σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως την απόπτωση. Ειδικότερα, η δράση της p38 στην κυτταρική επιβίωση έχει μελετηθεί σε περιπτώσεις βλάβης στο DNA, όπου συμμετέχει στην επιδιόρθωση της βλάβης (Reinhardt et al. 2007; Cosaceanu et al. 2007). Η δράση των JNKs στη ρύθμιση της απόπτωσης εξαρτάται από το ερέθισμα και σχετίζεται με τη χρονική διάρκεια της ενεργοποίησης και όταν είναι σύντομη, δεν οδηγεί σε απόπτωση (De Smaele et al. 2001; Ventura et al. 2006; Tang et al. 2001).

Συγκεντρωτικά, τα ανωτέρω αποτελέσματα συνάδουν με μελέτες που αναφέρουν ότι, αν και οι φυσιολογικές κυτταρικές σειρές είναι ευαίσθητες στην απόπτωση, οι καρκινικές σειρές εμφανίζουν αντοχή έναντι της απόπτωσης από τον κυτταροτοξικό παράγοντα TNF-α (Fornaro et al. 2003). Η ανθεκτικότητα αυτή των καρκινικών κυττάρων έναντι της απόπτωσης που προκαλείται από τον TNF-α οφείλεται στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων που προκαλούν την επαγωγή νεοσυντιθέμενων μορίων της οικογένειας BCL-2 και αναστολέων της απόπτωσης. Γι αυτό το λόγο, προκειμένου να ευαισθητοποιηθούν τα κύτταρα στην απόπτωση έναντι του TNF-α χρησιμοποιούνται κατάλληλοι αναστολείς της μεταγραφής ή της μετάφρασης.

Η ενεργοποίηση των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών όπως και του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB διερευνήθηκαν σε συνδυασμό με την επαγωγή στην έκφραση του TIMP-1. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η επαγόμενη από τον TNF-α αύξηση στα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1 συνδέεται με την ενεργοποίηση του NF-KB. Κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν μέχρι 80% πληρότητα για διάστημα 48 ωρών σε

πλήρες θρεπτικό υλικό και για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε ορό. Στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με 100 μ M PDTC για 1 ώρα και κατόπιν με 100 ng/ml TNF- α για 24 ώρες. Για τον προσδιορισμό του προτύπου έκφρασης του TIMP-1 παρουσία TNF- α (100 ng/ml) και παρουσία ή απουσία 100 μ M PDTC πραγματοποιήθηκε ανάλυση τύπου Western στα παραπάνω δείγματα κυττάρων. Σύμφωνα με το τυποποιημένο πρωτόκολλο, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων.

Η πυκνομετρική ανάλυση του ανοσοστυπώματος (**Εικόνα 30**) έδειξε ότι προεπώση των κυττάρων MG63 με 100 μ M PDTC πριν την προσθήκη του TNF- α οδηγεί σε αναστολή της επαγόμενης από τον TNF- α αύξησης των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 κατά 35%. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία PDTC τα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 ήταν συγκρίσιμα με του μάρτυρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι η επαγόμενη από τον TNF- α ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB είναι εν μέρει υπεύθυνη για την αύξηση στα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1.



Εικόνα 30. Μερική αναστολή της επαγόμενης από τον TNF-α αύξησης των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 παρουσία PDTC. (A) Δείγματα υλικού καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων MG63 που προεπώαστηκαν παρουσία ή απουσία 100 nM PDTC και καλλιεργήθηκαν απουσία (M) ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α, συμπυκνώθηκαν και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 σε συγκέντρωση 1:500. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης TIMP-1 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.

4.3.1 Η συμμετοχή του TIMP-1 στην ανθεκτικότητα των κυττάρων MG63 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης

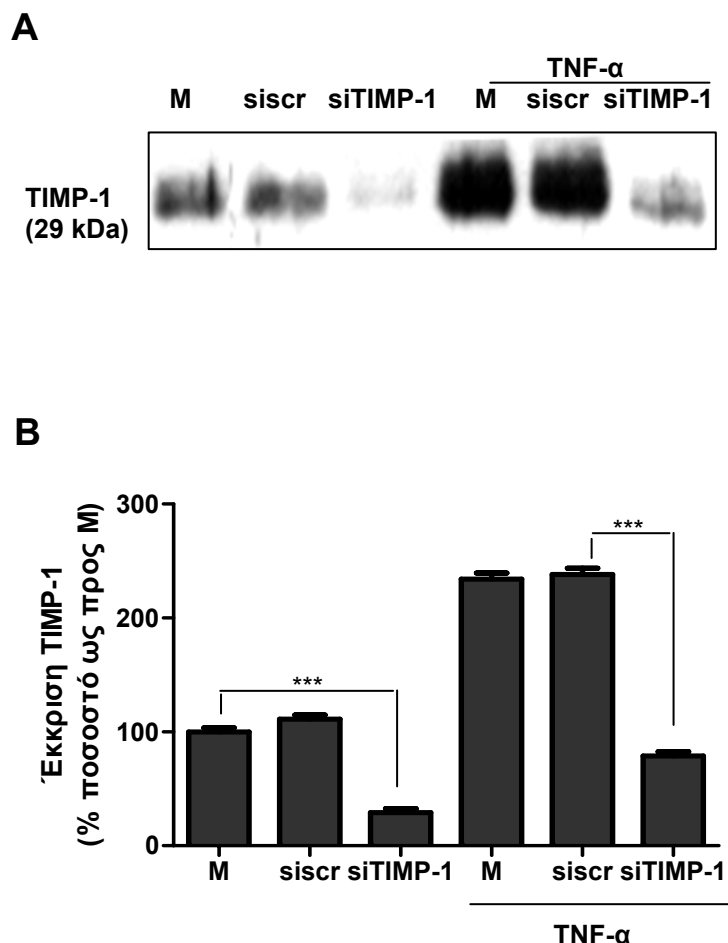
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι, σε μη αποπτωτικές συνθήκες παρουσία TNF-α επάγεται η έκφραση του TIMP-1, ενώ σε αποπτωτικές συνθήκες αναστολής της πρωτεϊνολύσεως - ευαισθητοποίησης των κυττάρων με CHX - συμβαίνει σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης-έκκρισης του TIMP-1. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1 οφείλεται εν μέρει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB και συνδέεται με την ενεργοποίηση κομβικών κινασών όπως η AKT/PKB και οι MAPKs. Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο TIMP-1 έχει πρόσφατα δειχθεί να έχει αντι-αποπτωτική δράση σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων με ταυτόχρονη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης όπου συμμετέχουν οι κινάσες AKT/PKB και MAPKs, (Guedez et al. 1998; Lambert et al. 2003; Liu et al. 2003) αποτέλεσε μία επιπλέον ένδειξη ότι η αύξηση του TIMP-1 συμμετέχει στην αντοχή των κυττάρων MG63 έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του TNF-α. Για τη διερεύνηση της συμβολής του TIMP-1 στην αντοχή των κυττάρων MG63 έναντι του TNF-α ακολουθήθηκαν δύο προσεγγίσεις: μελετήθηκε η επίδραση του TNF-α στην επιβίωση κυττάρων που παράγουν πολύ χαμηλά επίπεδα TIMP-1 και ακόμη μελετήθηκε η επίδραση ανασυνδυασμένου TIMP-1 στην επιβίωση κυττάρων υπό αποπτωτικές συνθήκες.

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή προστατευτική δράση του TIMP-1 στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση αποσιώπηθηκε η έκφραση του TIMP-1 με διαμόλυνση των κυττάρων με κατάλληλη αλληλουχία siRNA έναντι του TIMP-1. Ως κύτταρα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με αλληλουχία siRNA-scrabbled (scr), που δεν προκαλεί αποσιώπηση στην έκφραση οποιουδήποτε γονιδίου. Για την πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας Qiagen, όπως αναλυτικά περιγράφηκε στο κεφάλαιο των Μεθόδων. Στη συνέχεια τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν παρέμειναν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε ορό και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία παρουσία ή απουσία TNF-α για ακόμη 24 ώρες.

Με τη συλλογή των υπερκείμενων θρεπτικών υλικών της καλλιέργειας και ανάλυση τύπου Western ελέγχθηκε η αποσιώπηση στην έκφραση του TIMP-1. Με τη χρήση του κατάλληλου πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του TIMP-1 εντοπίστηκε

μία ζώνη μεγέθους 29 kDa που αντιστοιχεί στον TIMP-1 ο οποίος εκκρίνεται στο υλικό της καλλιέργειας. Από την πυκνομετρική ανάλυση της ζώνης προέκυψε ότι η έκκριση του TIMP-1 σχεδόν μηδενίστηκε στο δείγμα υλικού καλλιέργειας που προήλθε από τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-TIMP-1, σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 31, διαδρομή 3**). Αντίθετα τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-scr που αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα δεν παρουσίασαν μείωση στην έκκριση του TIMP-1 στο υλικό της καλλιέργειας σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 31, διαδρομή 2**).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του TNF-α στα διαμολυσμένα και άγριου τύπου κύτταρα σε σχέση με την έκφραση του TIMP-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-scr και επεξεργάστηκαν με τον παράγοντα TNF-α τα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1 ήταν ανάλογα με αυτά των μη διαμολυσμένων κυττάρων (κύτταρα μάρτυρες) παρουσία του παράγοντα (**Εικόνα 31, διαδρομές 4 και 5**). Αντίθετα, στα κύτταρα όπου είχε αποσιωπηθεί η έκφραση του TIMP-1 με την αλληλουχία siRNA-TIMP-1, τα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 παρέμειναν χαμηλά παρουσία TNF-α (**Εικόνα 31, διαδρομή 6**).



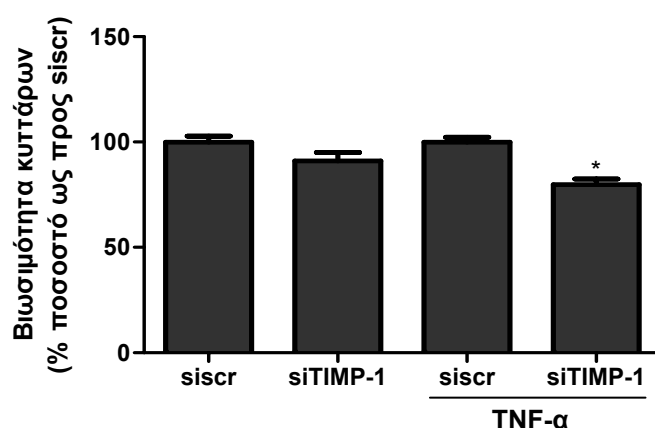
Εικόνα 31. Αναστολή της επαγόμενης από τον TNF-α αύξησης των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 σε συνθήκες αποσιώπησης του γονιδίου του TIMP-1. (A) Κύτταρα MG63 διαμολύνθηκαν με 1 μ g siRNA της αλληλουχίας αποσιώπησης του TIMP-1 (siTIMP-1) ή 1 μ g siRNA της αλληλουχίας που δεν προκαλεί αποσιώπηση κάποιου γονιδίου (siscr) και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF- α . Ως μάρτυρας (M) χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα κύτταρα. Δείγματα υλικού καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων συμπυκνώθηκαν και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 σε αραιώση 1:500. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης TIMP-1 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (***): $p < 0.001$.

Επιπλέον, από τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των διαμολυσμένων κυττάρων παρατηρήθηκε ότι μόνο τα κύτταρα στα οποία είχε αποσιωπηθεί ο TIMP-1 παρουσία TNF-α παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα βιωσιμότητας κατά 30% (**Εικόνα 32**). Έτσι, στις παραπάνω συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης του TIMP-1 μελετήθηκε η επίδραση του TNF-α στην απόπτωση των κυττάρων MG63. Τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τις αλληλουχίες siRNA-scr ή siRNA-TIMP-1 και επεξεργάστηκαν με TNF-α για 24 ώρες, υπέστησαν λύση και τα δείγματα των κυτταρικών λυμάτων αναλύθηκαν με ανοσοδοκιμασία κατά Western με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποστρώματος των κασπασών PARP. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 33A** προέκυψε ότι μόνο στα κύτταρα όπου είχε γίνει αποσιώπηση του TIMP-1 και επώαση με TNF-α για 24 ώρες ανιχνεύτηκε η πρωτεϊνική ζώνη μεγέθους 86 kDa που αντιστοιχεί στην πρωτεολυμένη μορφή του PARP (**Εικόνα 33A, διαδρομή 4**). Τα κύτταρα MG63 που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-scr ή siRNA-TIMP-1 (**Εικόνα 33A, διαδρομές 1, 2**) ή τα κύτταρα MG63 που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-scr και επεξεργάστηκαν με TNF-α, δεν εμφάνισαν την πρωτεολυμένη μορφή του PARP μεγέθους 86 kDa (**Εικόνα 33A, διαδρομή 3**).

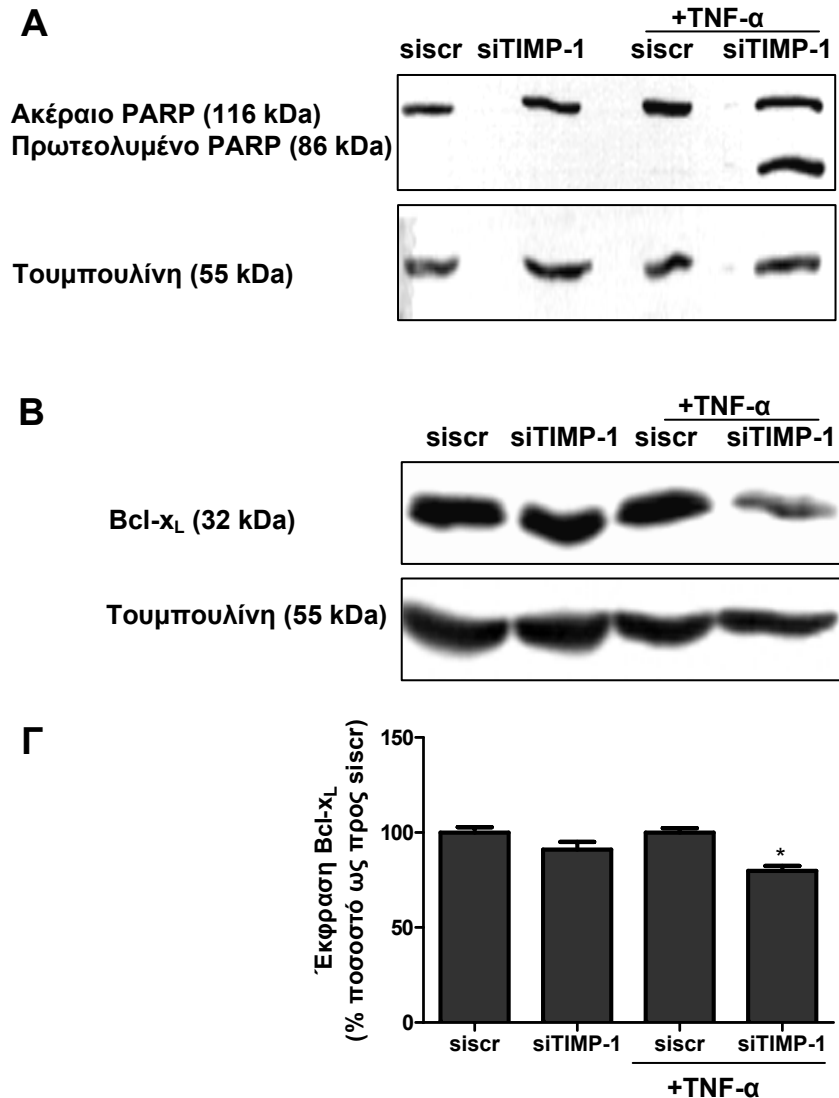
Αντίστοιχα τα ίδια δείγματα κυτταρικών λυμάτων από τα επεξεργασμένα κύτταρα MG63 αναλύθηκαν κατά Western με τη χρήση κατάλληλου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης BCL-X_L. Η πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων έναντι του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση της πρωτεΐνης BCL-X_L σε κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-TIMP-1 ή με την αλληλουχία siRNA-scr που αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα (**Εικόνα 33B, διαδρομές 1, 2**). Επίσης δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση του BCL-X_L σε κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA-scr και επεξεργάστηκαν με TNF-α (**Εικόνα 33B, διαδρομή 3**). Αντίθετα στα κύτταρα όπου είχε γίνει αποσιώπηση της έκφρασης του TIMP-1 και ακολούθως επεξεργάστηκαν με TNF-α παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L κατά 32% σε σύγκριση με το μάρτυρα όπου τα κύτταρα έχουν διαμολυνθεί με την αλληλουχία siRNA που δεν προκαλεί αποσιώπηση του TIMP-1 (**Εικόνα 33B, διαδρομή 4**).

Η πρωτεόλυση του υποστρώματος των κασπασών PARP υποδηλώνει την ενεργοποίηση των κασπασών, που είναι τα κύρια πρωτεολυτικά ένζυμα που

επιτελούν το φαινόμενο της απόπτωσης. Η πρωτεόλυση του PARP σε συνδυασμό με τη μείωση των επιπέδων του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L υποδεικνύουν ότι η επεξεργασία των κυττάρων όπου έχει αποσιωπηθεί ο TIMP-1 με TNF-α οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Συνεπώς, σε συνθήκες μειωμένης έκφρασης του TIMP-1 τα κύτταρα MG63 ευαισθητοποιούνται έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του TNF-α. Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύει περαιτέρω την υπόθεσή μας σχετικά με τη συμβολή του TIMP-1 στην προστασία των κυττάρων MG63 έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του TNF-α.



Εικόνα 32. Μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας σε συνθήκες αποσιώπησης του γονιδίου του TIMP-1 παρουσία TNF-α. Κύτταρα MG63 διαμολύνθηκαν με 1 μ g siRNA της αλληλουχίας αποσιώπησης του TIMP-1 (siTIMP-1) ή 1 μ g siRNA της αλληλουχίας που δεν προκαλεί αποσιώπηση κάποιου γονιδίου (siscr) και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α. Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με το διάλυμα MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό % ως προς τα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων απορρόφησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.



Εικόνα 33. Απόπτωση σε συνθήκες αποσιώπησης του γονιδίου του TIMP-1 παρουσία TNF-α. Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα ίσης συνολικής πρωτεΐνης από κύτταρα MG63 που διαμολύνθηκαν με 1 μ g siRNA της αλληλουχίας αποσιώπησης του TIMP-1 (siTIMP-1) ή 1 μ g siRNA της αλληλουχίας που δεν προκαλεί αποσιώπηση κάποιου γονιδίου (siscr) και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α. Κατόπιν, αναλύθηκαν σε 10 ή 12% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυταρίνης και έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακέραιης και πρωτεολυμένης μορφής του PARP σε αραιώση 1:1000 (A), ή με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης BCL-X_L σε αραιώση 1:100 (B). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραιώση 1:3000 (Γ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης BCL-X_L με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.

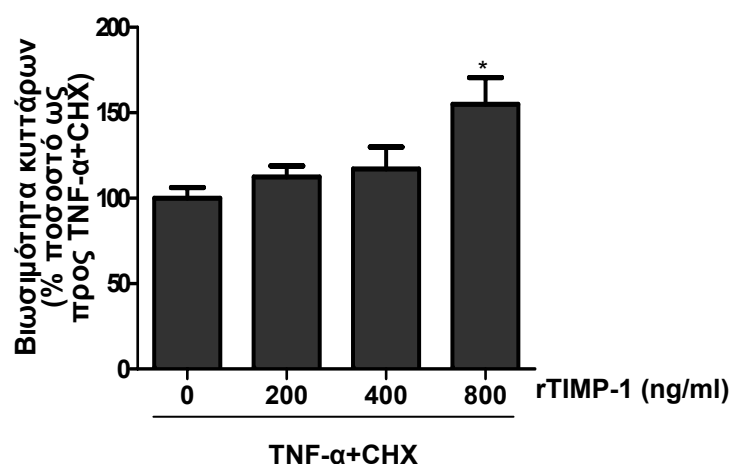
4.3.2 Προσθήκη TIMP-1 εξωγενώς μειώνει τα επίπεδα της απόπτωσης

Η προστατευτική δράση του TIMP-1 στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση μελετήθηκε περαιτέρω με τη χορήγηση εξωγενώς ανασυνδυασμένου ανθρώπινου TIMP-1 σε κύτταρα MG63 σε αποπτωτικές συνθήκες. Η προσθήκη εξωγενώς χορηγούμενου TIMP-1 έχει δείχτει ότι προστατεύει τις κυτταρικές σειρές MBA-1 (μυελού των οστών), UT-7 (ερυθρολευχαιμικά) και 32D (μυελωματικά) από απόπτωση (Boulday et al. 2004; Guo et al. 2006; Lambert et al. 2003).

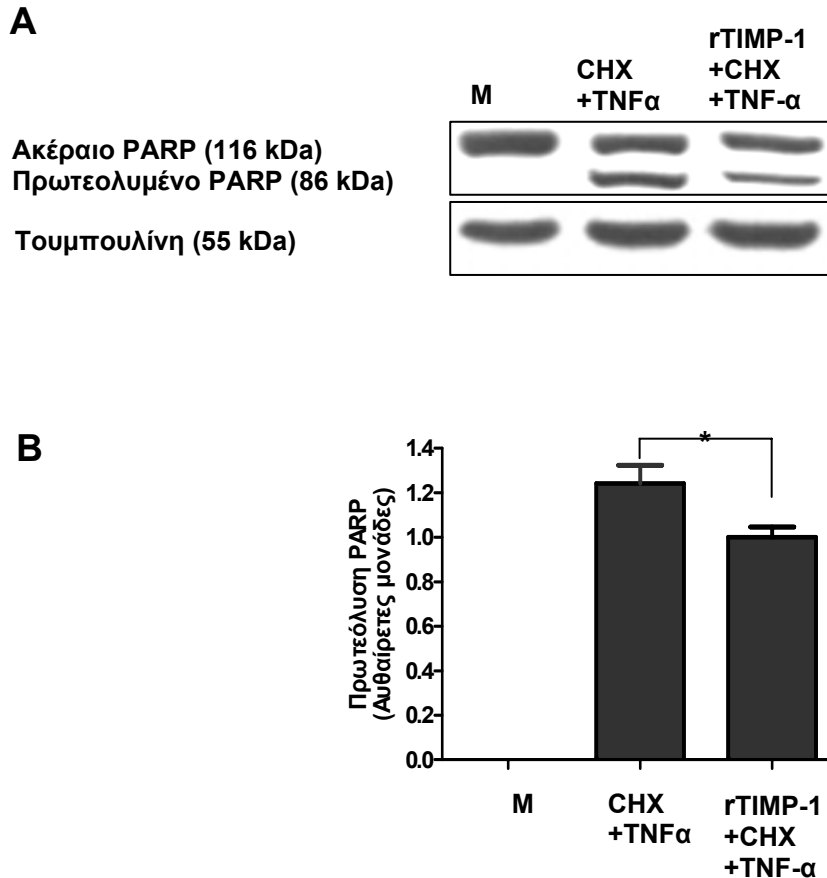
Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων εξωγενώς χορηγούμενου ανασυνδυασμένου TIMP-1 σε συνθήκες απόπτωσης (TNF-α+CHX) στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διάστημα 48 ωρών σε πλήρες θρεπτικό υλικό και για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε ορό. Στη συνέχεια προεπωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TIMP-1 (200 ng/ml, 400 ng/ml και 800 ng/ml) για 4 ώρες, με 5 μg/ml CHX για 1 ώρα και 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες. Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με το κατάλληλο διάλυμα MTT όπως περιγράφεται στις Μεθόδους και με τη χρήση κατάλληλου φασματοφωτόμετρου προσδιορίστηκε η ένταση του μπλε χρώματος των κρυστάλλων φορμαζάνης στα 570 nm. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η επώαση των κυττάρων MG63 με 800 ng/ml TIMP-1 πριν την προσθήκη των αποπτωτικών παραγόντων TNF-α+CHX αύξησε το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων κατά 35% σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν είχαν προεπωαστεί με ανασυνδυασμένο TIMP-1. Επομένως η προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης ανασυνδυασμένου TIMP-1 εξωγενώς μειώνει το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μετά από επεξεργασία τους με TNF-α+CHX (**Εικόνα 34**).

Ανάλογα συμπεράσματα προέκυψαν και κατά τη μελέτη των βιοχημικών δεικτών της απόπτωσης με πειράματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πρωτεόλυσης του PARP και έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L. Από την πυκνομετρική ανάλυση του ανοσοστυπώματος της **Εικόνας 35** παρατηρείται ότι προσθήκη του ανασυνδυασμένου TIMP-1 συντελεί σε αναστολή της απόπτωσης κατά 19%, όπως πιστοποιείται από το μειωμένο ποσοστό του πρωτεολυμένου PARP (**Εικόνα 35, σύγκριση διαδρομών 2 και 3**) και την αύξηση της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L κατά 38% (**Εικόνα 36, σύγκριση διαδρομών 2 και 3**).

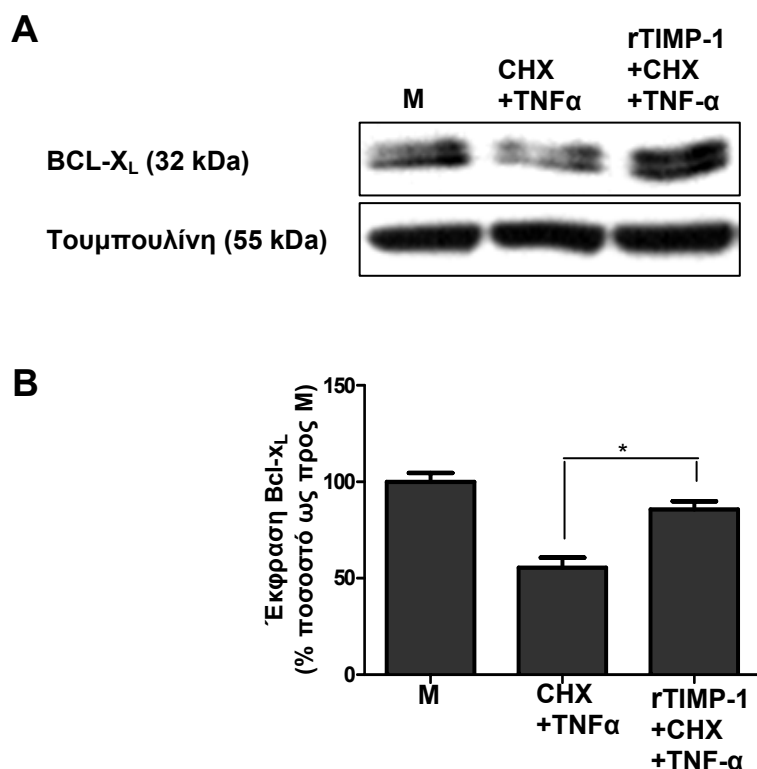
Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η χορήγηση TIMP-1 εξωγενώς στα κύτταρα MG63 προκαλεί επαγωγή της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L και μείωση του ποσοστού πρωτεόλυσης του PARP σε σύγκριση με τα κύτταρα MG63 που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες απόπτωσης (TNF-α+CHX). Η πρωτεόλυση του PARP είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κασπασών, δηλαδή των ενζύμων που μεσολαβούν την απόπτωση. Κατά συνέπεια η επεξεργασία των κυττάρων με TIMP-1 στις αποπτωτικές συνθήκες μειώνει το ποσοστό πρωτεόλυσης του PARP και αυτό συνδέεται με μείωση του ποσοστού ενεργοποίησης των κασπασών και επαγωγή της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L.



Εικόνα 34. Αύξηση του ποσοστού της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία rTIMP-1 σε συνθήκες απόπτωσης. Κύτταρα MG63 προεπώαστηκαν ή όχι με διάφορες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TIMP-1 (200-800 ng/ml) πριν την επαγωγή της απόπτωσης με συνδυασμό 5 μ g CHX και 100 ng/ml TNF- α . Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με το διάλυμα MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό % ως προς τα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων απορρόφησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.



Εικόνα 35. Μείωση του ποσοστού της απόπτωσης παρουσία rTIMP-1 με βάση το ποσοστό πρωτεόλυσης του PARP. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που προεπώαστηκαν με 800 ng/ml ανασυνδυασμένης TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες (5 μg/ml CHX+100 ng/ml TNF-α), αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακέραιας και της πρωτεολυμένης μορφής του PARP σε αραίωση 1:1000. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραίωση 1:3000. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων του θραύσματος μεγέθους 86 kDa που προκύπτει από την πρωτεόλυση του PARP. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.



Εικόνα 36. Μείωση του ποσοστού της απόπτωσης παρουσία rTIMP-1 με βάση την έκφραση του BCL-X_L. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που προεπώαστηκαν με 800 ng/ml ανασυνδυασμένης TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες (5 μ g/ml CHX+100 ng/ml TNF- α), αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης BCL-X_L σε αραιώση 1:200. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραιώση 1:3000. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης BCL-X_L με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): στατιστικά σημαντική διαφορά, $p < 0.05$.

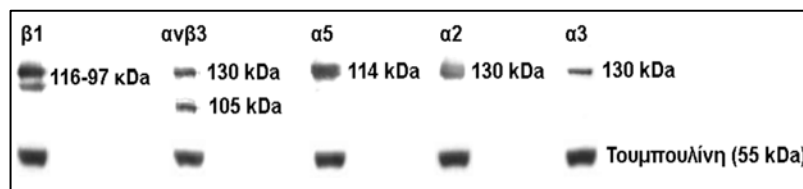
4.4 Οι ιντεγκρίνες στη διαμεσολαβούμενη από τον TIMP-1 προστασία των κυττάρων MG63 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης

4.4.1 Επίδραση του TNF-α στην έκφραση των ιντεγκρινών

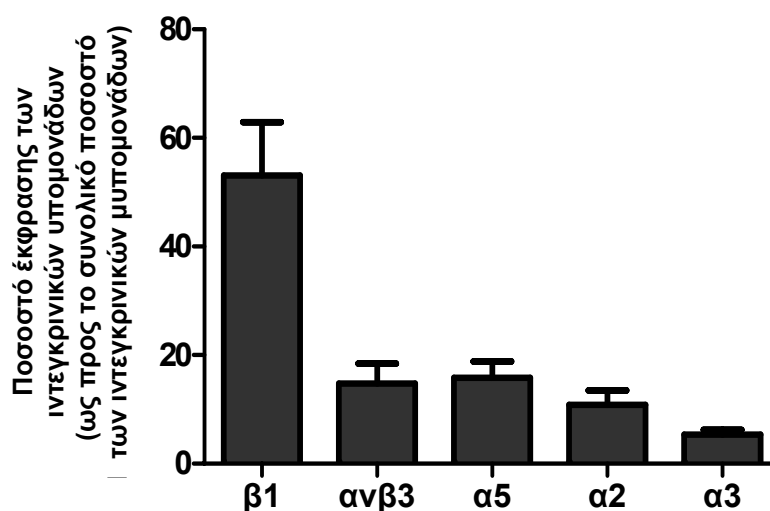
Η ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών από μόρια του εξωκυττάρου χώρου εξαρτάται από τη σύνδεση των μορίων αυτών με κατάλληλους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και την επακόλουθη ενεργοποίηση κατάλληλων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς υποδοχείς οι οποίοι αποτελούνται από μία α και μία β υπομονάδα και ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική μετανάστευση (Duan et al. 2004). Η προστατευτική δράση της ιντεγκρίνης $\beta 1$ έναντι της επαγόμενης από τον TNF- α απόπτωσης σε κύτταρα από καρκίνο του προστάτη σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων έκφρασης της επιβιτίνης, ενώ η προστασία της ανβ3 έναντι της επαγόμενης από τον TNF- α απόπτωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα συνδέεται με ενεργοποίηση της AKT/PKB αλλά όχι του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB (Bieler et al. 2007; Fornaro et al. 2003).

Δεδομένου ότι διάφοροι τύποι κυττάρων εκφράζουν διαφορετικά ετεροδιμερή ιντεγκρινών, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανοσοδοκιμασία κατά Western προσδιορίστηκαν οι κύριες ιντεγκρινικές υπομονάδες που εκφράζουν τα συγκεκριμένα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των ιντεγκρινικών υπομονάδων $\alpha 2$ (P1E6), $\alpha 3$ (P1B5), $\beta 1$ (P5D2), $\alpha 5$ (P1D6) και έναντι του ιντεγκρινικού υποδοχέα ανβ3 (LM609). Από την πυκνομετρική ανάλυση του ανοσοστυπώματος της **Εικόνας 37** διαπιστώθηκε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν κυρίως την υπομονάδα $\beta 1$ σε ποσοστό 53% και λιγότερο τις ιντεγκρινικές υπομονάδες $\alpha 5$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ και την ιντεγκρίνη ανβ3 σε ποσοστό 5-16%, (όπου το 100% αντιστοιχεί στο συνολικό ποσοστό των ιντεγκρινικών υπομονάδων).

A



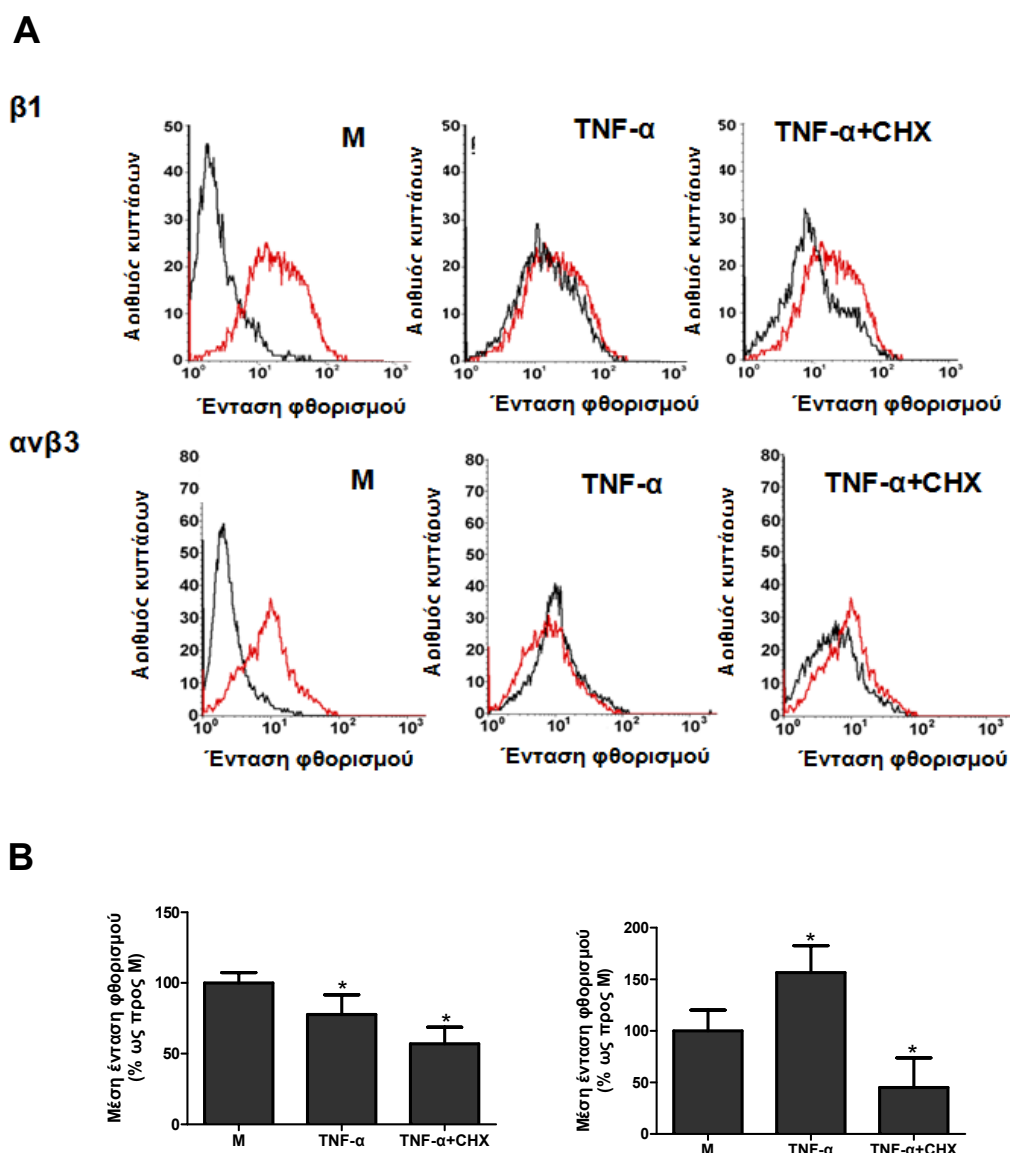
B



Εικόνα 37. Προσδιορισμός των κυριότερων ιντεγκρινικών υπομονάδων που εκφράζουν τα κύτταρα MG63. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63, αναλύθηκαν σε 7.5% SDS-PAGE κάτω από μη αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυταρίνης και έμμεσος ανοσοεντοπισμός με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των ιντεγκρινικών υπομονάδων β1 (P5D2), α5 (P1D6), α2 (P1E6), α3 (P1B5) και της ιντεγκρίνης ανβ3 (LM609). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β1 (P5D2) χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:1000 ενώ τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των α5 (P1D6), α2 (P1E6), α3 (P1B5) και ανβ3 (LM609), χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:100. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:3000. (B) Γραφική απεικόνιση του ποσοστού έκφρασης των ιντεγκρινικών υπομονάδων.

Στη συνέχεια της μελέτης, με τη χρήση των κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων και της κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκαν σε συνθήκες απόπτωσης, οι ιντεγκρινικές υπομονάδες β1 και ανβ3 που εκφράζουν τα κύτταρα MG63 και για τις οποίες έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν σε μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης (Bieler et al. 2007; Fornaro et al. 2003). Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλη αραίωση που επιτρέπει τον πλήρη κορεσμό των επιτόπων: το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρινικής υπομονάδας β1 (P5D2) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 2 μg/ml, ενώ εκείνο έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 (LM609) σε συγκέντρωση 10 μg/ml.

Με βάση την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, στη συγκέντρωση κορεσμού για το κάθε αντίσωμα, διαπιστώθηκε ότι η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TNF-α για 24 ώρες προκάλεσε μείωση στα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρινικής υπομονάδας β1 κατά 22% σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ η έκφραση της ανβ3 ιντεγκρίνης αυξήθηκε κατά 56% σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 38**). Η παραπάνω παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ενός είδους αμφι-επικοινωνίας μεταξύ των ιντεγκρινικών υπομονάδων που είναι συνήθης στην κυτταρική επιφάνεια (Retta et al. 2001; Defilles et al. 2009). Συγκεκριμένα πιστεύεται ότι σε συνθήκες στρες, τα κύτταρα αντιδρούν στη μείωση της έκφρασης της β1 προκαλώντας την αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της ανβ3 ή άλλων ιντεγκρινών, προκειμένου να αναπληρώσουν τη λειτουργία της. Παρουσία CHX τα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, ενώ σε συνθήκες απόπτωσης (TNF-α+CHX) μειώθηκαν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης τόσο της β1 όσο και της ανβ3 κατά 43% και 55% αντίστοιχα, σε σύγκριση με κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί απουσία των παραγόντων (**Εικόνα 38**).



Εικόνα 38. Διαφοροποίηση της έκφρασης των ιντεγκρινών β1 και ανβ3 παρουσία TNF-α στην επιφάνεια των κυττάρων MG63. (Α) Κύτταρα MG63 που επωάστηκαν ή όχι με CHX για 1 ώρα και καλλιιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία 100 ng/ml TNF-α για 24 ώρες, επεξεργάστηκαν με τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της β1 ιντεγκρινικής υπομονάδας (P5D2) σε αραιώση 1:400 και της ιντεγκρίνης ανβ3 (LM609) σε αραιώση 1:100. Ως δευτερεύον αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικού, το οποίο ήταν συζευγμένο με φλουορεσκίνη (FITC). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής FACSscan (Becton Dickinson), με τη χρήση του λογισμικού CELL QUEST. (Β): Ποσοστό % της μέσης έντασης φθορισμού των θετικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή έντασης φθορισμού $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.

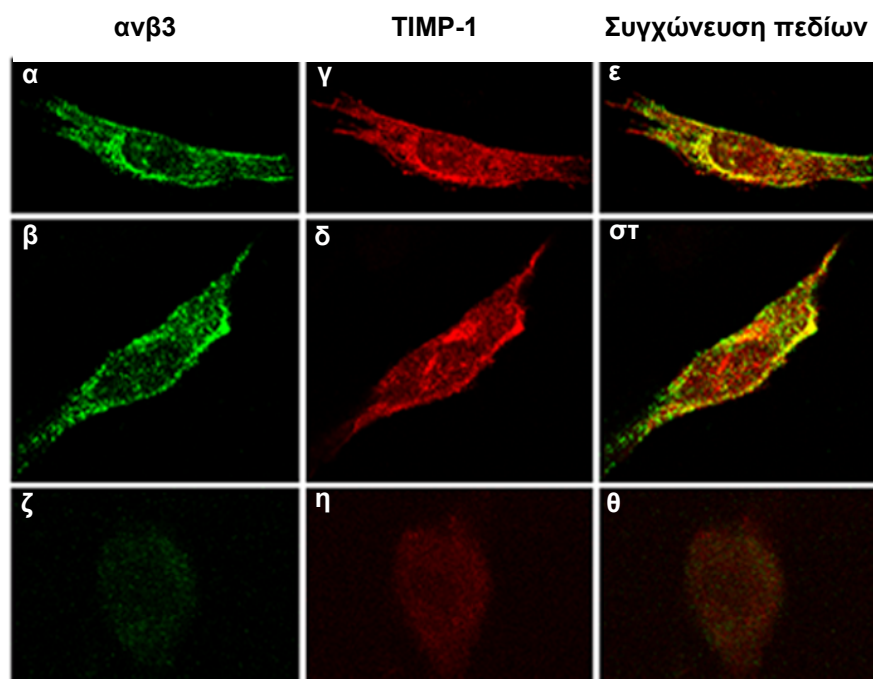
4.4.2 Συνεντοπισμός του TIMP-1 με την ανβ3 στην κυτταρική επιφάνεια

Η εξακρίβωση της προστατευτικής δράσης του TIMP-1 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης, οδήγησε στην αναζήτηση του κατάλληλου υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη η αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 σε κύτταρα μαστού MCF10A εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του TIMP-1 με το σύμπλοκο ιντεγκρίνη β1-τετρασπανίνη CD63 της κυτταρικής επιφάνειας που επιτρέπει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β1 ιντεγκρίνης (Jung et al. 2006). Επειδή, όπως προαναφέρθηκε, και ο ιντεγκρινικός υποδοχέας ανβ3 συμμετέχει στην κυτταρική επιβίωση (Duan et al. 2004; Fukai et al. 1998; Bieler et al. 2007), η μελέτη επικεντρώθηκε στη διερεύνηση του ρόλου της ανβ3 ως πιθανού συνδέτη του TIMP-1 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63 καθώς και στην εμπλοκή της ανβ3 στην αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1.

Ο πιθανός συνεντοπισμός του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63 διερευνήθηκε με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού που επιτρέπει το λεπτομερή εντοπισμό των κυτταρικών πρωτεϊνών. Ο ανοσοεντοπισμός του TIMP-1 και της ιντεγκρίνης ανβ3 πραγματοποιήθηκε απουσία ουσιών (π.χ. μεθανόλης, απορρυπαντικών) που αυξάνουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών (non-permeabilized cells) και μετά από επώαση των κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανβ3 (**Εικόνα 39, α-β**) και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 (**Εικόνα 39, γ-δ**) καθώς και των δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με AlexaFluor 488 (πράσινη φθορίζουσα ουσία) και AlexaFluor 568 (κόκκινη φθορίζουσα ουσία) αντίστοιχα. Για την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανάπτυξης της τεχνικής με τη διαφορά ότι τα κύτταρα επώαστηκαν διαδοχικά και με τα δύο πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα όπως αναλυτικά αναφέρεται και στις μεθόδους.

Η παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι η ιντεγκρίνη ανβ3 και ο αναστολέας TIMP-1 συνεντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως δείχνεται και από τη συγχώνευση των αντίστοιχων οπτικών πεδίων (**Εικόνα 39, ε-στ**). Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα του μη ειδικού φθορισμού, τα κύτταρα επώαστηκαν με μη ειδικό αντίσωμα έναντι του ποντικού και το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα AlexaFluor 488 έναντι του ποντικού όπως επίσης, με μη ειδικό αντίσωμα έναντι του κουνελιού και το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα AlexaFluor 568 έναντι του κουνελιού (**Εικόνα 39, ζ-η**). Η παρατήρηση στο

συνεστιακό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι τα κύτταρα MG63 έχουν μικρό ποσοστό φθορισμού όταν επωαστούν με μη ειδικά πρωτογενή αντισώματα γεγονός που αποκλείει τον μη ειδικό φθορισμό. Αντίστοιχα, η συγχώνευση των παραπάνω πεδίων αποκάλυψε πολύ μικρό ποσοστό φθορισμού (**Εικόνα 39, συγχώνευση θ**). Συνεπώς, ο συνεντοπισμός μεταξύ ανβ3 και TIMP-1 είναι ειδικός, καθώς δεν παρατηρείται φθορισμός με την επεξεργασία των κυττάρων MG63 με μη ειδικά αντισώματα.



Εικόνα 39. Συνεντοπισμός της ιντεγκρίνης ανβ3 και του TIMP-1 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63 με συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν, είτε με το μονοκλωνικό αντίσωμα LM609 έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 (α-β), είτε με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 (γ-δ) σε αραίωση 1:100 και ακολούθως με τα δευτερογενή αντισώματα AlexaFluor488 έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού και AlexaFluor568 έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού αντίστοιχα σε αραίωση 1:500. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μη ειδικές ανοσοσφαιρίνες ποντικού ή κουνελιού ώστε να ελεγχθεί ο αυτοφθορισμός των κυττάρων και η μη ειδική δέσμευση των δευτερογενών αντισωμάτων (ζ-η). Τα πεδία ε-στ-θ αντιστοιχούν σε συγχώνευση των αντίστοιχων οπτικών τομών. Οι παρατηρήσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο της Bio-Rad (MRC 1024ES) με καθορισμένες ρυθμίσεις (άνοιγμα ίριδας: 2.2, φίλτρο Kalman: 5, Gain: ~1000, Black Level: 4-5). Για την επεξεργασία των εικόνων που προέκυψαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Confocal Assistant.

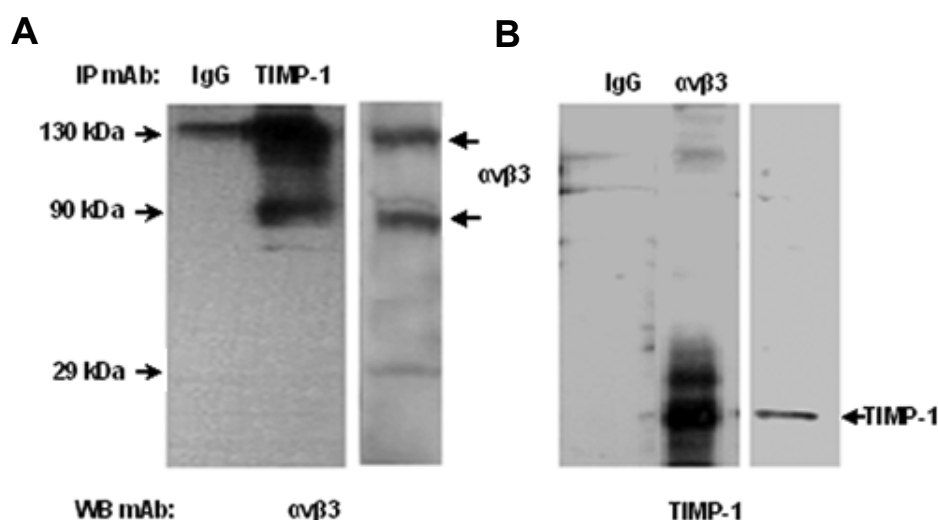
4.4.3 Διασύνδεση του TIMP-1 με την ανβ3

Η πιθανή αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης ανβ3 με τον TIMP-1 στα κύτταρα μελετήθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Συγκεκριμένα τα κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 6 φρεατίων με πλήρες θρεπτικό υλικό και συλλέχθηκαν δείγματα υλικού καλλιέργειας. Τα δείγματα αυτά επώαστηκαν με τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του TIMP-1 ή έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG κουνελιού (αρνητικός μάρτυρας), προκειμένου να σχηματιστούν τα ανοσοσύμπλοκα. Για την απομόνωση των σχηματισμένων ανοσοσυμπλόκων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A. Τα σφαιρίδια σεφαρόζης με τα δεσμευμένα ανοσοσύμπλοκα επώαστηκαν με προϊόντα κυτταρικής λύσης για 2 ώρες στους 4 °C. Τα ανακτώμενα ανοσοσύμπλοκα αναλύθηκαν με ανοσοδοκιμασία κατά Western με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 και προέκυψε ότι ο TIMP-1 συν-κατακρημνίζει δύο ζώνες 130 και 90 kDa που αντιστοιχούν στις ιντεγκρινικές υπομονάδες αν και β3 (Εικόνα 40, διαδρομή 2). Αντίθετα τα δείγματα υπερκειμένων μέσω καλλιέργειας που επώαστηκαν με το αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgG δε συγκατακρημνίζουν την ιντεγκρίνη ανβ3 (Εικόνα 40, διαδρομή 1). Τα ολικά επίπεδα της ανβ3 για κάθε πειραματική δοκιμασία ελέγχθηκαν με ανάλυση κατά Western κατά την οποία κυτταρικά εκχυλίσματα ανοσοαποτυπώθηκαν με αντίσωμα έναντι της ανβ3 (Εικόνα 40, διαδρομή 3).

Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης επαναλήφθηκε και σε προϊόντα κυτταρικής λύσης. Τα κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 6 φρεατίων με πλήρες θρεπτικό υλικό και υπέστησαν λύση με κατάλληλο διάλυμα κυτταρικής λύσης. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 ή έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG ποντικού (αρνητικός μάρτυρας) (Εικόνα 40, διαδρομή 4). Για την απομόνωση των σχηματισμένων ανοσοσυμπλόκων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια σεφαρόζης όπου ήταν δεσμευμένα τα ανοσοσύμπλοκα επώαστηκαν με δείγματα υλικού κυτταρικής καλλιέργειας για 2 ώρες στους 4 °C και τα ανακτώμενα ανοσοσύμπλοκα αναλύθηκαν με ανοσοδοκιμασία κατά Western με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του TIMP-1. Από την ανοσοαποτύπωση προέκυψε ότι η ιντεγκρίνη ανβ3 συν-κατακρημνίζει από τα δείγματα υπερκειμένων

κυτταρικής καλλιέργειας τον εκκρινόμενο αναστολέα TIMP-1 (Εικόνα 40, διαδρομή 5). Τα ολικά επίπεδα του TIMP-1 για κάθε πειραματική δοκιμασία ελέγχθηκαν με ανάλυση κατά Western κατά την οποία υπερκείμενα καλλιέργειας ανοσοαποτυπώθηκαν με το κατάλληλο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 (Εικόνα 40, διαδρομή 6).

Με την παραπάνω πειραματική διαδικασία προέκυψαν αποτελέσματα που υποδεικνύουν τη διασύνδεση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3. Επειδή, όπως έχει περιγραφεί, η διασύνδεση του TIMP-1 με τη β1 ιντεγκρινική υπομονάδα μεσολαβείται από την τετρασπανίνη CD63 της κυτταρικής επιφάνειας, αντίστοιχα δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα αν είναι άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63. Τελικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ του TIMP-1 και της ιντεγκρίνης ανβ3 στην κυτταρική επιφάνεια μελετήθηκε περαιτέρω σχετικά με το λειτουργικό της ρόλο.



Εικόνα 40: Διασύνδεση του TIMP-1 και της ιντεγκρίνης αvβ3 στην κυτταρική επιφάνεια με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. (A) Δείγματα υλικού καλλιέργειας κυττάρων MG63 συμπυκνώθηκαν και επωάστηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 ή έναντι των ανοσοσφαιρινών κουνελιού ως αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να σχηματιστούν τα ανοσοσύμπλοκα. Ακολούθως, τα ανοσοσύμπλοκα κατακρημνίστηκαν με σφαιρίδια σεφαρόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A και επωάστηκαν με εκχυλίσματα κυττάρων MG63. Τα ανοσοσύμπλοκα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης αvβ3. Τα ολικά επίπεδα της ιντεγκρίνης αvβ3 σε κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση με κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα. (B) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα επωάστηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης αvβ3 ή έναντι των ανοσοσφαιρινών ποντικού ως αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να σχηματιστούν τα ανοσοσύμπλοκα. Ακολούθως, τα ανοσοσύμπλοκα κατακρημνίστηκαν με σφαιρίδια σεφαρόζης συζευγμένα με πρωτεΐνη A και επωάστηκαν με συμπυκνωμένα υπερκείμενα καλλιέργειας. Τα ανοσοσύμπλοκα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1. Τα ολικά επίπεδα του TIMP-1 σε υπερκείμενα υλικού καλλιέργειας ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση με κατάλληλο πολυκλωνικό αντίσωμα.

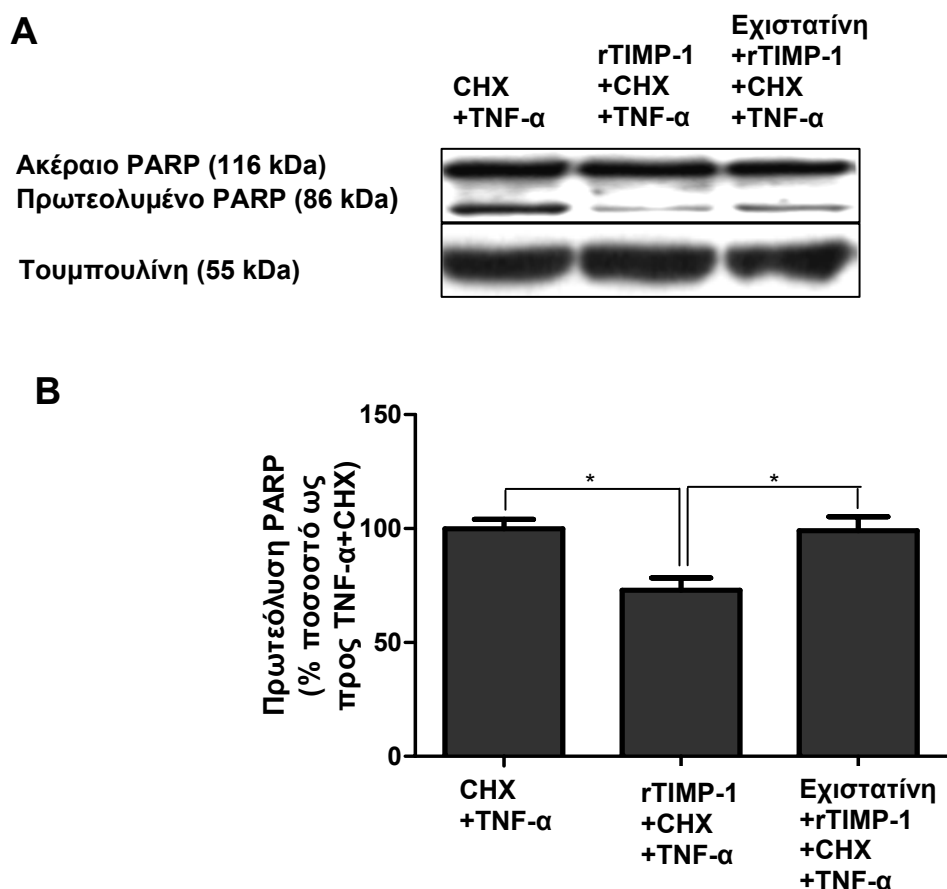
4.4.4 Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της αλληλεπίδρασης TIMP-1-ανβ3 στην απόπτωση

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος της αλληλεπίδρασης του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 χρησιμοποιήθηκαν μόρια με δράση αναστολής της αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν, ο ειδικός αναστολέας των ιντεγκρινών ανβ3/ανβ5 εχιστατίνη - ο οποίος παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ TIMP-1 και ιντεγκρίνης ανβ3 - και ακόμη το μονοκλωνικό αντίσωμα LM609 έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3, το οποίο δρα ως ειδικός προσδέτης. Η εχιστατίνη και το αντίσωμα LM609 έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχες ερευνητικές δημοσιεύσεις με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της ιντεγκρίνης ανβ3 στη ρύθμιση της απόπτωσης (Zhou et al. 2004).

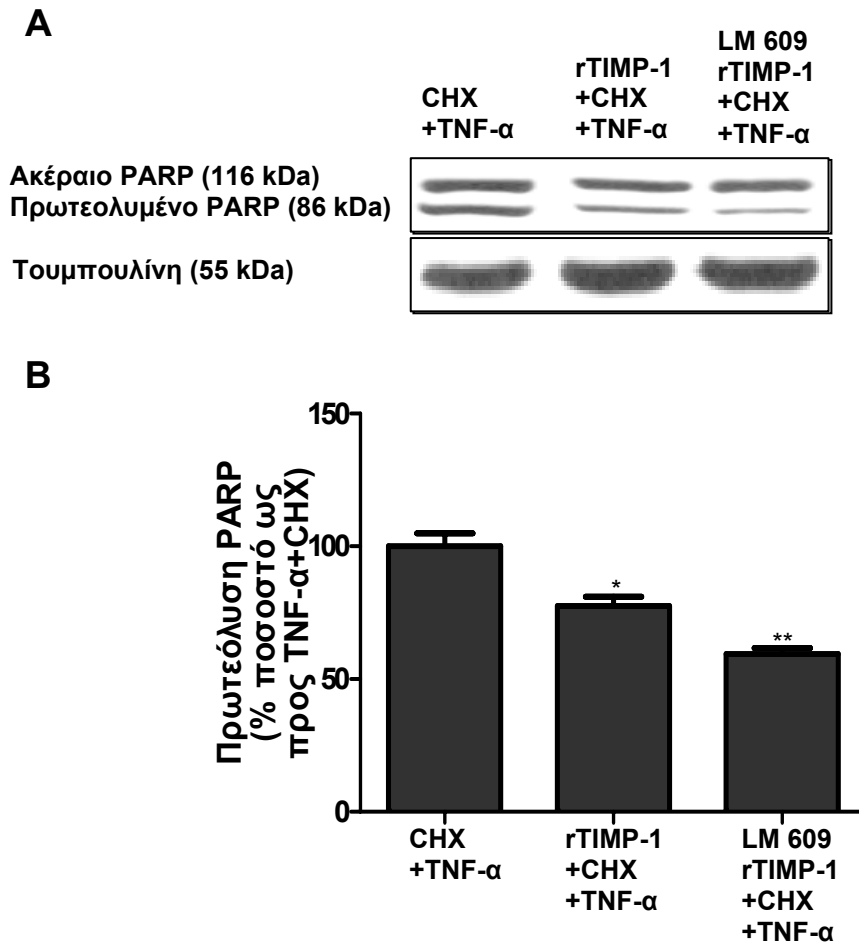
Για τη βιοχημική μελέτη της απόπτωσης, τα κύτταρα MG63 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 12 φρεατίων σε πλήρες θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε ορό. Ακολούθως, στα φρεάτια αναφοράς προστέθηκαν, εχιστατίνη (100 nM) ή το αντίσωμα έναντι της ανβ3 (10 µg/ml) για 1 ώρα και ανασυνδυασμένος TIMP-1 (800 ng/ml) για 4 ώρες, και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες απόπτωσης όπως έχει ήδη περιγραφεί (TNF-α +CHX) για 24 ώρες. Τα κύτταρα υπέστησαν λύση και στα παραπάνω δείγματα κυτταρικών λυμάτων ακολούθησε ανάλυση τύπου Western. Αρχικά προσδιορίστηκε το ποσοστό πρωτεόλυσης του PARP και από την πυκνομετρική ανάλυση του ανοσοστυπώματος της **Εικόνας 41** παρατηρήθηκε ότι παρουσία εχιστατίνης και TIMP-1 το ποσοστό πρωτεόλυσης του PARP αυξήθηκε κατά 23% σε σύγκριση με αυτό απουσία της εχιστατίνης, υποδεικνύοντας τη μερική αναστολή της προστατευτικής δράσης του TIMP-1 από την εχιστατίνη (**Εικόνα 41, διαδρομές 2 και 3**). Αντίθετα, στο δείγμα των κυττάρων που είχε προεπωαστεί με το αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 και ανασυνδυασμένο TIMP-1, παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση του πρωτεολυμένου PARP κατά 25% σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν επεξεργαστεί μόνο με ανασυνδυασμένο TIMP-1 (**Εικόνα 42, διαδρομές 2 και 3**).

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων με MTT στις ίδιες πειρατικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία του αντισώματος LM609 η προστατευτική δράση του TIMP-1 ενισχύθηκε σε σχέση με τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 25%. Αντίθετα τα δείγματα των κυττάρων που είχαν προεπωαστεί με την εχιστατίνη

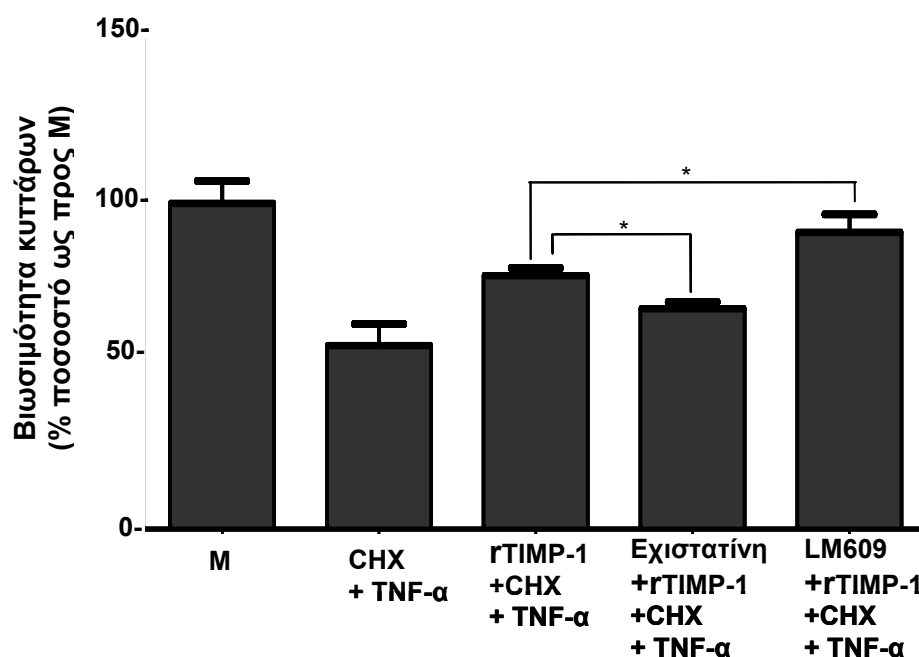
πριν την επεξεργασία με τον ανασυνδυασμένο TIMP-1, δεν παρουσίασαν αύξηση στο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων παρουσία του ανασυνδυασμένου TIMP-1 (Εικόνα 43).



Εικόνα 41. Μερική αναστολή της προστατευτικής δράσης του TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες παρουσία της εχιστατίνης. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που προεπώαστηκαν παρουσία ή απουσία 100 nM εχιστατίνης πριν την επεξεργασία με 800 ng/ml ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες (5 µg/ml CHX+100 ng/ml TNF-α), αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακέραιας και της πρωτεολυμένης μορφής του PARP σε αραίωση 1:1000. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραίωση 1:3000. (B) Ποσοτικοποίηση του ποσοστού πρωτεόλυσης του PARP με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$.



Εικόνα 42. Ενίσχυση της προστατευτικής δράσης του TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες παρουσία του μονοκλωνικού αντισώματος LM609. (A) Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα ολικής πρωτεΐνης και προέρχονταν από κύτταρα MG63 που προεπώαστηκαν παρουσία ή απουσία 10 µg/ml LM609 πριν την επεξεργασία με 800 ng/ml ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες (5 µg/ml CHX+100 ng/ml TNF-α), αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυταρίνης και έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακέραιας και της πρωτεολυμένης μορφής του PARP σε αραιώση 1:1000. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης σε αραιώση 1:3000. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων πρωτεόλυσης του PARP με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$. (**): $p < 0.01$.

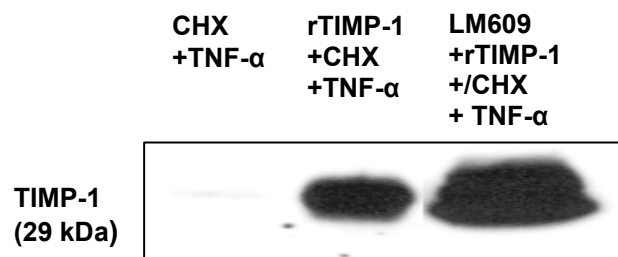


Εικόνα 43. Προσδιορισμός του ποσοστού της βιωσιμότητας των κυττάρων σε αποπτωτικές συνθήκες παρουσία rTIMP-1 και αναστολέων των ιντεγκρινών. Κύτταρα MG63 επώαστηκαν παρουσία ή απουσία των αναστολέων 100 nM εχιστατίνης ή 10 µg/ml αντισώματος LM609 πριν την επαγωγή της απόπτωσης με συνδυασμό 5 µg/ml CHX και 100 ng/ml TNF-α. Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με το διάλυμα MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό % ως προς τα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων απορρόφησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): $p < 0.05$

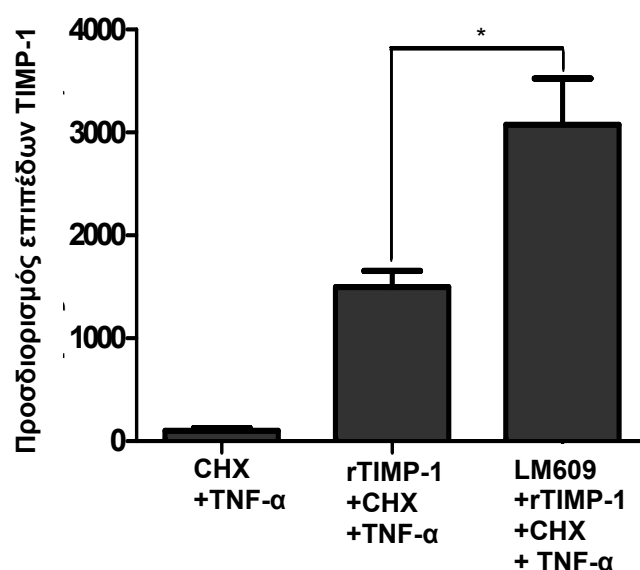
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει εύλογα το ερώτημα για το ρόλο του αντισώματος LM609 κατά την απόπτωση των κυττάρων. Η διερεύνηση του παραπάνω φαινομένου πραγματοποιήθηκε με τη μελέτη των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1. Συγκεκριμένα τα υπερκείμενα καλλιέργειας από τα παραπάνω δείγματα κυττάρων υποβλήθηκαν σε ανάλυση τύπου Western. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων. Σύμφωνα με την πυκνομετρική ανάλυση του ανοσοστυπώματος της **Εικόνας 44** παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 στα κύτταρα που είχαν προεπωαστεί με το αντίσωμα LM609 κατά 105%.

Συμπερασματικά, η προεπώαση των κυττάρων με την εχιστατίνη εν μέρει αναστέλλει την προστατευτική δράση του ανασυνδυσμένου TIMP-1. Όμως η προεπώαση των κυττάρων με το αντίσωμα LM609 επάγει την έκκριση του TIMP-1 και ενισχύει την αντι-αποπτωτική δράση του. Κατά συνέπεια η εχιστατίνη δρα ως αναστολέας της λειτουργίας της ιντεγκρίνης ανβ3, πιθανόν διότι παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του TIMP-1 και της ιντεγκρίνης ανβ3. Αυτό προκύπτει με βάση το ποσοστό της βιωσιμότητας και το ποσοστό πρωτεόλυσης του PARP. Όμως δε συμβαίνει το ίδιο με το αντίσωμα LM609 το οποίο δρα ως προσδέτης ο οποίος ενεργοποιεί και επάγει σηματοδοτικό μονοπάτι από την ιντεγκρίνη ανβ3, το οποίο καταλήγει στην αύξηση των επιπέδων του εκκρινόμενου TIMP-1.

A



B



Εικόνα 44. Αύξηση των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες παρουσία του μονοκλωνικού αντισώματος LM609. (A) Κύτταρα MG63 επωάστηκαν παρουσία ή απουσία 10 µg/ml LM609 πριν την επεξεργασία με 800 ng/ml ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TIMP-1 σε αποπτωτικές συνθήκες (5 µg/ml CHX+100 ng/ml TNF-α). Δείγματα υλικού καλλιέργειας που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων συμπυκνώθηκαν και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE κάτω από αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του TIMP-1 σε αραιώση 1:500. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης TIMP-1 με πυκνομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή αυθαίρετων μονάδων πυκνομέτρησης $\pm$ S.D. από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (*): στατιστικά σημαντική διαφορά, $p < 0.05$.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Ρύθμιση της έκφρασης-έκκρισης των MMPs και TIMPs από μόρια του μικροπεριβάλλοντος του οστού

Ο οστίτης ιστός είναι ένας πολύ σημαντικός και δυναμικός ιστός, αφού συνεχώς ανακατασκευάζεται από τη συντονισμένη δράση οστεοβλαστών-οστεοκλαστών. Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ οστεοβλαστών-οστεοκλαστών όσον αφορά τον αριθμό και τη δράση τους είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της οστικής μάζας που σε ενήλικα άτομα παραμένει σταθερή. Αντίθετα, σε παθολογικές περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από μειωμένη οστική μάζα απαιτείται όχι μόνο αναστολή της αποικοδόμησης του οστού, αλλά ταυτόχρονη αύξηση του σχηματισμού νέου οστού. Οι οστεοβλάστες, αφού σχηματιστεί το οστό, είτε ενσωματώνονται στην εξωκυττάρια μήτρα, είτε οδηγούνται σε απόπτωση. Επομένως, για τη διατήρηση της οστικής μάζας στον ενήλικα είναι κρίσιμη η ρύθμιση του πλήθους των κυττάρων του οστού, η οποία εν μέρει εξαρτάται από την απόπτωση. Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που μεσολαβείται από τις κασπάσες και προκαλεί μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στο κύτταρο.

Ένας καθοριστικός παράγοντας για τον έλεγχο της απόπτωσης οστεοβλαστών-οστεοκλαστών είναι η δράση μορίων που εκκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του οστού, μεταξύ των οποίων οι κυτταροκίνες. Για παράδειγμα έχειδειχτεί ότι οι κυτταροκίνες του τύπου της IL-6 αναστέλλουν την απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (Bellido et al. 1998). Οι κυτταροκίνες του ανοσοποιητικού συστήματος αποτυπώνουν την άμεση αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού και του σκελετικού συστήματος η οποία περιγράφεται από τον όρο «ανοσολογία του οστού» (Arron and Choi 2000). Τα μόρια αυτά εκκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του οστού και εμπλέκονται στην ανακατασκευή του εν μέρει μέσω της ρύθμισης της έκφρασης-έκκρισης ενζύμων που παράγονται από τους οστεοκλάστες και συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του οστού όπως οι MMPs.

Οι MMPs, αν και αρχικά είχε θεωρηθεί ότι συμμετέχουν κυρίως στην ομοιοστάση της εξωκυττάριας μήτρας και την πρωτεόλυση συστατικών της, σύμφωνα με πρόσφατα ερευνητικά ευρήματα ρυθμίζουν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια στο κύτταρο καθώς αλληλεπιδρούν με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και η αναδόμηση του ιστού, η επούλωση της πληγής, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη και η μετάσταση του καρκινικού όγκου, η φλεγμονή, τα αυτοάνοσα νοσήματα, η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση (Nagase 1997). Η ενζυμική δραστηριότητά τους ρυθμίζεται μέσω της έκκρισης ειδικών αναστολέων των MMPs, των TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Εξάλλου, αναφορές αποδίδουν στους TIMPs εκτός από την αναστολή των MMPs και άλλες ιδιότητες όπως ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι ο TIMP-1 αναστέλλει την απόπτωση σε διάφορα είδη κυττάρων (Lambert et al. 2004).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της κυτταροκίνης TNF- α , η οποία εκκρίνεται στο μικροπεριβάλλον του οστού, στην έκφραση των μεταλλοπρωτεασών και των αναστολέων τους και η περαιτέρω συσχέτιση του ρόλου της με το φαινόμενο της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η συμβολή του TIMP-1 στην προστασία από την επαγόμενη από τον TNF- α απόπτωση.

Επειδή σήμερα δεν υπάρχουν ικανοποιητικά εργαλεία και μέθοδοι προκειμένου να ξεπεραστούν οι αντικειμενικές δυσκολίες στην απομόνωση και τη διατήρηση των πρωτογενών καλλιιεργειών οστεοβλαστικών κυττάρων, ως σύστημα μελέτης επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος ανθρώπου MG63. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μοντέλο για τη μελέτη των οστεοβλαστών, αν και πολλαπλασιάζονται με ταχύτερο ρυθμό σε καλλιέργεια. Επίσης, παρουσιάζουν αυξημένη δράση αλκαλικής φωσφατάσης μετά τη χορήγηση 1,25-διυδροξυ βιταμίνης D3 όπως και οι πρωτογενείς οστεοβλάστες, και ακόμη εκφράζουν προσδέτες/υποδοχείς όπως TNF- α /TNF-R1, FASL/FAS, TWEAK/DR3, TRAIL/DR4, DR5, OPG, (Matsuyama et al. 2003; Bu et al. 2003; Clover and Gowen 1994; Pautke et al. 2004). Για τη μελέτη της επίδρασης των παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος του οστού στην έκφραση των MMPs και TIMPs καθώς και στο φαινόμενο της απόπτωσης, επιλέχθηκαν παράγοντες που

εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον του οστού: η IFN-γ ως παράγοντας που επάγει την απόπτωση και αναστέλλει την αποικοδόμηση του οστού, ο TGF-β ως παράγοντας που αναστέλλει την απόπτωση και επάγει το σχηματισμό του οστού και ο TNF-α ως κυτταροκίνη της φλεγμονής που σε ορισμένες περιπτώσεις δρα προ-αποπτωτικά και σε άλλες δρα αντι-αποπτωτικά (Tsuboi et al. 1999; Chua et al. 2002; Abadie and Wietzerbin 2003).

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των κυτταροκινών στην επιβίωση με μέτρηση της βιωσιμότητας και ακολούθως στην απόπτωση των κυττάρων οστεοσαρκώματος MG63 με βάση μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο μορφολογικά και επιπλέον προσδιορίστηκαν βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης όπως η συμπίκνωση της χρωματίνης μετά από χρώση των πυρήνων με DAPI, η ενεργοποίηση των κασπασών, η πρωτεόλυση του υποστρώματος των κασπασών PARP και η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 με προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες.

Κατά τη διάρκεια προκαταρκτικών πειραμάτων, εξετάστηκε η επίδραση των παραγόντων IFN-γ, TNF-α και TGF-β οι οποίοι εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον του οστού στην έκφραση των μεταλλοπρωτεασών και των αναστολέων τους με ανοσοεντοπισμό, ενώ παράλληλα τα κύτταρα ελέγχονταν μορφολογικά σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή μείωση στα επίπεδα έκφρασης της MMP-9 κατά την επεξεργασία των κυττάρων με IFN-γ γεγονός που συμφωνεί με πρόσφατες αναφορές που της αποδίδουν προστατευτικό ρόλο κατά την αποικοδόμηση του οστού ή του χόνδρου σε φλεγμονώδεις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, η IFN-γ μειώνει τα επίπεδα έκφρασης των MMPs σε ινοβλάστες από αρθρικό υγρό και σε πειραματικό μοντέλο ποντικών που έχουν αναπτύξει ρευματοειδή αρθρίτιδα (Page et al. 2010). Αντίθετα, η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TGF-β προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των MMP-2 και MMP-9 και η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με αναφορές σύμφωνα με τις οποίες ο TGF-β προκαλεί αύξηση ή μείωση στην έκφραση των MMPs ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή την αντίστοιχη MMP. Ειδικότερα στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος SaOS-2 ο TGF-β προκαλεί μείωση στα επίπεδα έκφρασης της MMP-9, πιθανότατα διότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χαρακτηρίζεται από μικρότερη ικανότητα μετάστασης και διείσδυσης (Duijvenvoorden et al. 1999). Όμως, η πιο σημαντική

παρατήρηση που αφορά στην απόκριση των κυττάρων MG63 παρουσία IFN- γ , TNF- α και TGF- β και ειδικότερα στο πρότυπο έκφρασης των μεταλλοπρωτεασών-2 και -9 - τις οποίες κυρίως εκκρίνουν τα συγκεκριμένα κύτταρα - ήταν η επαγωγή των MMP-2 και MMP-9 αλλά και η ενεργοποίηση της MMP-9 (ανοσοεντοπισμός της ενεργούς μορφής της MMP-9) παρουσία TNF- α . Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με μελέτες σε άλλες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος όπου δείχνεται επαγωγή των MMP-1, -2 και -9 σε επίπεδο mRNA, παρουσία της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF- α (Panagakos and Kumar 1994). Με αυτόν τον τρόπο, ενισχύεται η αποικοδομητική δράση του TNF- α σε παθολογικές καταστάσεις του οστού και του χόνδρου, η οποία διαμεσολαβείται από πρωτεολυτικά ένζυμα μεταξύ των οποίων οι MMPs. Η πρωτεολυτική δράση των MMPs ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής, στην ενεργοποίηση των ζυμογόνων μορφών και ενδογενώς, από τους ειδικούς αναστολείς τους TIMPs (Nagase 1997), οι οποίοι δρουν αντισταθμιστικά στη λειτουργία των MMPs. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε μεταβολή σε κάποιον από τους παραπάνω ρυθμιστικούς παράγοντες σε παθολογικές καταστάσεις, επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα των MMPs και κατ' επέκταση το λειτουργικό τους ρόλο.

Στη συνέχεια, η μελέτη επικεντρώθηκε στα επίπεδα έκφρασης των TIMP-2 και TIMP-1, ως αναστολέων με μεγαλύτερη συγγένεια για τις MMP-2 και MMP-9, αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η έκφραση των TIMPs αποτελεί έναν εξισορροπητικό παράγοντα που αντισταθμίζει την ενζυμική ενεργότητα των MMPs. Όσον αφορά στο πρότυπο των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών, το οποίο προσδιορίστηκε από την ανάλυση των υπερκειμένων καλλιέργειας με ανοσοεντοπισμό, η IFN- γ δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των TIMP-2 και TIMP-1. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με ευρήματα άλλης μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινους ινοβλάστες από αρθρικό υγρό, οπότε η IFN- γ δεν επηρέασε την επαγόμενη από IL-1 β αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 (Page et al. 2010). Αντίθετα, η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TGF- β ή TNF- α προκάλεσε σημαντική επαγωγή στα επίπεδα έκφρασης των TIMP-2 και TIMP-1. Η αύξηση των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με την αύξηση του TIMP-2, το οποίο είναι σύμφωνο με προηγούμενες παρατηρήσεις που αναφέρουν ότι η έκφραση του TIMP-1 είναι επαγόμενη από εξωτερικά ερεθίσματα ενώ του TIMP-2 είναι κυρίως συνεχής. Η επαγωγή της έκφρασης των TIMP-2 και TIMP-1 από τον TGF- β συμφωνεί με τα

συμπεράσματα προηγούμενων μελετών που αφορούν την ελεγχόμενη από την AP-1 αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1 παρουσία TGF- β (Hall et al. 2003; Silverio-Ruiz et al. 2007). Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι ο TGF- β που προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση επάγει την έκφραση των TIMPs και ο TNF- α που είναι μία κυτταροκίνη της φλεγμονής δρα παρόμοια με τον TGF- β , καθώς προκαλεί αύξηση στην έκφραση των TIMPs, κυρίως του TIMP-1. Τα αυξημένα επίπεδα του TIMP-1 παρουσία TNF- α έχουν πιστοποιηθεί σε πολλές κυτταρικές σειρές μεταξύ των οποίων στα κύτταρα οστεοσαρκώματος SaOS-2, αν και στα κύτταρα οστεοσαρκώματος TE85 δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση των επιπέδων του TIMP-1 (Panagakos and Kumar 1994). Η παραπάνω παρατήρηση καθώς και το γεγονός ότι μορφολογικά τα κύτταρα δεν εμφάνισαν χαρακτηριστικά απόπτωσης, οδήγησε σε περαιτέρω διευκρίνιση της ανθεκτικότητας των κυττάρων MG63 έναντι της επαγόμενης από τον TNF- α απόπτωσης σε σχέση με την αυξημένη σύνθεση του TIMP-1 και τον πιθανό αντι-αποπτωτικό ρόλο του νεοσυντιθέμενου TIMP-1.

5.2 Επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF- α

Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές και με βάση τις προαναφερθείσες πειραματικές παρατηρήσεις, ο TNF- α - ως συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του οστού - ρυθμίζει την έκφραση των μεταλλοπρωτεασών και των αναστολέων τους, τα οποία ρυθμίζουν την απόπτωση μετά από αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια του εξωκυττάριου χώρου και ενεργοποίηση κατάλληλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Σχετικά με την επίδραση του TNF- α στην απόπτωση των οστεοβλαστών, πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι ο TNF- α επάγει την απόπτωση στα οστεοβλαστικά κύτταρα ποντικού MC3T3-E1 μέσω ενεργοποίησης των κασπασών, η οποία αναστέλλεται από τον TGF- β (Chua et al. 2002). Αντίθετα, ο TNF- α δεν επάγει απόπτωση στα κύτταρα οστεοσαρκώματος MG63, αλλά ενισχύει την απόπτωση που προκαλείται από το αντίσωμα έναντι του FAS (Chua et al. 2002; Tsuboi et al. 1999). Πιθανόν η αντοχή έναντι του TNF- α οφείλεται στο ότι τα κύτταρα MG63 σε αντίθεση με τα MC3T3-E1 είναι καρκινικά. Αναλυτικότερα, στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του TNF- α στην απόπτωση των κυττάρων, προστέθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις TNF- α (20-100 ng/ml) και για μεγάλους

χρόνους επώασης. Αν και είναι γνωστή η κυτταροτοξική δράση του TNF-α σε διάφορες κυτταρικές σειρές, συνήθως τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ανθεκτικότητα και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε υψηλή συγκέντρωση TNF-α. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις TNF-α και για διάφορους χρόνους επώασης, δεν είχε κυτταροτοξική δράση. Αυτό προέκυψε από τη μέτρηση της βιωσιμότητας με MTT και τα επίπεδα έκφρασης των προ-αποπτωτικών μορίων BAX και BAD με ανάλυση κατά Western, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασής τους. Η αντοχή των καρκινικών κυττάρων έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α έχει ήδη περιγραφεί και οφείλεται κυρίως στην επαγωγή νεοσυντιθέμενων μορίων της οικογένειας BCL-2 και σε αναστολές της απόπτωσης, οι οποίοι ρυθμίζονται μεταγραφικά από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες με κυριότερο τον NF-KB (Karin and Lin 2002). Έτσι, σε πειραματικό επίπεδο για την ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην απόπτωση έναντι του TNF-α χρησιμοποιούνται κατάλληλοι αναστολείς της μεταγραφής ή της μετάφρασης. Στην παρούσα μελέτη τα κύτταρα MG63 ευαισθητοποιήθηκαν με τον αναστολέα της πρωτεϊνσύνθεσης CHX μία ώρα πριν την προσθήκη του TNF-α, μία διαδικασία που έχει ακολουθηθεί για την επαγωγή της απόπτωσης σε πρωτογενείς καλλιέργειες οστεοβλαστών και στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος UMR106 (Pavalko et al. 2003). Πράγματι, η προεπώαση των κυττάρων με CHX πριν την προσθήκη του TNF-α οδήγησε τα κύτταρα σε απόπτωση, η οποία διαπιστώθηκε με τον προσδιορισμό του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων και επακόλουθη μορφολογική και βιοχημική μελέτη των κυττάρων, οπότε προσδιορίστηκαν η συμπύκνωση της χρωματίνης με χρώση DAPI, το ποσοστό θραύσης του DNA με κυτταρομετρία ροής και ο προσδιορισμός πρωτεϊνών που μεσολαβούν στην απόπτωση με ανάλυση κατά Western, όπως η ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η πρωτεόλυση του υποστρώματος των κασπασών PARP και η έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2. Παρατηρήθηκε ότι η προεπώαση των κυττάρων με CHX πριν την προσθήκη του TNF-α, προκάλεσε συμπύκνωση της χρωματίνης, θραύση του DNA, ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και μειωμένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-X_L. Επομένως, με βάση τα παραπάνω, η απόπτωση χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των κασπασών, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού κυτταρικής σηματοδότησης που επάγεται από τον TNF-α. Επειδή τα κύτταρα

ευαισθητοποιήθηκαν στην απόπτωση μετά την επεξεργασία τους με CHX, συμπεραίνεται ότι η αντοχή των κυττάρων MG63 στην απόπτωση από τον TNF-α οφείλεται στη σύνθεση μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών με αντι-αποπτωτική δράση. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη βιβλιογραφική αναφορά όπου δείχτηκε ότι στις κυτταρικές σειρές PC3 και LNCaP-LN3 από καρκίνο του προστάτη η αντοχή έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α συνδέεται με την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\beta 1$ και την αυξημένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης επιβιωτίνης (Fornaro et al. 2003). Στην περίπτωση των κυττάρων MG63 η απόπτωση και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης συνδέονται με μειωμένη έκφραση της BCL-X_L. Στις αποπτωτικές συνθήκες προεπάσης των κυττάρων με CHX πριν την προσθήκη του TNF-α παρατηρήθηκε δραματική μείωση των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1, με αποτέλεσμα η έκφραση του TIMP-1 να προϋποθέτει *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση.

5.3 Ενεργοποίηση των κινασών AKT/PKB και MAPKs και του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB κατά την επαγωγή του TIMP-1

Σύμφωνα με πληθώρα ερευνητικών εργασιών οι TIMPs πέρα από την κύρια δράση τους ως ειδικών αναστολέων των MMPs, έχουν πολλαπλό ρόλο καθώς ρυθμίζουν πολλές σημαντικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η αγγειογένεση (Lambert et al. 2004). Ο TIMP-4 συνδέεται με προ-αποπτωτική δράση σε καρδιακούς ινοβλάστες (Tummalapalli et al. 2001), ενώ ο TIMP-2 έχει προ-αποπτωτική δράση σε T-λεμφοκύτταρα μέσω αναστολής των MMPs αλλά αντι-αποπτωτική δράση σε μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα κατά το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών με αποτέλεσμα να έχει προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Lim et al. 1999; Johnson et al. 2006). Ακόμη, ο TIMP-3 έχει προ-αποπτωτική δράση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και συνδέεται με ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία. Κατά συνέπεια, υψηλά επίπεδα TIMP-3 χαρακτηρίζουν αποτελεσματική θεραπεία (Span et al. 2004). Αντίθετα, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα αυξημένα επίπεδα TIMP-1 σε ασθενείς με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως το οστεοσάρκωμα, σχετίζονται με ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης και των χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Davidsen et al. 2006; Ferrari et al. 2004; Newell et al. 1994) και ακόμη με μειωμένο

προσδόκιμο επιβίωσης και κακή πρόγνωση (Honkavuori et al. 2008; Schroll et al. 2006). Ειδικά ο TIMP-1 του οποίου η δράση μελετήθηκε εκτενέστερα έχει συνδεθεί με αυξημένη αιμοποίηση και αναστολή της αγγειογένεσης, ενώ στα οστά προκαλεί απώλεια οστικής μάζας (Hill et al. 1993). Επιπλέον έχει δειχτεί ότι επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα MG63 με μηχανισμό που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των ERK-MAPKs και κινασών τυροσίνης και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό στα αθανатоποιημένα φυσιολογικά κύτταρα MCF10A με μηχανισμό που περιλαμβάνει αύξηση του αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p27^{KIP1} (Yamashita et al. 1996; Taube et al. 2006). Επίσης, στον TIMP-1 έχει αποδοθεί αντι-αποπτωτική δράση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, μεταξύ των οποίων σε κύτταρα μυελού των οστών καθώς και σε ηπατικά και λεμφωματικά κύτταρα είτε μέσω της δράσης του ως αναστολέα των MMPs, είτε ανεξάρτητα από αυτήν (Guo et al. 2006; Murphy et al. 2002; Guedez et al. 2001). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με τον TNF-α προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 και συνοδεύτηκε από αδυναμία επαγωγής της απόπτωσης. Αντίθετα, η προεπώαση των κυττάρων με τον παράγοντα CHX πριν την επεξεργασία με τον TNF-α μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 και ευαισθητοποίησε τα κύτταρα στην απόπτωση, όπως αποδείχτηκε από την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, την αποικοδόμηση του PARP και τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-X_L της οικογένειας BCL-2. Επομένως, η αντοχή των κυττάρων MG63 στην απόπτωση από τον TNF-α μελετήθηκε ειδικότερα σε σχέση με την αυξημένη σύνθεση του TIMP-1 και τον πιθανό αντι-αποπτωτικό ρόλο του νεοσυντιθέμενου TIMP-1. Είναι ενδιαφέρον ότι ο TIMP-1 που είναι ένα μόριο της εξωκυττάριας μήτρας έχει ρυθμιστικό ρόλο στην απόπτωση των οστεοβλαστών, το οποίο συμφωνεί με την άποψη ότι το μικροπεριβάλλον του οστού παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων του οστού.

Προηγούμενες μελέτες είχαν αποδείξει ότι η έκφραση του TIMP-1 εξαρτάται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι SP-1, SP-2, AP-1, ATF-2, ETS-1, RUNX και NF-KB (Botelho et al. 1998; Wilczynska et al. 2006; Logan et al. 1996; Kwak et al. 2006). Η παρούσα μελέτη σχετικά με την αύξηση της έκφρασης του TIMP-1 επικεντρώθηκε στο μεταγραφικό παράγοντα NF-KB καθώς είναι γνωστό ότι ο TNF-α είναι ισχυρός επαγωγέας του NF-KB σε πολλές κυτταρικές σειρές μεταξύ

των οποίων και τα κύτταρα MG63. Απουσία ερεθίσματος, ο NF-KB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όπως διαπιστώθηκε από την ανίχνευση της υπομονάδας p65 με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας και ανάλυσης πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων. Αντίθετα, η ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία TNF-α προκαλεί σημαντική μετατόπιση της υπομονάδας p65 προς τον πυρήνα. Η ενεργοποίηση του NF-KB μετά από διέγερση των κυττάρων MG63 με TNF-α είναι άμεση, συμβαίνει ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά επεξεργασίας με τον παράγοντα και παραμένει για τουλάχιστον 30 λεπτά, χωρίς να έχει διερευνηθεί προηγούμενη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της υπομονάδας p65. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-KB έχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της αποπτωτικής δράσης του TNF-α, διότι συμβάλλει στην αντοχή των κυττάρων έναντι της απόπτωσης. Ο προστατευτικός ρόλος του NF-KB σχετίζεται κυρίως με την επαγωγή της έκφρασης μορίων με αντι-αποπτωτική δράση μεταξύ των οποίων τα c-FLIP και αναστολείς των κασπασών όπως XIAP, c-IAPs και επιβιωτίνη, μόρια της οικογένειας BCL-2, όπως τα BCL-X_L και BFL-1 και μόρια που ανήκουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TNF-α, όπως τα TRAFs.

Η διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB έδειξε ότι η επεξεργασία των κυττάρων MG63 με TNF-α συνδέεται με ενεργοποίηση των κινασών AKT/PKB και των MAPKs, p38 και JNKs, ήδη από τα πρώτα 5 λεπτά χορήγησης του TNF-α, καθώς επίσης με αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1 στις 24 ώρες. Η ενεργοποίηση των κινασών AKT/PKB, ERKs, p38 και JNKs από τον TNF-α έχει δείχτεί σε άλλους κυτταρικούς τύπους και έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης (Liu et al. 2000; Radeff-Huang et al. 2007). Ειδικότερα, η AKT/PKB είναι κομβική κίνηση της κυτταρικής επιβίωσης που προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση με αναστολή της δράσης της κασπάσης-9, του προ-αποπτωτικού μορίου BAD και των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Forkhead (Datta et al. 1997; Kops and Burgering 2000; Cardone et al. 1998), ενώ ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-KB και CREB (Romashkova and Makarov 1999). Επίσης, η ενεργοποίηση της AKT/PKB αναστέλλει το αποπτωτικό μονοπάτι της p53 (Gottlieb et al. 2002). Στην κυτταρική σειρά MG63 ο TNF-α προκάλεσε ισχυρή ενεργοποίηση της AKT/PKB ήδη από τα πρώτα 5 λεπτά επώασης η οποία παρέμεινε για τουλάχιστον 30 λεπτά επώασης. Σχετικά με την προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι των αποπτωτικών

ερεθισμάτων όπως σταυροσπορίνη και στέρηση ορού, είναι γνωστό ότι στην κυτταρική σειρά T-47D από καρκινικά κύτταρα του μαστού, ο TIMP-1 ενεργοποιεί τις κινάσες c-SRC, AKT/PKB και ERKs, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού MCF10A ενεργοποιεί τις κινάσες FAK, AKT/PKB και ERKs (Liu et al. 2003; Lee et al. 2003).

Οι MAPKs ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα, παράγοντες στρες και κυτταροκίνες της φλεγμονής και εμπλέκονται στο φαινόμενο της απόπτωσης, όπου σημαντικό ρόλο παίζει το χρονικό πρότυπο της ενεργοποίησής τους. Στα κύτταρα MG63 που αναπτύχθηκαν παρουσία TNF-α δεν παρουσιάστηκε ενεργοποίηση των ERKs τουλάχιστον κατά τα πρώτα 30 λεπτά, για τις οποίες έχει κυρίως προταθεί άμεση και παροδική ενεργοποίηση κατά την προστασία από την απόπτωση και παρατεταμένη ενεργοποίηση κατά την επαγωγή της απόπτωσης. Οι κινάσες p38 και JNKs ενεργοποιούνται από παράγοντες στρες και φλεγμονής, όπως ο TNF-α, και συμμετέχουν στη ρύθμιση του φαινομένου της απόπτωσης. Για την κινάση p38 έχει δείχτει κυρίως ο προ-αποπτωτικός ρόλος της, ενώ σύγχρονες μελέτες υποδεικνύουν και πιθανό αντι-αποπτωτικό ρόλο. Ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της p38 μπορεί να αποδοθεί στην επαγωγή της β-κατενίνης, ενός μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων με αντι-αποπτωτική δράση ή ακόμη στη φωσφορυλίωση κασπασών. Επίσης, σε περιπτώσεις βλάβης στο DNA η p38 μπορεί να προκαλέσει παύση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G2 στην M, προκειμένου να διορθωθεί η βλάβη στο DNA και να επιβιώσει το κύτταρο (Thornton and Rincon 2009). Ακόμη, πιστεύεται ότι προκαλεί την ενεργοποίηση και την έκκριση παραγόντων οι οποίοι προάγουν την επιβίωση των κυττάρων όπως η MMP-9 (Suarez-Cuervo et al. 2004; Ringshausen et al. 2004). Στα κύτταρα MG63, η ενεργοποίηση της κινάσης p38 είναι άμεση και παροδική, αφού ανιχνεύεται ήδη από τα 5 λεπτά, αλλά όχι μετά από 30 λεπτά. Εξάλλου, η p38 ενεργοποιείται ισχυρά από τον TNF-α καθώς ανιχνεύονται οι δύο ισομορφές της. Η κινάση JNK ρυθμίζει την απόπτωση και σχετικά με την επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση σημαντικό ρόλο έχει η διάρκεια της ενεργοποίησής της. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η ενεργοποίηση των JNKs είναι σύντομη και δεν οδηγεί σε απόπτωση, πιθανότατα διότι συμβάλλει στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των JNKs εν μέρει αναστέλλεται από την ενεργοποίηση του NF-KB. Επομένως, αν παράλληλα συμβαίνει αναστολή της μεταγραφής ή ειδική αναστολή του μεταγραφικού

παράγοντα NF-KB και η ενεργοποίησή της είναι παρατεταμένη, οδηγεί σε απόπτωση. Η επεξεργασία των κυττάρων MG63 για 5 λεπτά με TNF-α προκάλεσε ενεργοποίηση των κινασών JNKs η οποία διατηρήθηκε έως 15 λεπτά, το οποίο εν μέρει εξηγεί την αντοχή των κυττάρων έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α. Τα σύγχρονα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του NF-KB επιδρά στη χρονική διάρκεια ενεργοποίησης των JNKs και αποτρέπει την παρατεταμένη ενεργοποίησή τους, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντι-αποπτωτικής δράσης (De Smaele et al. 2001). Η ρύθμιση της απόπτωσης από τις JNKs συμβαίνει κυρίως μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μόρια της οικογένειας BCL-2, καθώς επίσης μέσω ρύθμισης των επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης c-FLIP (Varfolomeev and Ashkenazi 2004; Chang et al. 2006). Ειδικότερα, η ενεργοποίηση των JNKs έχει συνδεθεί με την αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 στα στρωματικά κύτταρα από μυελό των οστών MBA-1, αφού η ειδική αναστολή των JNKs αναιρεί την προστατευτική δράση του TIMP-1 (Guo et al. 2006).

Στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63 η αύξηση στην έκφραση του TIMP-1 μετά από επεξεργασία με TNF-α δείχτηκε ότι εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB, όπως διαπιστώθηκε από τη μετατόπιση της υπομονάδας p65 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Όταν τα κύτταρα προεπώστηκαν με τον αναστολέα της ενεργοποίησης του NF-KB, PDTC, η αύξηση στην επαγωγή του TIMP-1 παρουσία TNF-α μειώθηκε κατά 30%, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επαγωγή της έκφρασης του TIMP-1 σχετίζεται εν μέρει με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις που υποδεικνύουν ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν τη μεταγραφή του TIMP-1 και μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB, όπως η κυτταροκίνη IL-1β στα κύτταρα 3T3-L1 (Weise et al. 2008).

5.4 Επίδραση του TIMP-1 στην κυτταροτοξική δράση του TNF-α

Η αύξηση των επιπέδων έκκρισης του TIMP-1 και η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης που περιλαμβάνουν τις κινάσες AKT/PKB, p38 και JNKs και καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού

παράγοντα NF-KB και την αντοχή των κυττάρων έναντι της απόπτωσης ενίσχυσαν περαιτέρω την υπόθεση σχετικά με την προστατευτική δράση του TIMP-1. Ακολούθως, για την περαιτέρω μελέτη του αντι-αποπτωτικού ρόλου του TIMP-1 αποσιωπήθηκε η έκφραση του TIMP-1 με την τεχνική siRNA. Όπως διαπιστώθηκε πειραματικά με την τεχνική αυτή, τα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 σχεδόν μηδενίστηκαν, ακόμη και κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε υψηλή συγκέντρωση TNF-α. Η επεξεργασία των κυττάρων αυτών με TNF-α προκάλεσε μείωση στο ποσοστό της βιωσιμότητας η οποία είχε χαρακτηριστικά απόπτωσης όπως διαπιστώθηκε από την πρωτεόλυση του υποστρώματος των κασπασών PARP και τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-X_L. Επομένως, η αδυναμία του TNF-α να προκαλέσει απόπτωση στα κύτταρα MG63 οφείλεται εν μέρει στην αυξημένη έκφραση του TIMP-1. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 πιθανόν συνδέονται με μειωμένη ενεργοποίηση των κασπασών και επαγωγή του μορίου BCL-X_L. Αντίστοιχες παρατηρήσεις με κύτταρα που εκφράζουν μειωμένα επίπεδα TIMP-1 έχουν γίνει στην κυτταρική σειρά MCF10A, όπου παρατηρείται επαγωγή της απόπτωσης παρουσία διάφορων παραγόντων που προκαλούν απόπτωση όπως TRAIL, σταυροσπορίνη, H₂O₂ και ακτινοβολία με ακτίνες X. Στις συνθήκες αποσιώπησης της έκφρασης του TIMP-1 παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα κασπάσης παρουσία του αποπτωτικού παράγοντα το οποίο είναι σύμφωνο με τα δικά μας πειραματικά αποτελέσματα και υποδεικνύει το ρυθμιστικό ρόλο του TIMP-1 σε κλασσικά σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των κασπασών.

Προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω η προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης, στη συνέχεια της μελέτης χορηγήθηκε εξωγενώς ανασυνδυασμένος TIMP-1 σε κύτταρα MG63 σε συνθήκες απόπτωσης. Η χορήγηση εξωγενώς ανασυνδυασμένου ανθρώπινου TIMP-1 μείωσε την απόπτωση που είχε προκληθεί από TNF-α+CHX με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως διαπιστώθηκε από την αύξηση του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων στις αποπτωτικές συνθήκες. Η αύξηση στο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική στη συγκέντρωση 800 ng/ml. Σύμφωνα με αντίστοιχη μελέτη η χορήγηση ανασυνδυασμένου TIMP-1 σε συγκέντρωση 250 ng/ml ανέστειλε την επαγόμενη από TNF-α/CHX απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Boulday et al. 2004). Πιθανόν η υψηλή συγκέντρωση ανασυνδυασμένου TIMP-1 στα κύτταρα

MG63 να είναι απαραίτητη λόγω της υψηλής συγκέντρωσης TNF-α (100 ng/ml) που χρησιμοποιήθηκε ως αποπτωτικός παράγοντας. Με την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης ανασυνδυασμένου TIMP-1 (800 ng/ml) παρατηρήθηκε επιπλέον μείωση του ποσοστού πρωτεόλυσης του PARP και αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-X_L. Η επεξεργασία των κυττάρων με εξωγενώς χορηγούμενο ανασυνδυασμένο TIMP-1 έχει χρησιμοποιηθεί για την προστασία από την απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ακόμη στις κυτταρικές σειρές UT-7 (ερυθρολευχαιμικά), 32D (μυελωματικά) και MBA-1 (μυελού των οστών) (Lambert et al. 2003; Guo et al. 2006; Boulday et al. 2004). Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις στις κυτταρικές σειρές UT-7 και 32D, η χορήγηση ανασυνδυασμένου TIMP-1 εξωγενώς ενισχύει την κυτταρική επιβίωση μέσω ενεργοποίησης των κινασών JAK2 και PI-3K/AKT/PKB και οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση του προ-αποπτωτικού μορίου BAD και την επαγωγή του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L. Η επαγωγή του BCL-X_L παρουσία ανασυνδυασμένου TIMP-1 συμφωνεί με τις δικές μας πειραματικές παρατηρήσεις στα κύτταρα MG63. Αντίθετα, η χορήγηση ανασυνδυασμένου TIMP-1 στα κύτταρα του μυελού των οστών προκάλεσε την ενεργοποίηση των κινασών JNK και AKT/PKB οι οποίες προκαλούν αυξημένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 και μειωμένη έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BAX, η έκφραση των οποίων δε μεταβλήθηκε σημαντικά στα κύτταρα MG63. Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι η προστασία των κυττάρων από απόπτωση από τον TIMP-1 συνδέεται με τη ρύθμιση της έκφρασης μορίων της οικογένειας BCL-2.

5.5 Η προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης στα κύτταρα MG63 εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του με την ιντεγκρίνη ανβ3

Προκειμένου να μελετηθεί περισσότερο μηχανιστικά το φαινόμενο της προστατευτικής δράσης του TIMP-1 έναντι της απόπτωσης στα κύτταρα MG63, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση, όπως οι ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς υποδοχείς οι οποίοι συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων με την ενεργοποίηση κομβικών κινασών όπως FAK και ILK, οι οποίες μεσολαβούν στην

ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης κυτταρικής επιβίωσης που καταλήγουν στις κινάσες AKT/PKB και MAPKs (Giancotti and Ruoslahti 1999). Ο TNF- α , που είναι μία κυτταροκίνη του μικροπεριβάλλοντος του οστού, ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και της κυτταρικής επιφάνειας, όπως επίσης των ιντεγκρινικών υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια. Σε μία προκαταρκτική σειρά πειραμάτων διερευνήθηκαν τα είδη των ιντεγκρινικών υπομονάδων που εκφράζουν τα κύτταρα MG63, οπότε διαπιστώθηκε ότι εκφράζουν τις ιντεγκρινικές υπομονάδες $\beta 1$ και $\alpha 5$ σε μεγάλο ποσοστό και λιγότερο τις $\alpha 2$ και $\alpha 3$ και την ιντεγκρίνη ανβ3. Το παραπάνω αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου αναφέρεται ότι τα οστεοβλαστικά κύτταρα κυρίως εκφράζουν τις ιντεγκρινικές υπομονάδες $\beta 1$ και $\alpha 5$ (Bennett et al. 2001).

Για να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών της κυτταρικής επιφάνειας σε αποπτωτικές και μη αποπτωτικές συνθήκες, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επεξεργασία των κυττάρων με TNF- α σε μη αποπτωτικές συνθήκες προκαλεί μείωση στα επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρίνης $\beta 1$ και αντίστοιχη αύξηση της ιντεγκρίνης ανβ3. Η αυξημένη έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ3 συμφωνεί με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες οι κυτταροκίνες και τα στεροειδή που ενισχύουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών προκαλούν αυξημένη έκφραση της ανβ3 κυρίως μέσω ρύθμισης της $\beta 3$ υπομονάδας και ειδικότερα ο TNF- α προκαλεί μειωμένη έκφραση της $\beta 5$ υπομονάδας σε πρόδρομα κύτταρα οστεοκλαστών (Inoue et al. 2000). Η μείωση στην έκφραση της ιντεγκρίνης $\beta 1$ και η ταυτόχρονη αύξηση στην έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ3 οδηγεί στην υπόθεση ενός είδους αμφι-επικοινωνίας μεταξύ των ιντεγκρινών, όπου η λειτουργία της μιας υποκαθίσταται από τη λειτουργία της άλλης. Ένα είδος αμφι-επικοινωνίας μεταξύ των ιντεγκρινών $\beta 1$ και ανβ3 έχει περιγραφεί στην κυτταρική σειρά GD25, όπου η αυξημένη έκφραση της $\beta 1$ προκαλεί μείωση στην έκφραση της ανβ3 και αύξηση στην έκφραση της ανβ5. Αντίστοιχα στις καρκινικές σειρές HT29-D4 και SW480 η μείωση στην έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ5/ανβ6 συνδέεται με αυξημένη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha 2\beta 1$ (Defilles et al. 2009; Retta et al. 2001). Στις αποπτωτικές συνθήκες (TNF- α +CHX) τα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών $\beta 1$ και ανβ3 στην κυτταρική επιφάνεια μειώθηκαν.

Η μειωμένη έκφραση της $\beta 1$ και η αυξημένη έκφραση της ανβ3 δρα αντισταθμιστικά και οδηγεί στη δημιουργία ενός φαινότυπου στα κύτταρα με

μεγαλύτερη ικανότητα μετάστασης και διείσδυσης. Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές η $\beta 1$ έχει συνδεθεί με τη διαφοροποίηση των κυττάρων MG63, καθώς έχει δείχτει ότι σε συνθήκες μειωμένης έκφρασης της $\beta 1$ ιντεγκρίνης, μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων και η παραγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης και ακόμη η προστασία έναντι της απόπτωσης (Wang et al. 2006). Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης ανβ3 έχει συνδεθεί με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αντοχή έναντι της απόπτωσης και ικανότητα διείσδυσης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και ιδιαίτερα στα κύτταρα οστεοσαρκώματος ανθρώπου SaOS-2 προκαλεί αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης και μετάστασης (Duan et al. 2004). Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες που υποδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο των ιντεγκρινών $\beta 1$ και ανβ3 στην επαγόμενη από τον TNF- α απόπτωση (Fukai et al. 1998). Για την ιντεγκρινική υπομονάδα $\beta 1$ έχει αναγνωριστεί ότι προστατεύει από την απόπτωση έναντι του TNF- α μέσω επαγωγής της επιβιωτίνης, ενώ η ιντεγκρίνη ανβ3 δρα προστατευτικά έναντι της απόπτωσης από τον TNF- α με μηχανισμό που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της AKT/PKB, αλλά ανεξάρτητα από το μεταγραφικό παράγοντα NF-KB (Bieler et al. 2007; Fornaro et al. 2003). Η προστατευτική δράση των ιντεγκρινών $\beta 1$ και ανβ3 έναντι της απόπτωσης έχει συνδεθεί και με την επαγωγή της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-2 (Matter and Ruoslahti 2001; Lee and Ruoslahti 2005).

Σύμφωνα με πληθώρα ερευνητικών δημοσιεύσεων η δράση των αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, όπως επίσης των μεταλλοπρωτεασών και των αναστολέων τους, ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση τους με άλλα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας (Seo et al. 2003; Smith et al. 1997). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο TIMP-1 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο ιντεγκρίνη $\beta 1$ -τετρασπανίνη CD63 και διατηρεί την ιντεγκρίνη $\beta 1$ σε ενεργή μορφή στην επιφάνεια των κυττάρων MCF10A. Η ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη $\beta 1$ ευνοεί την κυτταρική επιβίωση μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τις κινάσες FAK/PI-3K και ERKs (Jung et al. 2006). Η αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη $\beta 1$ στην επιφάνεια των κυττάρων MCF10A μεσολαβεί στην προστασία από την απόπτωση που επάγεται από στέρηση ορού.

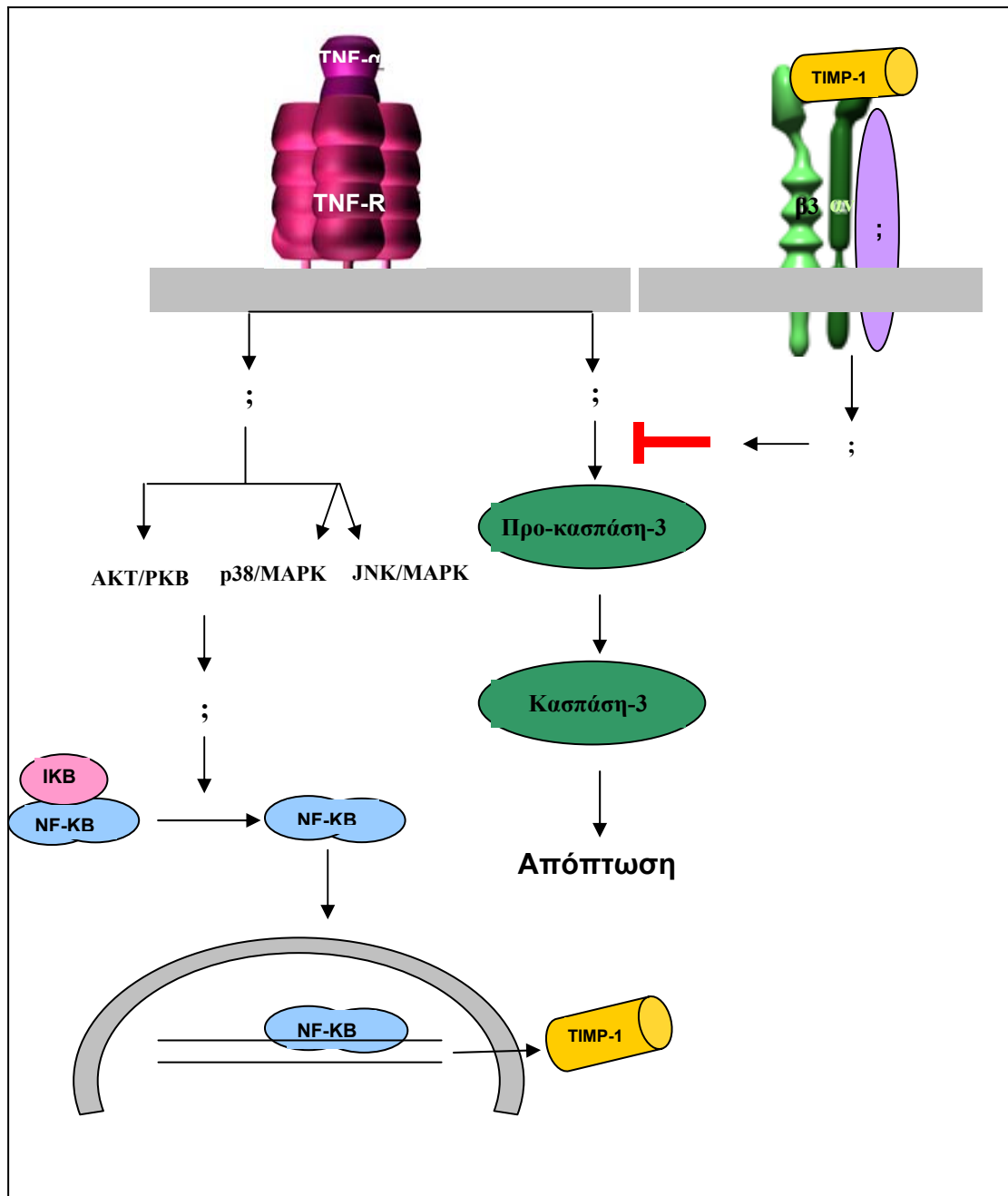
Επειδή, όπως αναφέρθηκε, υπάρχει αμφι-επικοινωνία μεταξύ των ιντεγκρινών και με βάση τα αποτελέσματα από τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής, όπου σε μη αποπτωτικές συνθήκες διαπιστώθηκε μείωση στην έκφραση της $\beta 1$ και αύξηση στην έκφραση της ανβ3 - η οποία έχει αντι-αποπτωτική δράση -, διατυπώθηκε η υπόθεση

ότι η ιντεγκρίνη ανβ3 πιθανόν να συμβάλλει στην προστατευτική δράση του TIMP-1 στα κύτταρα MG63 και με αυτόν τον τρόπο να αντισταθμίζει τη λειτουργία της β1. Προκειμένου να απαντηθεί η ανωτέρω υπόθεση πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας όπου παρατηρήθηκε συνεντοπισμός μεταξύ του TIMP-1 και της ιντεγκρίνης ανβ3 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63. Στη συνέχεια, με ανοσοκατακρήμνιση διαπιστώθηκε η αλληλεπίδρασή τους μέσω διασύνδεσης. Η παραπάνω παρατήρηση δεν αποδεικνύει την άμεση διασύνδεση των δύο μορίων αλλά είναι πιθανό να αποτελούν συστατικά του ίδιου συμπλόκου, όπως στην περίπτωση των κυττάρων MCF10A όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ TIMP-1 και ιντεγκρίνης β1 διαμεσολαβείται από την τετρασπανίνη CD63. Εντούτοις, η ευρύτερη (άμεση ή έμμεση) διασύνδεση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 υποδεικνύει έναν πιθανό υποδοχέα μέσω του οποίου ο TIMP-1 προσδένεται στην επιφάνεια των κυττάρων MG63 και επάγει την προστατευτική δράση. Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν αλληλεπίδραση της ανβ3 με την ενεργή μορφή της MMP-2 στην κυτταρική επιφάνεια και αυξημένη ικανότητα κυτταρικής διείσδυσης και ακόμη αλληλεπίδραση της υπομονάδας αν με την MMP-2 κατά την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Levkau et al. 2002; Brooks et al. 1996), οι οποίες είναι σύμφωνες με τις δικές μας παρατηρήσεις σχετικά με τις φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων μετά από αλληλεπίδραση της ανβ3 με μόρια της εξωκυττάριας μήτρας. Επίσης, σύγχρονα πειραματικά δεδομένα αναφέρονται στην αλληλεπίδραση των TIMPs με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που ρυθμίζουν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Χαρακτηριστικά, ο TIMP-2 μειώνει το ρυθμό του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων με ένα μηχανισμό που βασίζεται στην αλληλεπίδρασή του με την ιντεγκρίνη α3β1 στην κυτταρική επιφάνεια και ο TIMP-3 επάγει την απόπτωση σε ίδιου τύπου κύτταρα μετά από αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα τύπου 2 της αγγειοτενσίνης (Seo et al. 2003; Kang et al. 2008). Προκειμένου να εξεταστεί, αν η αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 έχει λειτουργικό ρόλο στην αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας των ιντεγκρινών εχιστατίνη. Η εχιστατίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τις ιντεγκρίνες ανβ3/ανβ5 και έχει χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η αντι-αποπτωτική δράση της ιντεγκρίνης ανβ3 σε ηπατικά κύτταρα (Zhou et al. 2004). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παραπάνω δημοσιευμένης μελέτης, διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση TIMP-1 με την ανβ3 είναι κρίσιμη για την επαγωγή της αντι-

αποπτωτικής δράσης του TIMP-1, διότι η παρεμπόδιση αυτής της αλληλεπίδρασης από την εχιστατίνη προκάλεσε μείωση στο ποσοστό της βιωσιμότητας και αύξηση στο ποσοστό της απόπτωσης των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κασπασών, όπως υποδεικνύεται από τα αυξημένα ποσοστά πρωτεόλυσης του PARP. Από τα παραπάνω πιστοποιείται ότι η αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 εν μέρει ρυθμίζεται από την αλληλεπίδρασή του με την ιντεγκρίνη ανβ3. Σε αντιδιαστολή το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3 LM609 - που δρα αναστέλλοντας τη λειτουργία της ιντεγκρίνης - δεν προκάλεσε μείωση στην προστατευτική δράση του TIMP-1, αλλά αντίθετα την ενίσχυσε. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1, καθώς πειραματικά διαπιστώθηκε ότι η ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία του αντισώματος προκαλεί την περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1. Κατά συνέπεια το μονοκλωνικό αντίσωμα, αν και παρεμποδίζει τη λειτουργία της ανβ3 ως μόριο προσκόλλησης, ενισχύει την αντι-αποπτωτική δράση του TIMP-1 διότι δρα ως προσδέτης για την ανβ3 ιντεγκρίνη και ενεργοποιεί μέσω αυτού του υποδοχέα σηματοδοτικό μονοπάτι που καταλήγει σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1. Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές στις οποίες δείχνεται ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα των ιντεγκρινών μπορούν να δράσουν ως προσδέτες οι οποίοι ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στη μερική ρύθμιση της έκφρασης μορίων της εξωκυττάριας μήτρας (Tzinia et al. 2002) και ακόμη με πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά στην οποία δείχνεται ότι η ιντεγκρίνη ανβ3 επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου του TIMP-1 (Kim et al. 2008a).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, αφενός υποδεικνύουν ότι ο TNF-α σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους επάγει την απόπτωση, ενώ σε άλλους επάγει την κυτταρική επιβίωση και αφετέρου, υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του TIMP-1 στην αντοχή των κυττάρων έναντι της απόπτωσης. Ο τρόπος δράσης του TIMP-1 περιγράφεται στο σχήμα της **Εικόνας 45**, σύμφωνα με το οποίο ο TNF-α ενεργοποιώντας γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν τις κινάσες AKT/PKB, p38-MAPKs και JNKs-MAPKs, καταλήγει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB ο οποίος, τουλάχιστον εν μέρει, ελέγχει την έκφραση του TIMP-1. Η αυξημένη έκφραση του TIMP-1, μέσω άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης με την ιντεγκρίνη ανβ3, ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης που εκκινούν από

αυτόν τον υποδοχέα και αναστέλλουν την επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των κασπασών.



Εικόνα 45: Πιθανός μηχανισμός της προστατευτικής δράσης του TIMP-1 έναντι της επαγόμενης από τον TNF-α απόπτωσης. Ο TNF-α προσδένεται στον υποδοχέα του TNF-R και επάγει την ενεργοποίηση των κομβικών κινασών κυτταρικής επιβίωσης AKT/PKB, p38-MAPK και JNK-MAPK που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB επάγει εν μέρει την αυξημένη έκφραση-έκκριση του TIMP-1. Ο TIMP-1 που εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο προσδένεται στο ίδιο ή σε γειτονικά κύτταρα στην κυτταρική επιφάνεια μέσω αλληλεπίδρασης (άμεση ή έμμεση) με την ιντεγκρίνη ανβ3, τα επίπεδα της οποίας στην κυτταρική επιφάνεια αυξάνονται παρουσία TNF-α. Η αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 προστατεύει τα κύτταρα από την επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση με ταυτόχρονη αναστολή των κασπασών.

5.6 Γενικά συμπεράσματα

Για την αντιμετώπιση του εκφυλισμού του οστού σε παθολογικές καταστάσεις απαιτείται η χορήγηση θεραπείας που αναστέλλει την αποικοδόμησή του. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται επιπλέον, η αύξηση της οστικής μάζας, η οποία εξαρτάται εν μέρει από την αναστολή της απόπτωσης των οστεοβλαστών. Προκειμένου να μελετηθεί η απόπτωση των οστεοβλαστών, στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63 – που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τη μελέτη αυτών των κυττάρων. Ως παράγοντας απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκε η κυτταροκίνη TNF-α που εκκρίνεται από το μικροπεριβάλλον του οστού και ρυθμίζει την επιβίωση των οστεοβλαστών. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα MG63 εμφανίζουν αντοχή έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α. Συγχρόνως, η επίδραση του TNF-α ρυθμίζει την έκφραση και έκκριση μορίων που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της εξωκυττάριας μήτρας και συγκεκριμένα προκαλεί αύξηση στην έκφραση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9, καθώς και στα επίπεδα έκφρασης του αναστολέα TIMP-1, ενώ δε μεταβάλλει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του TIMP-2. Επιπλέον, η μελέτη της έκφρασης των ιντεγκρινικών υποδοχέων $\beta 1$ και ανβ3 στην κυτταρική επιφάνεια έδειξε ότι ο TNF-α προκαλεί μείωση στα επίπεδα της $\beta 1$ και αύξηση στα επίπεδα της ιντεγκρίνης ανβ3.

Η αντοχή των κυττάρων έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α συνδέεται με την ενεργοποίηση κομβικών κινασών κυτταρικής επιβίωσης όπως οι AKT/PKB και οι MAPKs και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB, ο οποίος επάγει την έκφραση μορίων με αντι-αποπτωτική δράση ή αναστολέων των κασπασών – των κύριων ενζύμων που ενεργοποιούνται κατά το φαινόμενο της απόπτωσης. Αφού διαπιστώθηκε η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB και η εξαρτώμενη εν μέρει επαγωγή της έκφρασης του TIMP-1 από τον NF-KB, διερευνήθηκε περαιτέρω ο ρόλος του TIMP-1 στην προστασία των κυττάρων MG63 από την απόπτωση. Συγκεκριμένα, κατά τη χορήγηση ανασυνδυασμένου TIMP-1 στα κύτταρα MG63 σε αποπτωτικές συνθήκες (TNF-α+CHX) διαπιστώθηκε μείωση του ποσοστού της απόπτωσης, και επιπρόσθετα σε κύτταρα όπου αποσιωπήθηκε το γονίδιο του TIMP-1 παρατηρήθηκε επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF-α.

Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αλλά και συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού διερευνήθηκε περισσότερο μηχανιστικά η προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι της απόπτωσης, αφού προέκυψε ότι ο TIMP-1 αλληλεπιδρά στην κυτταρική επιφάνεια με την ιντεγκρίνη ανβ3. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι λειτουργική, διότι η αναστολή της με την εχιστατίνη (αναστολέας της ιντεγκρίνης ανβ3) μείωσε την προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι της απόπτωσης σε κύτταρα που είχαν επεξεργαστεί με TNF-α+CHX.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προτείνουν έναν πιθανό ρυθμιστικό μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο ο TNF-α επάγει τροποποιήσεις στην έκφραση μορίων της εξωκυττάριας μήτρας και της κυτταρικής επιφάνειας όπως ο αναστολέας των MMPs, TIMP-1, και η ιντεγκρίνη ανβ3. Επιπλέον, αν και ο TNF-α θεωρείται αποπτωτικός παράγοντας, τα κύτταρα MG63 εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης από τον TNF-α. Η αυξημένη έκφραση των TIMP-1 και ανβ3 επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους η οποία μεσολαβεί στην προστασία από την απόπτωση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν στη δράση του TIMP-1 ως νεοσυντιθέμενου μορίου που συμβάλλει στην αντοχή των κυττάρων MG63 στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση, εν μέρει μέσω αλληλεπίδρασης με την ιντεγκρίνη ανβ3 της κυτταρικής επιφάνειας, καθώς διαπιστώθηκε ότι:

α. Η χορήγηση ανθρώπινου ανασυνδυασμένου TIMP-1 εξωγενώς μείωσε τα επίπεδα της απόπτωσης σε κύτταρα MG63 που είχαν επεξεργαστεί με TNF-α/CHX.

β. Η αποσιώπηση του γονιδίου του TIMP-1 με την τεχνική siRNA προκάλεσε αύξηση στο ποσοστό της απόπτωσης των κυττάρων MG63 μετά από επεξεργασία με TNF-α.

γ. Η εχιστατίνη, η οποία δρα παρεμποδιστικά στην αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3, μείωσε την προστατευτική δράση του TIMP-1.

δ. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης ανβ3, LM609, δρώντας ως προσδέτης και προκαλώντας περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του TIMP-1 οδήγησε σε μεγαλύτερη προστασία από την απόπτωση έναντι των παραγόντων TNF-α+CHX.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaberg-Jessen, C., K. Christensen, H. Offenberg, A. Bartels, T. Dreehsen, S. Hansen, H. D. Schroder, N. Brunner, and B. W. Kristensen. 2009. Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *J Neurooncol* 95 (1):117-128.
- Abadie, A., and J. Wietzerbin. 2003. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induction in interferon gamma-mediated apoptosis in Ewing tumor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1010:117-120.
- Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281 (5381):1322-1326.
- Agell, N., O. Bachs, N. Rocamora, and P. Villalonga. 2002. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal* 14 (8):649-654.
- Ahonen, M., R. Ala-Aho, A. H. Baker, S. J. George, R. Grenman, U. Saarialho-Kere, and V. M. Kahari. 2002. Antitumor activity and bystander effect of adenovirally delivered tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Mol Ther* 5 (6):705-715.
- Ahonen, M., M. Poukkula, A. H. Baker, M. Kashiwagi, H. Nagase, J. E. Eriksson, and V. M. Kahari. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* 22 (14):2121-2134.
- Akahane, T., M. Akahane, A. Shah, C. M. Connor, and U. P. Thorgeirsson. 2004a. TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp Cell Res* 301 (2):158-167.
- Akahane, T., M. Akahane, A. Shah, and U. P. Thorgeirsson. 2004b. TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 324 (1):440-445.
- Albelda, S. M., S. A. Mette, D. E. Elder, R. Stewart, L. Damjanovich, M. Herlyn, and C. A. Buck. 1990. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50 (20):6757-6764.
- Alexander, C. M., E. J. Hansell, O. Behrendtsen, M. L. Flannery, N. S. Kishnani, S. P. Hawkes, and Z. Werb. 1996a. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122 (6):1723-1736.
- Alexander, C. M., E. W. Howard, M. J. Bissell, and Z. Werb. 1996b. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol* 135 (6 Pt 1):1669-1677.
- Almeida, E. A., D. Ilic, Q. Han, C. R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D. D. Schlaepfer, and C. H. Damsky. 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* 149 (3):741-754.

- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 (2):171.
- Antonsson, B., and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256 (1):50-57.
- Arron, J. R., and Y. Choi. 2000. Bone versus immune system. *Nature* 408 (6812):535-536.
- Attwell, S., C. Roskelley, and S. Dedhar. 2000. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19 (33):3811-3815.
- Ausubel, F. M., ed. 1989. *Current protocols in molecular biology*. New York: Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.
- Bachelder, R. E., M. A. Wendt, N. Fujita, T. Tsuruo, and A. M. Mercurio. 2001. The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276 (37):34702-34707.
- Bachmeier, B. E., R. Vene, C. M. Iancu, U. Pfeffer, B. Mayer, D. Noonan, A. Albini, M. Jochum, and A. G. Nerlich. 2005. Transcriptional control of cell density dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in breast cancer cell lines. *Thromb Haemost* 93 (4):761-769.
- Bafetti, L. M., T. N. Young, Y. Itoh, and M. S. Stack. 1998. Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J Biol Chem* 273 (1):143-149.
- Baker, A. H., A. B. Zaltsman, S. J. George, and A. C. Newby. 1998. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 101 (6):1478-1487.
- Barry, W. T., C. Boudignon-Proudhon, D. D. Shock, A. McFadden, J. M. Weiss, J. Sondek, and L. V. Parise. 2002. Molecular basis of CIB binding to the integrin alpha IIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 277 (32):28877-28883.
- Beg, A. A., and D. Baltimore. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274 (5288):782-784.
- Bellido, T., C. A. O'Brien, P. K. Roberson, and S. C. Manolagas. 1998. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 273 (33):21137-21144.
- Bennett, J. H., D. H. Carter, A. L. Alavi, J. N. Beresford, and S. Walsh. 2001. Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol* 46 (3):229-238.
- Bentires-Alj, M., E. Dejardin, P. Viatour, C. Van Lint, B. Froesch, J. C. Reed, M. P. Merville, and V. Bours. 2001. Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* 20 (22):2805-2813.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (6818):363-366.
- Bertrand-Philippe, M., R. G. Ruddell, M. J. Arthur, J. Thomas, N. Mungalsingh, and D. A. Mann. 2004. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene transcription by RUNX1 and RUNX2. *J Biol Chem* 279 (23):24530-24539.

- Beutler, B., and A. Cerami. 1989. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7:625-655.
- Beutner, E. H. 1961. Immunofluorescent Staining: the Fluorescent Antibody Method. *Bacteriol Rev* 25 (1):49-76.
- Bhattacharya, S., R. M. Ray, and L. R. Johnson. 2006. Integrin beta3-mediated Src activation regulates apoptosis in IEC-6 cells via Akt and STAT3. *Biochem J* 397 (3):437-447.
- Bieler, G., M. Hasmim, Y. Monnier, N. Imaizumi, M. Ameyar, J. Bamat, L. Ponsonnet, S. Chouaib, M. Grell, S. L. Goodman, F. Lejeune, and C. Ruegg. 2007. Distinctive role of integrin-mediated adhesion in TNF-induced PKB/Akt and NF-kappaB activation and endothelial cell survival. *Oncogene* 26 (39):5722-5732.
- Bitzer, M., G. von Gersdorff, D. Liang, A. Dominguez-Rosales, A. A. Beg, M. Rojkind, and E. P. Bottinger. 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 14 (2):187-197.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385 (6618):729-733.
- Bloomston, M., A. Shafii, E. E. Zervos, and A. S. Rosemurgy. 2002. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res* 102 (1):39-44.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez, and C. B. Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74 (4):597-608.
- Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286 (5443):1358-1362.
- Bord, S., A. Horner, C. A. Beeton, R. M. Hembry, and J. E. Compston. 1999. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. *Bone* 24 (3):229-235.
- Borysenko, C. W., V. Garcia-Palacios, R. D. Griswold, Y. Li, A. K. Iyer, B. B. Yaroslavskiy, A. C. Sharrow, and H. C. Blair. 2006. Death receptor-3 mediates apoptosis in human osteoblasts under narrowly regulated conditions. *J Cell Physiol* 209 (3):1021-1028.
- Botelho, F. M., D. R. Edwards, and C. D. Richards. 1998. Oncostatin M stimulates c-Fos to bind a transcriptionally responsive AP-1 element within the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promoter. *J Biol Chem* 273 (9):5211-5218.
- Boulday, G., J. Fitau, S. Coupel, J. P. Soulillou, and B. Charreau. 2004. Exogenous tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes endothelial cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1030:28-36.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

- Brenner, C. A., R. R. Adler, D. A. Rappolee, R. A. Pedersen, and Z. Werb. 1989. Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev* 3 (6):848-859.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley, and D. A. Cheresh. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85 (5):683-693.
- Bruegmann, E., R. Gruemmer, J. Neulen, and K. Motejlek. 2009. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 secretion from human endothelial cells by tissue inhibitor of metalloproteinase 1. *Mol Hum Reprod* 15 (11):749-756.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, and M. E. Greenberg. 1999a. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96 (6):857-868.
- Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, and J. Pouyssegur. 1999b. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J* 18 (3):664-674.
- Bu, R., C. W. Borysenko, Y. Li, L. Cao, A. Sabokbar, and H. C. Blair. 2003. Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone* 33 (5):760-770.
- Burgering, B. M., and R. H. Medema. 2003. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 73 (6):689-701.
- Buschmann, T., O. Potapova, A. Bar-Shira, V. N. Ivanov, S. Y. Fuchs, S. Henderson, V. A. Fried, T. Minamoto, D. Alarcon-Vargas, M. R. Pincus, W. A. Gaarde, N. J. Holbrook, Y. Shiloh, and Z. Ronai. 2001. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 21 (8):2743-2754.
- Camps, M., A. Nichols, and S. Arkinstall. 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* 14 (1):6-16.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282 (5392):1318-1321.
- Carroll, M. C., P. Katzman, E. M. Alicot, B. H. Koller, D. E. Geraghty, H. T. Orr, J. L. Strominger, and T. Spies. 1987. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (23):8535-8539.
- Caterina, N. C., L. J. Windsor, M. K. Bodden, A. E. Yermovsky, K. B. Taylor, H. Birkedal-Hansen, and J. A. Engler. 1998. Glycosylation and NH2-terminal domain mutants of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *Biochim Biophys Acta* 1388 (1):21-34.
- Caterina, N. C., L. J. Windsor, A. E. Yermovsky, M. K. Bodden, K. B. Taylor, H. Birkedal-Hansen, and J. A. Engler. 1997. Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Biol Chem* 272 (51):32141-32149.

- Cawston, T. E., D. N. Noble, G. Murphy, A. J. Smith, C. Woodley, and B. Hazleman. 1986. Rapid purification of tissue inhibitor of metalloproteinases from human plasma and identification as a gamma-serum protein. *Biochem J* 238 (3):677-682.
- Celiker, M. Y., M. Wang, E. Atsidaftos, X. Liu, Y. E. Liu, Y. Jiang, E. Valderrama, I. D. Goldberg, and Y. E. Shi. 2001. Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* 20 (32):4337-4343.
- Centrella, M., T. L. McCarthy, and E. Canalis. 1987. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262 (6):2869-2874.
- Cerri, P. S., F. Boabaid, and E. Katchburian. 2003. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res* 38 (2):223-226.
- Chambers, T. J., and K. Fuller. 1985. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 76:155-165.
- Chan, W. H., H. Y. Wu, and W. H. Chang. 2006. Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. *Food Chem Toxicol* 44 (8):1362-1371.
- Chang, L., H. Kamata, G. Solinas, J. L. Luo, S. Maeda, K. Venuprasad, Y. C. Liu, and M. Karin. 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124 (3):601-613.
- Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 (6824):37-40.
- Chen, W., S. Yang, Y. Abe, M. Li, Y. Wang, J. Shao, E. Li, and Y. P. Li. 2007. Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Hum Mol Genet* 16 (4):410-423.
- Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J. M. Hardwick. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278 (5345):1966-1968.
- Cheng, S. L., C. F. Lai, S. D. Blystone, and L. V. Avioli. 2001. Bone mineralization and osteoblast differentiation are negatively modulated by integrin alpha(v)beta3. *J Bone Miner Res* 16 (2):277-288.
- Chirco, R., X. W. Liu, K. K. Jung, and H. R. Kim. 2006. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25 (1):99-113.
- Choi, S. S., I. C. Park, J. W. Yun, Y. C. Sung, S. I. Hong, and H. S. Shin. 1995. A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11 (9):1693-1698.
- Chowdhury, D., and J. Lieberman. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26:389-420.
- Chua, C. C., B. H. Chua, Z. Chen, C. Landy, and R. C. Hamdy. 2002. TGF-beta1 inhibits multiple caspases induced by TNF-alpha in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1593 (1):1-8.
- . 2003. Dexamethasone induces caspase activation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1642 (1-2):79-85.

- Chung, D. H., J. I. Lee, M. C. Kook, J. R. Kim, S. H. Kim, E. Y. Choi, S. H. Park, and H. G. Song. 1998. ILK (beta1-integrin-linked protein kinase): a novel immunohistochemical marker for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumour. *Virchows Arch* 433 (2):113-117.
- Clarke, P., and K. L. Tyler. 2009. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol* 7 (2):144-155.
- Clem, R. J., E. H. Cheng, C. L. Karp, D. G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M. B. Kastan, D. E. Griffin, W. C. Earnshaw, M. A. Veluona, and J. M. Hardwick. 1998. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2):554-559.
- Clover, J., and M. Gowen. 1994. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 15 (6):585-591.
- Cohen, J. J., and R. C. Duke. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132 (1):38-42.
- Cohen, M. M., Jr. 2006. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140 (23):2646-2706.
- Colucci, S., G. Brunetti, F. P. Cantatore, A. Oranger, G. Mori, P. Pignataro, R. Tamma, F. R. Grassi, A. Zallone, and M. Grano. 2007. The death receptor DR5 is involved in TRAIL-mediated human osteoclast apoptosis. *Apoptosis* 12 (9):1623-1632.
- Coons, A. H. 1961. The beginnings of immunofluorescence. *J Immunol* 87:499-503.
- Cosaceanu, D., R. A. Budiu, M. Carapancea, J. Castro, R. Lewensohn, and A. Dricu. 2007. Ionizing radiation activates IGF-1R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism. *Oncogene* 26 (17):2423-2434.
- D'Alessio, S., G. Ferrari, K. Cinnante, W. Scheerer, A. C. Galloway, D. F. Roses, D. V. Rozanov, A. G. Remacle, E. S. Oh, S. A. Shiryaev, A. Y. Strongin, G. Pintucci, and P. Mignatti. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem* 283 (1):87-99.
- Damsky, C. H., A. Moursi, Y. Zhou, S. J. Fisher, and R. K. Globus. 1997. The solid state environment orchestrates embryonic development and tissue remodeling. *Kidney Int* 51 (5):1427-1433.
- Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116 (2):205-219.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91 (2):231-241.
- Davidsen, M. L., S. O. Wurtz, M. U. Romer, N. M. Sorensen, S. K. Johansen, I. J. Christensen, J. K. Larsen, H. Offenberg, N. Brunner, and U. Lademann. 2006. TIMP-1 gene deficiency increases tumour cell sensitivity to chemotherapy-induced apoptosis. *Br J Cancer* 95 (8):1114-1120.
- Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103 (2):239-252.
- de Hooge, A. S., D. Berghuis, S. J. Santos, E. Mooiman, S. Romeo, J. A. Kummer, R. M. Egeler, M. J. van Tol, C. J. Melief, P. C. Hogendoorn, and A. C. Lankester.

2007. Expression of cellular FLICE inhibitory protein, caspase-8, and protease inhibitor-9 in Ewing sarcoma and implications for susceptibility to cytotoxic pathways. *Clin Cancer Res* 13 (1):206-214.
- De Lorenzo, M. S., D. F. Alonso, and D. E. Gomez. 2000. Nafoxidine modulates the expression of matrix-metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in endothelial cells. *Anticancer Res* 20 (1A):395-400.
- De Smaele, E., F. Zazzeroni, S. Papa, D. U. Nguyen, R. Jin, J. Jones, R. Cong, and G. Franzoso. 2001. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 414 (6861):308-313.
- Dean, G., D. A. Young, D. R. Edwards, and I. M. Clark. 2000. The human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 gene contains repressive elements within the promoter and intron 1. *J Biol Chem* 275 (42):32664-32671.
- Dechant, M. J., J. Fellenberg, C. G. Scheuerpflug, V. Ewerbeck, and K. M. Debatin. 2004. Mutation analysis of the apoptotic "death-receptors" and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *Int J Cancer* 109 (5):661-667.
- Dedhar, S. 2000. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2):250-256.
- Defilles, C., J. C. Lissitzky, M. P. Montero, F. Andre, C. Prevot, E. Delamarre, N. Marrakchi, J. Luis, and V. Rigot. 2009. alphavbeta5/beta6 integrin suppression leads to a stimulation of alpha2beta1 dependent cell migration resistant to PI3K/Akt inhibition. *Exp Cell Res* 315 (11):1840-1849.
- Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, and S. Dedhar. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (19):11211-11216.
- Delhase, M., M. Hayakawa, Y. Chen, and M. Karin. 1999. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284 (5412):309-313.
- Denault, J. B., and G. S. Salvesen. 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102 (12):4489-4500.
- Deng, X., S. Bhagat, Z. Dong, C. Mullins, S. R. Chinni, and M. Cher. 2006. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in prostate cancer cells and confers increased sensitivity to paclitaxel. *Eur J Cancer* 42 (18):3267-3273.
- Deng, Y., X. Ren, L. Yang, Y. Lin, and X. Wu. 2003. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115 (1):61-70.
- Deryugina, E. I., A. Zijlstra, J. J. Partridge, T. A. Kupriyanova, M. A. Madsen, T. Papagiannakopoulos, and J. P. Quigley. 2005. Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Res* 65 (23):10959-10969.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson, and J. C. Martinou. 2001. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8 (3):601-611.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388 (6639):300-304.

- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12 (22):3499-3511.
- Dieudonne, S. C., P. Foo, E. J. van Zoelen, and E. H. Burger. 1991. Inhibiting and stimulating effects of TGF- β 1 on osteoclastic bone resorption in fetal mouse bone organ cultures. *J Bone Miner Res* 6 (5):479-487.
- Doty, S. B. 1981. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 33 (5):509-512.
- Drynda, A., P. H. Quax, M. Neumann, W. H. van der Laan, G. Pap, S. Drynda, I. Meinecke, J. Kekow, W. Neumann, T. W. Huizinga, M. Naumann, W. Konig, and T. Pap. 2005. Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 reverses the inhibitory effects of TNF- α on Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 174 (10):6524-6531.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102 (1):33-42.
- Duan, X., S. F. Jia, Z. Zhou, R. R. Langley, M. F. Bolontrade, and E. S. Kleinerman. 2004. Association of α v β 3 integrin expression with the metastatic potential and migratory and chemotactic ability of human osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* 21 (8):747-753.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89 (5):747-754.
- Duivenvoorden, W. C., H. W. Hirte, and G. Singh. 1999. Transforming growth factor β 1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17 (1):27-34.
- Duque, G., K. El Abdaimi, J. E. Henderson, A. Lomri, and R. Kremer. 2004. Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone* 35 (1):57-64.
- Duque, G., D. C. Huang, M. Macoritto, D. Rivas, X. F. Yang, L. G. Ste-Marie, and R. Kremer. 2009. Autocrine regulation of interferon gamma in mesenchymal stem cells plays a role in early osteoblastogenesis. *Stem Cells* 27 (3):550-558.
- Duvall, E., A. H. Wyllie, and R. G. Morris. 1985. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56 (2):351-358.
- Ekert, P. G., J. Silke, C. J. Hawkins, A. M. Verhagen, and D. L. Vaux. 2001. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* 152 (3):483-490.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836):494-498.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662):43-50.
- Engel, M. E., M. A. McDonnell, B. K. Law, and H. L. Moses. 1999. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- β -mediated transcription. *J Biol Chem* 274 (52):37413-37420.
- Evdokiou, A., S. Bouralexis, G. J. Atkins, F. Chai, S. Hay, M. Clayer, and D. M. Findlay. 2002. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells,

- but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 99 (4):491-504.
- Fan, M., M. Goodwin, T. Vu, C. Brantley-Finley, W. A. Gaarde, and T. C. Chambers. 2000. Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J Biol Chem* 275 (39):29980-29985.
- Farooq, A., and M. M. Zhou. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16 (7):769-779.
- Fata, J. E., K. J. Leco, R. A. Moorehead, D. C. Martin, and R. Khokha. 1999. Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse mammary development. *Dev Biol* 211 (2):238-254.
- Fernandez, C. A., and M. A. Moses. 2006. Modulation of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (1):523-529.
- Ferrari, C., S. Benassi, F. Ponticelli, G. Gamberi, P. Ragazzini, L. Pazzaglia, A. Balladelli, F. Bertoni, and P. Picci. 2004. Role of MMP-9 and its tissue inhibitor TIMP-1 in human osteosarcoma: findings in 42 patients followed for 1-16 years. *Acta Orthop Scand* 75 (4):487-491.
- Fesus, L., P. J. Davies, and M. Piacentini. 1991. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 56 (2):170-177.
- Filippa, N., C. L. Sable, C. Filloux, B. Hemmings, and E. Van Obberghen. 1999. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 19 (7):4989-5000.
- Finan, K. M., G. Hodge, A. M. Reynolds, S. Hodge, M. D. Holmes, A. H. Baker, and P. N. Reynolds. 2006. In vitro susceptibility to the pro-apoptotic effects of TIMP-3 gene delivery translates to greater in vivo efficacy versus gene delivery for TIMPs-1 or -2. *Lung Cancer* 53 (3):273-284.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (6669):806-811.
- Fornaro, M., J. Plescia, S. Chheang, G. Tallini, Y. M. Zhu, M. King, D. C. Altieri, and L. R. Languino. 2003. Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *J Biol Chem* 278 (50):50402-50411.
- Francois, F., M. J. Godinho, and M. L. Grimes. 2000. CREB is cleaved by caspases during neural cell apoptosis. *FEBS Lett* 486 (3):281-284.
- Freshney, R. I. 1994. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 3rd ed. New York: Wiley-Liss.
- Frisch, S. M., and H. Francis. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124 (4):619-626.
- Frost, H. M. 1991. A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. *Bone* 12 (6):429-437.
- Fu, W., L. Ma, B. Chu, X. Wang, M. M. Bui, J. Gemmer, S. Altioek, and W. J. Pledger. The cyclin-dependent kinase inhibitor SCH 727965 (Dinaciclib) induces the apoptosis of osteosarcoma cells. *Mol Cancer Ther*.
- Fukai, F., M. Mashimo, K. Akiyama, T. Goto, S. Tanuma, and T. Katayama. 1998. Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp Cell Res* 242 (1):92-99.

- Gardner, J., K. Borgmann, M. S. Deshpande, A. Dhar, L. Wu, R. Persidsky, and A. Ghorpade. 2006. Potential mechanisms for astrocyte-TIMP-1 downregulation in chronic inflammatory diseases. *J Neurosci Res* 83 (7):1281-1292.
- Garnett, T. O., M. Filippova, and P. J. Duerksen-Hughes. 2007. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* 12 (7):1299-1315.
- Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285 (5430):1028-1032.
- Gibson, L., S. P. Holmgreen, D. C. Huang, O. Bernard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. R. Sutherland, E. Baker, J. M. Adams, and S. Cory. 1996. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13 (4):665-675.
- Gilbert, L., X. He, P. Farmer, S. Boden, M. Kozlowski, J. Rubin, and M. S. Nanes. 2000. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 141 (11):3956-3964.
- Gilbert, L., X. He, P. Farmer, J. Rubin, H. Drissi, A. J. van Wijnen, J. B. Lian, G. S. Stein, and M. S. Nanes. 2002. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 277 (4):2695-2701.
- Globus, R. K., S. B. Doty, J. C. Lull, E. Holmuhamedov, M. J. Humphries, and C. H. Damsky. 1998. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1385-1393.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji, and U. P. Thorgeirsson. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74 (2):111-122.
- Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, and W. Bode. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389 (6646):77-81.
- Gorrini, C., F. Loreni, V. Gandin, L. A. Sala, N. Sonenberg, P. C. Marchisio, and S. Biffo. 2005. Fibronectin controls cap-dependent translation through beta1 integrin and eukaryotic initiation factors 4 and 2 coordinated pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (26):9200-9205.
- Gottlieb, T. M., J. F. Leal, R. Seger, Y. Taya, and M. Oren. 2002. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21 (8):1299-1303.
- Graff, J. R., J. A. Deddens, B. W. Konicek, B. M. Colligan, B. M. Hurst, H. W. Carter, and J. H. Carter. 2001. Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 7 (7):1987-1991.
- Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen, and Y. E. Shi. 1996. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271 (48):30375-30380.
- Groft, L. L., H. Muzik, N. B. Rewcastle, R. N. Johnston, V. Knauper, M. A. Lafleur, P. A. Forsyth, and D. R. Edwards. 2001. Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *Br J Cancer* 85 (1):55-63.

- Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13 (15):1899-1911.
- Guede, L., A. J. McMarlin, D. W. Kingma, T. A. Bennett, M. Stetler-Stevenson, and W. G. Stetler-Stevenson. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol* 158 (4):1207-1215.
- Guede, L., W. G. Stetler-Stevenson, L. Wolff, J. Wang, P. Fukushima, A. Mansoor, and M. Stetler-Stevenson. 1998. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102 (11):2002-2010.
- Guo, L. J., X. H. Luo, H. Xie, H. D. Zhou, L. Q. Yuan, M. Wang, and E. Y. Liao. 2006. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 suppresses apoptosis of mouse bone marrow stromal cell line MBA-1. *Calcif Tissue Int* 78 (5):285-292.
- Guo, Y. H., W. Gao, Q. Li, P. F. Li, P. Y. Yao, and K. Chen. 2004. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 suppresses vascular smooth muscle cell migration and induces cell apoptosis. *Life Sci* 75 (20):2483-2493.
- Hahn-Dantona, E., J. F. Ruiz, P. Bornstein, and D. K. Strickland. 2001. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 276 (18):15498-15503.
- Hall, M. C., D. A. Young, J. G. Waters, A. D. Rowan, A. Chantry, D. R. Edwards, and I. M. Clark. 2003. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 278 (12):10304-10313.
- Hamilton, A. J., and D. C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (5441):950-952.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi, and G. J. Hannon. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293 (5532):1146-1150.
- Hammoud, L., D. E. Burger, X. Lu, and Q. Feng. 2009. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits neonatal mouse cardiomyocyte proliferation via EGFR/JNK/SP-1 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (4):C735-745.
- Han, J., and P. Sun. 2007. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 32 (8):364-371.
- Han, X., Y. Sun, S. Scott, and D. Bleich. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 prevents cytokine-mediated dysfunction and cytotoxicity in pancreatic islets and beta-cells. *Diabetes* 50 (5):1047-1055.
- Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell, and S. Dedhar. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379 (6560):91-96.
- Hatada, E. N., A. Nieters, F. G. Wulczyn, M. Naumann, R. Meyer, G. Nucifora, T. W. McKeithan, and C. Scheidereit. 1992. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (6):2489-2493.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima, and K. Iwata. 1992. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a

- wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 298 (1):29-32.
- Hemler, M. E. 1998. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10 (5):578-585.
- Heremans, H., A. Billiau, J. J. Cassiman, J. C. Mulier, and P. de Somer. 1978. In vitro cultivation of human tumor tissues. II. Morphological and virological characterization of three cell lines. *Oncology* 35 (6):246-252.
- Heusch, M., L. Lin, R. Geleziunas, and W. C. Greene. 1999. The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* 18 (46):6201-6208.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7 (11):2135-2148.
- Hill, P. A., J. J. Reynolds, and M. C. Meikle. 1993. Inhibition of stimulated bone resorption in vitro by TIMP-1 and TIMP-2. *Biochim Biophys Acta* 1177 (1):71-74.
- Hill, P. A., A. Tumber, and M. C. Meikle. 1997. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 138 (9):3849-3858.
- Ho, W. P., W. P. Chan, M. S. Hsieh, and R. M. Chen. 2009. Runx2-mediated bcl-2 gene expression contributes to nitric oxide protection against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis. *J Cell Biochem* 108 (5):1084-1093.
- Hofbauer, L. C., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs, and S. Khosla. 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25 (3):255-259.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1 (6):489-495.
- Honkavuori, M., A. Talvensaaari-Mattila, U. Puistola, T. Turpeenniemi-Hujanen, and M. Santala. 2008. High serum TIMP-1 is associated with adverse prognosis in endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 28 (5A):2715-2719.
- Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81 (4):495-504.
- Huang, D. C., and A. Strasser. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103 (6):839-842.
- Huang, W. W., Y. J. Chiu, M. J. Fan, H. F. Lu, H. F. Yeh, K. H. Li, P. Y. Chen, J. G. Chung, and J. S. Yang. Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. *Mol Nutr Food Res* 54 (11):1585-1595.
- Hui, L., L. Bakiri, E. Stepniak, and E. F. Wagner. 2007. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6 (20):2429-2433.
- Hunter, I., D. McGregor, and S. P. Robins. 2001. Caspase-dependent cleavage of cadherins and catenins during osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 16 (3):466-477.
- Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (6):673-687.
- Ilic, D., E. A. Almeida, D. D. Schlaepfer, P. Dazin, S. Aizawa, and C. H. Damsky. 1998. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* 143 (2):547-560.

- Inoue, M., F. P. Ross, J. M. Erdmann, Y. Abu-Amer, S. Wei, and S. L. Teitelbaum. 2000. Tumor necrosis factor alpha regulates alpha(v)beta5 integrin expression by osteoclast precursors in vitro and in vivo. *Endocrinology* 141 (1):284-290.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388 (6638):190-195.
- Ito, Y., and K. Miyazono. 2003. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 13 (1):43-47.
- Jacobson, M. D., M. Weil, and M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 (3):347-354.
- Jilka, R. L., R. S. Weinstein, T. Bellido, A. M. Parfitt, and S. C. Manolagas. 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13 (5):793-802.
- Jimi, E., and S. Ghosh. 2005. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev* 208:80-87.
- Johnson, J. L., A. H. Baker, K. Oka, L. Chan, A. C. Newby, C. L. Jackson, and S. J. George. 2006. Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* 113 (20):2435-2444.
- Jung, K. K., X. W. Liu, R. Chirco, R. Fridman, and H. R. Kim. 2006. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *Embo J* 25 (17):3934-3942.
- Kale, V. P., and A. A. Vaidya. 2004. Molecular mechanisms behind the dose-dependent differential activation of MAPK pathways induced by transforming growth factor-beta1 in hematopoietic cells. *Stem Cells Dev* 13 (5):536-547.
- Kamata, H., and H. Hirata. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11 (1):1-14.
- Kamata, H., S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata, and M. Karin. 2005. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120 (5):649-661.
- Kang, K. H., S. Y. Park, S. B. Rho, and J. H. Lee. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79 (1):150-160.
- Karadag, A., and L. W. Fisher. 2006. Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to alpha(v)beta3-integrin. *J Bone Miner Res* 21 (10):1627-1636.
- Karin, M., and A. Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3 (3):221-227.
- Karsdal, M. A., L. Larsen, M. T. Engsig, H. Lou, M. Ferreras, A. Lochter, J. M. Delaisse, and N. T. Foged. 2002. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* 277 (46):44061-44067.
- Karst, M., G. Gorny, R. J. Galvin, and M. J. Oursler. 2004. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 200 (1):99-106.
- Kasibhatla, S., T. Brunner, L. Genestier, F. Echeverri, A. Mahboubi, and D. R. Green. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent

- apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1 (4):543-551.
- Kasof, G. M., J. J. Lu, D. Liu, B. Speer, K. N. Mongan, B. C. Gomes, and M. V. Lorenzi. 2001. Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB. *Oncogene* 20 (55):7965-7975.
- Kefaloyianni, E., C. Gaitanaki, and I. Beis. 2006. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal* 18 (12):2238-2251.
- Kikuchi, K., T. Kadono, M. Furue, and K. Tamaki. 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108 (3):281-284.
- Kim, D. S., O. H. Jeon, H. D. Lee, K. H. Yoo, and D. S. Kim. 2008a. Integrin alphavbeta3-mediated transcriptional regulation of TIMP-1 in a human ovarian cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 377 (2):479-483.
- Kim, Y. S., S. Y. Hwang, H. Y. Kang, H. Sohn, S. Oh, J. Y. Kim, J. S. Yoo, Y. H. Kim, C. H. Kim, J. H. Jeon, J. M. Lee, H. A. Kang, E. Miyoshi, N. Taniguchi, H. S. Yoo, and J. H. Ko. 2008b. Functional proteomics study reveals that N-Acetylglucosaminyltransferase V reinforces the invasive/metastatic potential of colon cancer through aberrant glycosylation on tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Mol Cell Proteomics* 7 (1):1-14.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14 (22):5579-5588.
- Klein, B. Y., Z. Kerem, and N. Rojansky. 2006. LDL induces Saos2 osteoblasts death via Akt pathways responsive to a neutral sphingomyelinase inhibitor. *J Cell Biochem* 98 (3):661-671.
- Kobayashi, K., N. Takahashi, E. Jimi, N. Udagawa, M. Takami, S. Kotake, N. Nakagawa, M. Kinosaki, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, T. Morinaga, K. Higashio, T. J. Martin, and T. Suda. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191 (2):275-286.
- Konishi, H., H. Matsuzaki, M. Tanaka, Y. Takemura, S. Kuroda, Y. Ono, and U. Kikkawa. 1997. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett* 410 (2-3):493-498.
- Kontny, H. U., K. Hammerle, R. Klein, P. Shayan, C. L. Mackall, and C. M. Niemeyer. 2001. Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 8 (5):506-514.
- Kops, G. J., and B. M. Burgering. 2000. Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (C-AKT). *J Anat* 197 Pt 4:571-574.
- Kostoulas, G., A. Lang, H. Nagase, and A. Baici. 1999. Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 455 (3):286-290.
- Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski, and L. T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278 (5336):294-298.

- Kovacsovics, M., F. Martinon, O. Micheau, J. L. Bodmer, K. Hofmann, and J. Tschopp. 2002. Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol* 12 (10):838-843.
- Kozopas, K. M., T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou, and R. W. Craig. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (8):3516-3520.
- Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan, and C. Gelinas. 2003. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22 (56):8961-8982.
- Kudo, O., Y. Fujikawa, I. Itonaga, A. Sabokbar, T. Torisu, and N. A. Athanasou. 2002. Proinflammatory cytokine (TNFalpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. *J Pathol* 198 (2):220-227.
- Kurenova, E., L. H. Xu, X. Yang, A. S. Baldwin, Jr., R. J. Craven, S. K. Hanks, Z. G. Liu, and W. G. Cance. 2004. Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein. *Mol Cell Biol* 24 (10):4361-4371.
- Kuwana, T., and D. D. Newmeyer. 2003. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15 (6):691-699.
- Kwak, H. J., M. J. Park, H. Cho, C. M. Park, S. I. Moon, H. C. Lee, I. C. Park, M. S. Kim, C. H. Rhee, and S. I. Hong. 2006. Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol Cancer Res* 4 (3):209-220.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W. J. Boyle. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93 (2):165-176.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lambert, E., C. Boudot, Z. Kadri, M. Soula-Rothhut, M. L. Sowa, P. Mayeux, W. Hornebeck, B. Haye, and E. Petitfrere. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 372 (Pt 3):767-774.
- Lambert, E., L. Bridoux, J. Devy, E. Dasse, M. L. Sowa, L. Duca, W. Hornebeck, L. Martiny, and E. Petitfrere-Charpentier. 2009. TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (5):1102-1115.
- Lambert, E., E. Dasse, B. Haye, and E. Petitfrere. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49 (3):187-198.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, and W. C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371 (6495):346-347.
- Leco, K. J., S. S. Apte, G. T. Taniguchi, S. P. Hawkes, R. Khokha, G. A. Schultz, and D. R. Edwards. 1997. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 401 (2-3):213-217.

- Lee, B. H., and E. Ruoslahti. 2005. $\alpha 5\beta 1$ integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Biochem* 95 (6):1214-1223.
- Lee, E. G., D. L. Boone, S. Chai, S. L. Libby, M. Chien, J. P. Lodolce, and A. Ma. 2000. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289 (5488):2350-2354.
- Lee, S. J., H. J. Yoo, Y. S. Bae, H. J. Kim, and S. T. Lee. 2003. TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem Biophys Res Commun* 312 (4):1196-1201.
- Lei, K., and R. J. Davis. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (5):2432-2437.
- Leist, M., and M. Jaattela. 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8 (4):324-326.
- Levkau, B., R. D. Kenagy, A. Karsan, B. Weitkamp, A. W. Clowes, R. Ross, and E. W. Raines. 2002. Activation of metalloproteinases and their association with integrins: an auxiliary apoptotic pathway in human endothelial cells. *Cell Death Differ* 9 (12):1360-1367.
- Levkau, B., M. Scatena, C. M. Giachelli, R. Ross, and E. W. Raines. 1999. Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* 1 (4):227-233.
- Ley, R., K. Balmanno, K. Hadfield, C. Weston, and S. J. Cook. 2003. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278 (21):18811-18816.
- Li, G., R. Fridman, and H. R. Kim. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 59 (24):6267-6275.
- Li, Q., and I. M. Verma. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2 (10):725-734.
- Li, R., P. Rieu, D. L. Griffith, D. Scott, and M. A. Arnaout. 1998. Two functional states of the CD11b A-domain: correlations with key features of two Mn^{2+} -complexed crystal structures. *J Cell Biol* 143 (6):1523-1534.
- Liang, M., G. Russell, and P. A. Hulley. 2008. Bim, Bak, and Bax regulate osteoblast survival. *J Bone Miner Res* 23 (5):610-620.
- Lim, M. S., L. Guedez, W. G. Stetler-Stevenson, and M. Stetler-Stevenson. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 induces apoptosis in human T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 878:522-523.
- Lin, D., E. J. Kamsteeg, Y. Zhang, Y. Jin, H. Sterling, P. Yue, M. Roos, A. Duffield, J. Spencer, M. Caplan, and W. H. Wang. 2008. Expression of tetraspan protein CD63 activates protein-tyrosine kinase (PTK) and enhances the PTK-induced inhibition of ROMK channels. *J Biol Chem* 283 (12):7674-7681.
- Lin, H., X. Chen, and B. Fu. 2001. [Effects of sense and antisense tissue inhibitor metalloproteinase-1 on apoptosis of rat glomerular mesangial cells and its related-gene expressions]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 81 (7):411-414.
- Lin, T. H., A. E. Aplin, Y. Shen, Q. Chen, M. Schaller, L. Romer, I. Aukhil, and R. L. Juliano. 1997. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of

- FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol* 136 (6):1385-1395.
- Lin, Y., S. Choksi, H. M. Shen, Q. F. Yang, G. M. Hur, Y. S. Kim, J. H. Tran, S. A. Nedospasov, and Z. G. Liu. 2004. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 279 (11):10822-10828.
- Lindemann, S., N. D. Tolley, J. R. Eyre, L. W. Kraiss, T. M. Mahoney, and A. S. Weyrich. 2001. Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control. *J Biol Chem* 276 (36):33947-33951.
- Liu, H., B. Chen, and B. Lilly. 2008. Fibroblasts potentiate blood vessel formation partially through secreted factor TIMP-1. *Angiogenesis* 11 (3):223-234.
- Liu, R. Y., C. Fan, G. Liu, N. E. Olashaw, and K. S. Zuckerman. 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor- α -supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines. *J Biol Chem* 275 (28):21086-21093.
- Liu, X. W., M. M. Bernardo, R. Fridman, and H. R. Kim. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 278 (41):40364-40372.
- Liu, X. W., M. E. Taube, K. K. Jung, Z. Dong, Y. J. Lee, S. Roshy, B. F. Sloane, R. Fridman, and H. R. Kim. 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res* 65 (3):898-906.
- Lizarraga, F., V. Maldonado, and J. Melendez-Zajgla. 2004. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 growth-stimulatory activity is mediated by nuclear factor-kappa B in A549 lung epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (8):1655-1663.
- Logan, S. K., M. J. Garabedian, C. E. Campbell, and Z. Werb. 1996. Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J Biol Chem* 271 (2):774-782.
- Loya, A. C., K. S. Ratnakar, and R. A. Shastry. 2004. Combined osteoclastic giant cell and pleomorphic giant cell tumor of the pancreas: a rarity. An immunohistochemical analysis and review of the literature. *Jop* 5 (4):220-224.
- Lu, N. Z., J. B. Collins, S. F. Grissom, and J. A. Cidlowski. 2007. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 27 (20):7143-7160.
- Lu, P. Z., C. Y. Lai, and W. H. Chan. 2008. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci* 9 (5):698-718.
- Luparello, C., G. Avanzato, C. Carella, and I. Pucci-Minafra. 1999. Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 54 (3):235-244.
- Macrae, I. J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams, and J. A. Doudna. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311 (5758):195-198.

- Martin, S. J., G. Mazdai, J. J. Strain, T. G. Cotter, and B. M. Hannigan. 1991. Programmed cell death (apoptosis) in lymphoid and myeloid cell lines during zinc deficiency. *Clin Exp Immunol* 83 (2):338-343.
- Matsuyama, S., M. Iwadate, M. Kondo, M. Saitoh, A. Hanyu, K. Shimizu, H. Aburatani, H. K. Mishima, T. Imamura, K. Miyazono, and K. Miyazawa. 2003. SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 63 (22):7791-7798.
- Matter, M. L., and E. Ruoslahti. 2001. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 276 (30):27757-27763.
- Maundrell, K., B. Antonsson, E. Magnenat, M. Camps, M. Muda, C. Chabert, C. Gillieron, U. Boschert, E. Vial-Knecht, J. C. Martinou, and S. Arkinstall. 1997. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem* 272 (40):25238-25242.
- Mayur, N., S. Lewis, B. D. Catherwood, and M. S. Nanes. 1993. Tumor necrosis factor alpha decreases 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *J Bone Miner Res* 8 (8):997-1003.
- Mebratu, Y. A., B. F. Dickey, C. Evans, and Y. Tesfagzi. 2008. The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFNgamma-induced cell death. *J Cell Biol* 183 (3):429-439.
- Mercurio, F., H. Zhu, B. W. Murray, A. Shevchenko, B. L. Bennett, J. Li, D. B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, and A. Rao. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278 (5339):860-866.
- Michishita, M., V. Videm, and M. A. Arnaout. 1993. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72 (6):857-867.
- Mitsiades, N., V. Poulaki, A. Leone, and M. Tsokos. 1999. Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 91 (19):1678-1684.
- Mohammed, F. F., C. J. Pennington, Z. Kassiri, J. S. Rubin, P. D. Soloway, U. Ruther, D. R. Edwards, and R. Khokha. 2005. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* 41 (4):857-867.
- Montgomery, A. M., R. A. Reisfeld, and D. A. Cheresh. 1994. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (19):8856-8860.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2):55-63.
- Moursi, A. M., R. K. Globus, and C. H. Damsky. 1997. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 18):2187-2196.
- Muchmore, S. W., M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettesheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S. L. Wong, S. L. Ng, and S. W. Fesik. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381 (6580):335-341.

- Mulder, K. M. 2000. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 11 (1-2):23-35.
- Murate, T., K. Yamashita, H. Ohashi, Y. Kagami, K. Tsushita, T. Kinoshita, T. Hotta, H. Saito, S. Yoshida, K. J. Mori, and et al. 1993. Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-I-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. *Exp Hematol* 21 (1):169-176.
- Murphy, F. R., R. Issa, X. Zhou, S. Ratnarajah, H. Nagase, M. J. Arthur, C. Benyon, and J. P. Iredale. 2002. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 277 (13):11069-11076.
- Nagase, H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378 (3-4):151-160.
- Nagase, H., K. Suzuki, T. E. Cawston, and K. Brew. 1997. Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochem J* 325 (Pt 1):163-167.
- Nagase, H., and J. F. Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274 (31):21491-21494.
- Nakano, K., and K. H. Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7 (3):683-694.
- Nakase, T., K. Takaoka, K. Masuhara, K. Shimizu, H. Yoshikawa, and T. Ochi. 1997. Interleukin-1 beta enhances and tumor necrosis factor-alpha inhibits bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* 21 (1):17-21.
- Nanes, M. S. 2003. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321:1-15.
- Naumann, M. 2000. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol* 60 (8):1109-1114.
- Nesti, L. J., E. J. Caterson, M. Wang, R. Chang, F. Chapovsky, J. B. Hoek, and R. S. Tuan. 2002. TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *J Orthop Res* 20 (5):1042-1049.
- Newell, K. J., J. P. Witty, W. H. Rodgers, and L. M. Matrisian. 1994. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 10 (4):199-206.
- Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, and et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376 (6535):37-43.
- Nicholson, K. M., and N. G. Anderson. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14 (5):381-395.
- Nishina, H., L. Radvanyi, K. Raju, T. Sasaki, I. Kozieradzki, and J. M. Penninger. 1998. Impaired TCR-mediated apoptosis and Bcl-XL expression in T cells lacking the stress kinase activator SEK1/MKK4. *J Immunol* 161 (7):3416-3420.

- Nothnick, W. B. 2001. Reduction in reproductive lifespan of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)-deficient female mice. *Reproduction* 122 (6):923-927.
- Nykanen, A., B. Haley, and P. D. Zamore. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107 (3):309-321.
- Ortega-Perez, I., E. Cano, F. Were, M. Villar, J. Vazquez, and J. M. Redondo. 2005. c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* 280 (21):20867-20878.
- Page, C. E., S. Smale, S. M. Carty, N. Amos, S. N. Lauder, R. M. Goodfellow, P. J. Richards, S. A. Jones, N. Topley, and A. S. Williams. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. In *Arthritis Res Ther*, R49.
- Panagakos, F. S., and S. Kumar. 1994. Modulation of proteases and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Inflammation* 18 (3):243-265.
- Pautke, C., M. Schieker, T. Tischer, A. Kolk, P. Neth, W. Mutschler, and S. Milz. 2004. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* 24 (6):3743-3748.
- Pavalko, F. M., R. L. Gerard, S. M. Ponik, P. J. Gallagher, Y. Jin, and S. M. Norvell. 2003. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3. *J Cell Physiol* 194 (2):194-205.
- Perez-Garcia, M. J., V. Cena, Y. de Pablo, M. Llovera, J. X. Comella, and R. M. Soler. 2004. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 279 (7):6132-6142.
- Perez-Martinez, L., and D. M. Jaworski. 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci* 25 (20):4917-4929.
- Perotti, M., F. Toddei, F. Mirabelli, M. Vairetti, G. Bellomo, D. J. McConkey, and S. Orrenius. 1990. Calcium-dependent DNA fragmentation in human synovial cells exposed to cold shock. *FEBS Lett* 259 (2):331-334.
- Perry, D. K., M. J. Smyth, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, P. Duriez, G. G. Poirier, and Y. A. Hannun. 1997. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 272 (30):18530-18533.
- Persad, S., S. Attwell, V. Gray, M. Delcommenne, A. Troussard, J. Sanghera, and S. Dedhar. 2000. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7):3207-3212.
- Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275 (29):21785-21788.
- Qi, J. H., Q. Ebrahim, N. Moore, G. Murphy, L. Claesson-Welsh, M. Bond, A. Baker, and B. Anand-Apte. 2003. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9 (4):407-415.

- Qu, A., and D. J. Leahy. 1995. Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (22):10277-10281.
- Radeff-Huang, J., T. M. Seasholtz, J. W. Chang, J. M. Smith, C. T. Walsh, and J. H. Brown. 2007. Tumor necrosis factor-alpha-stimulated cell proliferation is mediated through sphingosine kinase-dependent Akt activation and cyclin D expression. *J Biol Chem* 282 (2):863-870.
- Raisz, L. G. 1997. The osteoporosis revolution. *Ann Intern Med* 126 (6):458-462.
- . 1999. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 45 (8 Pt 2):1353-1358.
- Rao, L., D. Perez, and E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135 (6 Pt 1):1441-1455.
- Ravi, R., A. Bedi, E. J. Fuchs, and A. Bedi. 1998. CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* 58 (5):882-886.
- Reed, M. J., T. Koike, E. Sadoun, E. H. Sage, and P. Puolakkainen. 2003. Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis in vivo and cell migration in vitro. *Microvasc Res* 65 (1):9-17.
- Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, J. A. Lees, and M. B. Yaffe. 2007. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11 (2):175-189.
- Retta, S. F., G. Cassara, M. D'Amato, R. Alessandro, M. Pellegrino, S. Degani, G. De Leo, L. Silengo, and G. Tarone. 2001. Cross talk between beta(1) and alpha(V) integrins: beta(1) affects beta(3) mRNA stability. *Mol Biol Cell* 12 (10):3126-3138.
- Reuther, J. Y., and A. S. Baldwin, Jr. 1999. Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of IkappaBalpha that functions as a stable inhibitor of NF-kappaB. *J Biol Chem* 274 (29):20664-20670.
- Reyes, C. D., and A. J. Garcia. 2004. Alpha2beta1 integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation. *J Biomed Mater Res A* 69 (4):591-600.
- Riccardi, C., and I. Nicoletti. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1 (3):1458-1461.
- Ringshausen, I., T. Dechow, F. Schneller, K. Weick, M. Oelsner, C. Peschel, and T. Decker. 2004. Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia* 18 (12):1964-1970.
- Ritter, L. M., S. H. Garfield, and U. P. Thorgeirsson. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 257 (2):494-499.
- Rodriguez, J., and Y. Lazebnik. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13 (24):3179-3184.
- Roepke, M., A. Diestel, K. Bajbouj, D. Walluscheck, P. Schonfeld, A. Roessner, R. Schneider-Stock, and H. Gali-Muhtasib. 2007. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* 6 (2):160-169.
- Romashkova, J. A., and S. S. Makarov. 1999. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401 (6748):86-90.

- Ronziere, M. C., E. Aubert-Foucher, J. Gouttenoire, J. Bernaud, D. Herbage, and F. Mallein-Gerin. 2005. Integrin $\alpha 1 \beta 1$ mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1746 (1):55-64.
- Ross, F. P., J. Chappel, J. I. Alvarez, D. Sander, W. T. Butler, M. C. Farach-Carson, K. A. Mintz, P. G. Robey, S. L. Teitelbaum, and D. A. Cheresch. 1993. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha v \beta 3$ potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 268 (13):9901-9907.
- Saelman, E. U., P. J. Keely, and S. A. Santoro. 1995. Loss of MDCK cell $\alpha 2 \beta 1$ integrin expression results in reduced cyst formation, failure of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching morphogenesis, and increased apoptosis. *J Cell Sci* 108 (Pt 11):3531-3540.
- Sanceau, J., D. D. Boyd, M. Seiki, and B. Bauvois. 2002. Interferons inhibit tumor necrosis factor- α -mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF- κ B. *J Biol Chem* 277 (38):35766-35775.
- Savill, J., and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407 (6805):784-788.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17 (6):1675-1687.
- Scatena, M., M. Almeida, M. L. Chaisson, N. Fausto, R. F. Nicosia, and C. M. Giachelli. 1998. NF- κ B mediates $\alpha v \beta 3$ integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 141 (4):1083-1093.
- Schepetkin, I. 1997. Osteoclastic bone resorption: normal and pathological. *Ann N Y Acad Sci* 832:170-193.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter, and P. van der Geer. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372 (6508):786-791.
- Schlaepfer, D. D., and T. Hunter. 1997. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem* 272 (20):13189-13195.
- Schmeiser, K., and R. J. Grand. 1999. The fate of E- and P-cadherin during the early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* 6 (4):377-386.
- Schoppet, M., K. T. Preissner, and L. C. Hofbauer. 2002. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (4):549-553.
- Schrohl, A. S., M. E. Meijer-van Gelder, M. N. Holten-Andersen, I. J. Christensen, M. P. Look, H. T. Mouridsen, N. Brunner, and J. A. Foekens. 2006. Primary tumor levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 12 (23):7054-7058.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun, and M. Karin. 2001. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293 (5534):1495-1499.

- Seo, D. W., S. H. Kim, S. H. Eom, H. J. Yoon, Y. R. Cho, P. H. Kim, Y. K. Kim, J. W. Han, T. Diaz, B. Y. Wei, and W. G. Stetler-Stevenson. 2008. TIMP-2 disrupts FGF-2-induced downstream signaling pathways. *Microvasc Res* 76 (3):145-151.
- Seo, D. W., H. Li, L. Guedez, P. T. Wingfield, T. Diaz, R. Salloum, B. Y. Wei, and W. G. Stetler-Stevenson. 2003. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 114 (2):171-180.
- Shimaoka, M., and T. A. Springer. 2003. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* 2 (9):703-716.
- Shu, H. B., D. R. Halpin, and D. V. Goeddel. 1997. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6 (6):751-763.
- Silverio-Ruiz, K. G., A. E. Martinez, G. P. Garlet, C. F. Barbosa, J. S. Silva, R. M. Cicarelli, S. R. Valentini, R. S. Abi-Rached, and C. R. Junior. 2007. Opposite effects of bFGF and TGF-beta on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine* 39 (2):130-137.
- Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76 (6):959-962.
- Smith, M. R., H. Kung, S. K. Durum, N. H. Colburn, and Y. Sun. 1997. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 9 (10):770-780.
- Sobue, T., Y. Hakeda, Y. Kobayashi, H. Hayakawa, K. Yamashita, T. Aoki, M. Kumegawa, T. Noguchi, and T. Hayakawa. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 16 (12):2205-2214.
- Soldi, R., S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone, and F. Bussolino. 1999. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo J* 18 (4):882-892.
- Sonoda, Y., Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S. K. Hanks, and T. Kasahara. 2000. Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem* 275 (21):16309-16315.
- Span, P. N., R. L. Lindberg, P. Manders, V. C. Tjan-Heijnen, J. J. Heuvel, L. V. Beex, and C. G. Sweep. 2004. Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol* 202 (4):395-402.
- Spinella-Jaegle, S., S. Roman-Roman, C. Faucheu, F. W. Dunn, S. Kawai, S. Gallea, V. Stiot, A. M. Blanchet, B. Courtois, R. Baron, and G. Rawadi. 2001. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 29 (4):323-330.
- Springer, T. A. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1):65-72.
- Spurr, N. K., P. N. Goodfellow, and A. J. Docherty. 1987. Chromosomal assignment of the gene encoding the human tissue inhibitor of metalloproteinases to Xp11.1-p11.4. *Ann Hum Genet* 51 (Pt 3):189-194.
- Stein, G. S., J. B. Lian, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, M. Montecino, A. Javed, S. K. Zaidi, D. W. Young, J. Y. Choi, and S. M. Pockwinse. 2004. Runx2 control of

- organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23 (24):4315-4329.
- Stennicke, H. R., and G. S. Salvesen. 1998. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387 (1-2):17-31.
- Stromblad, S., J. C. Becker, M. Yebra, P. C. Brooks, and D. A. Cheresh. 1996. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin α V β 3 during angiogenesis. *J Clin Invest* 98 (2):426-433.
- Suarez-Cuervo, C., M. A. Merrell, L. Watson, K. W. Harris, E. L. Rosenthal, H. K. Vaananen, and K. S. Selander. 2004. Breast cancer cells with inhibition of p38 α have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis* 21 (6):525-533.
- Takayanagi, H., K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, T. Yokochi, H. Oda, K. Tanaka, K. Nakamura, and T. Taniguchi. 2000. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 408 (6812):600-605.
- Takigawa, M., Y. Nishida, F. Suzuki, J. Kishi, K. Yamashita, and T. Hayakawa. 1990. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem Biophys Res Commun* 171 (3):1264-1271.
- Tamm, I., Y. Wang, E. Sausville, D. A. Scudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf, and J. C. Reed. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58 (23):5315-5320.
- Tamura, Y., Y. Takeuchi, M. Suzawa, S. Fukumoto, M. Kato, K. Miyazono, and T. Fujita. 2001. Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein--Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 16 (10):1772-1779.
- Tang, C. H., Y. C. Chiu, C. F. Huang, Y. W. Chen, and P. C. Chen. 2009. Arsenic induces cell apoptosis in cultured osteoblasts through endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 241 (2):173-181.
- Tang, G., Y. Minemoto, B. Dibling, N. H. Purcell, Z. Li, M. Karin, and A. Lin. 2001. Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature* 414 (6861):313-317.
- Taraboletti, G., A. Garofalo, D. Belotti, T. Drudis, P. Borsotti, E. Scanziani, P. D. Brown, and R. Giavazzi. 1995. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 87 (4):293-298.
- Taube, M. E., X. W. Liu, R. Fridman, and H. R. Kim. 2006. TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein. *Oncogene* 25 (21):3041-3048.
- Tergaonkar, V., M. Pando, O. Vafa, G. Wahl, and I. Verma. 2002. p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1 (5):493-503.
- Thornberry, N. A., and S. M. Molineaux. 1995. Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci* 4 (1):3-12.
- Thornton, T. M., and M. Rincon. 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5 (1):44-51.

- Thorpe, G. H., L. J. Kricka, S. B. Moseley, and T. P. Whitehead. 1985. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 31 (8):1335-1341.
- Tijsterman, M., and R. H. Plasterk. 2004. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117 (1):1-3.
- Toker, A., and A. C. Newton. 2000. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103 (2):185-188.
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, N. Martinez, and P. D. Zamore. 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306 (5700):1377-1380.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9):4350-4354.
- Troussard, A. A., C. Tan, T. N. Yoganathan, and S. Dedhar. 1999. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 19 (11):7420-7427.
- Tsuboi, M., A. Kawakami, T. Nakashima, N. Matsuoka, S. Urayama, Y. Kawabe, K. Fujiyama, T. Kiriya, T. Aoyagi, K. Maeda, and K. Eguchi. 1999. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med* 134 (3):222-231.
- Tummalapalli, C. M., B. J. Heath, and S. C. Tyagi. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem* 80 (4):512-521.
- Tuuttila, A., E. Morgunova, U. Bergmann, Y. Lindqvist, K. Maskos, C. Fernandez-Catalan, W. Bode, K. Tryggvason, and G. Schneider. 1998. Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 284 (4):1133-1140.
- Tzinia, A. K., P. V. Kitsiou, A. A. Talamagas, A. Georgopoulos, and E. C. Tsilibary. 2002. Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions. *Exp Cell Res* 274 (2):169-177.
- Uchida, M., M. Shima, T. Shimoaka, A. Fujieda, K. Obara, H. Suzuki, Y. Nagai, T. Ikeda, H. Yamato, and H. Kawaguchi. 2000. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 185 (2):207-214.
- Valente, P., G. Fassina, A. Melchiori, L. Masiello, M. Cilli, A. Vacca, M. Onisto, L. Santi, W. G. Stetler-Stevenson, and A. Albini. 1998. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 75 (2):246-253.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305 (3):285-298.
- van Horssen, R., T. L. Ten Hagen, and A. M. Eggermont. 2006. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11 (4):397-408.
- Varfolomeev, E. E., and A. Ashkenazi. 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 116 (4):491-497.

- Ventura, J. J., P. Cogswell, R. A. Flavell, A. S. Baldwin, Jr., and R. J. Davis. 2004. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev* 18 (23):2905-2915.
- Ventura, J. J., A. Hubner, C. Zhang, R. A. Flavell, K. M. Shokat, and R. J. Davis. 2006. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 21 (5):701-710.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102 (1):43-53.
- Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. N. Kolesnick. 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380 (6569):75-79.
- Verrecchia, F., M. Pessah, A. Atfi, and A. Mauviel. 2000. Tumor necrosis factor- α inhibits transforming growth factor- β /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 275 (39):30226-30231.
- Viglietto, G., M. L. Motti, P. Bruni, R. M. Melillo, A. D'Alessio, D. Califano, F. Vinci, G. Chiappetta, P. Tschlis, A. Bellacosa, A. Fusco, and M. Santoro. 2002. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8 (10):1136-1144.
- von Schlippe, M., J. F. Marshall, P. Perry, M. Stone, A. J. Zhu, and I. R. Hart. 2000. Functional interaction between E-cadherin and α v-containing integrins in carcinoma cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):425-437.
- Wang, C. Y., D. C. Guttridge, M. W. Mayo, and A. S. Baldwin, Jr. 1999a. NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19 (9):5923-5929.
- Wang, J. M., J. R. Chao, W. Chen, M. L. Kuo, J. J. Yen, and H. F. Yang-Yen. 1999b. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 19 (9):6195-6206.
- Wang, K. K. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23 (1):20-26.
- Wang, L., F. Du, and X. Wang. 2008. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133 (4):693-703.
- Wang, L., G. Zhao, R. Olivares-Navarrete, B. F. Bell, M. Wieland, D. L. Cochran, Z. Schwartz, and B. D. Boyan. 2006. Integrin β 1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Biomaterials* 27 (20):3716-3725.
- Wang, Q. P., H. Xie, L. Q. Yuan, X. H. Luo, H. Li, D. Wang, P. Meng, and E. Y. Liao. 2009a. Effect of progesterone on apoptosis of murine MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Amino Acids* 36 (1):57-63.
- Wang, T., J. H. Lv, X. F. Zhang, C. J. Li, X. Han, and Y. J. Sun. 2009b. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects MCF-7 breast cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis by decreasing the stability of cyclin B1. *Int J Cancer*.
- Wang, X., J. L. Martindale, and N. J. Holbrook. 2000a. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275 (50):39435-39443.

- Wang, Z., R. Juttermann, and P. D. Soloway. 2000b. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 275 (34):26411-26415.
- Wary, K. K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F. G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94 (5):625-634.
- Weise, S., S. Kralisch, G. Sommer, U. Lossner, M. Bluher, M. Stumvoll, and M. Fasshauer. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA production and protein secretion are induced by interleukin-1 beta in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 198 (1):169-174.
- Welgus, H. G., E. J. Campbell, Z. Bar-Shavit, R. M. Senior, and S. L. Teitelbaum. 1985. Human alveolar macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor. *J Clin Invest* 76 (1):219-224.
- Wen, L. P., J. A. Fahrni, S. Troie, J. L. Guan, K. Orth, and G. D. Rosen. 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 272 (41):26056-26061.
- Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D. L. Boone, A. Ma, E. V. Koonin, and V. M. Dixit. 2004. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430 (7000):694-699.
- Westermarck, J., and V. M. Kahari. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 13 (8):781-792.
- Wilczynska, K. M., S. M. Gopalan, M. Bugno, A. Kasza, B. S. Konik, L. Bryan, S. Wright, I. Griswold-Prenner, and T. Kordula. 2006. A novel mechanism of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 activation by interleukin-1 in primary human astrocytes. *J Biol Chem* 281 (46):34955-34964.
- Williamson, R. A., M. D. Carr, T. A. Frenkiel, J. Feeney, and R. B. Freedman. 1997. Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry* 36 (45):13882-13889.
- Wiren, K. M., A. R. Toombs, A. A. Semirale, and X. Zhang. 2006. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone* 38 (5):637-651.
- Wolf, B. B., and D. R. Green. 1999. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274 (29):20049-20052.
- Woodard, A. S., G. Garcia-Cardena, M. Leong, J. A. Madri, W. C. Sessa, and L. R. Languino. 1998. The synergistic activity of alphavbeta3 integrin and PDGF receptor increases cell migration. *J Cell Sci* 111 (Pt 4):469-478.
- Wu, C., S. Y. Keightley, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, M. Coppolino, S. Goicoechea, J. A. McDonald, and S. Dedhar. 1998. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 273 (1):528-536.
- Xia, H., R. S. Nho, J. Kahm, J. Kleidon, and C. A. Henke. 2004. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* 279 (31):33024-33034.
- Yamaji, S., A. Suzuki, Y. Sugiyama, Y. Koide, M. Yoshida, H. Kanamori, H. Mohri, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo. 2001. A novel integrin-linked kinase-binding

- protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol* 153 (6):1251-1264.
- Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S. T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H. E. Kirk, R. J. Kay, and A. Israel. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93 (7):1231-1240.
- Yamashita, K., M. Suzuki, H. Iwata, T. Koike, M. Hamaguchi, A. Shinagawa, T. Noguchi, and T. Hayakawa. 1996. Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett* 396 (1):103-107.
- Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J. Y. Lang, C. C. Lai, C. J. Chang, W. C. Huang, H. Huang, H. P. Kuo, D. F. Lee, L. Y. Li, H. C. Lien, X. Cheng, K. J. Chang, C. D. Hsiao, F. J. Tsai, C. H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi, and M. C. Hung. 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* 10 (2):138-148.
- Yoneda, T., A. Sasaki, C. Dunstan, P. J. Williams, F. Bauss, Y. A. De Clerck, and G. R. Mundy. 1997. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest* 99 (10):2509-2517.
- Yoshiji, H., S. R. Harris, E. Raso, D. E. Gomez, C. K. Lindsay, M. Shibuya, C. C. Sinha, and U. P. Thorgeirsson. 1998. Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* 75 (1):81-87.
- Yoshikawa, T., H. Cho, A. Tsuburaya, and O. Kobayashi. 2009. Impact of plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 on long-term survival in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 12 (1):31-36.
- Yu, C., Y. Minemoto, J. Zhang, J. Liu, F. Tang, T. N. Bui, J. Xiang, and A. Lin. 2004. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13 (3):329-340.
- Yu, W. H., S. Yu, Q. Meng, K. Brew, and J. F. Woessner, Jr. 2000. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275 (40):31226-31232.
- Yuan, L. Q., Y. S. Liu, X. H. Luo, L. J. Guo, H. Xie, Y. Lu, X. P. Wu, and E. Y. Liao. 2008. Recombinant tissue metalloproteinase inhibitor-3 protein induces apoptosis of murine osteoblast MC3T3-E1. *Amino Acids* 35 (1):123-127.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, and M. Karin. 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91 (2):243-252.
- Zhang, Z., K. Vuori, J. C. Reed, and E. Ruoslahti. 1995. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (13):6161-6165.
- Zhao, W. Q., H. Li, K. Yamashita, X. K. Guo, T. Hoshino, S. Yoshida, T. Shinya, and T. Hayakawa. 1998. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 111 (Pt 9):1147-1153.

- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee, and M. C. Hung. 2001. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3 (3):245-252.
- Zhou, M., Y. Zhang, J. A. Ardans, and L. M. Wahl. 2003. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem* 278 (46):45406-45413.
- Zhou, X., F. R. Murphy, N. Gehdu, J. Zhang, J. P. Iredale, and R. C. Benyon. 2004. Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 279 (23):23996-24006.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, and D. R. Green. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92 (1):57-70.

7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οστίτης ιστός είναι ένας πολύ σημαντικός και δυναμικός ιστός, αφού συνεχώς ανακατασκευάζεται από την ισόρροπη δράση οστεοβλαστών-οστεοκλαστών. Οι οστεοβλάστες, αφού σχηματιστεί το οστό, είτε ενσωματώνονται στην εξωκυττάρια μήτρα, είτε οδηγούνται σε απόπτωση. Επομένως, για τη διατήρηση της οστικής μάζας στον ενήλικα είναι κρίσιμη η ρύθμιση της απόπτωσης των οστεοβλαστών. Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που μεσολαβείται κυρίως από τις κασπάσες και προκαλεί μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στο κύτταρο. Το φαινόμενο της απόπτωσης σηματοδοτείται μέσω του μονοπατιού των μιτοχονδρίων ή μέσω ειδικών υποδοχέων θανάτου που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως οι υποδοχείς του TNF-α.

Ο TNF-α είναι μία κυτταροκίνη που αυξάνεται σε καταστάσεις φλεγμονής και επηρεάζει σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Η αποπτωτική δράση του TNF-α αναστέλλεται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB ή την ενεργοποίηση κινάσων κυτταρικής επιβίωσης, που επιτρέπουν την έκφραση μορίων με αντι-αποπτωτική δράση. Ο TNF-α συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης και μέσω της ενεργοποίησης πρωτεολυτικών ενζύμων (όπως οι μεταλλοπρωτεάσες) και των ειδικών αναστολέων τους, TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Κατά συνέπεια, ρυθμίζουν φυσιολογικές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και η αναδόμηση του ιστού και η απόπτωση, αλλά και παθολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη και η μετάσταση του καρκινικού όγκου, η φλεγμονή, τα αυτοάνοσα νοσήματα, η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση. Πολύ πρόσφατες αναφορές αποδίδουν στους TIMPs εκτός από την αναστολή των MMPs και άλλες ιδιότητες όπως ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ειδικότερα στον TIMP-1 έχει αποδοθεί αντι-αποπτωτική δράση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- α. Η διερεύνηση της επίδρασης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του οστού στην έκφραση των MMPs και TIMPs.
- β. Η διερεύνηση του ρόλου του TIMP-1 στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση.
- γ. Η περαιτέρω μηχανιστική μελέτη της αντι-αποπτωτικής δράσης του TIMP-1 μέσω της αλληλεπίδρασης του με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας.
- δ. Η μελέτη του λειτουργικού ρόλου της αλληλεπίδρασης του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 στην ανθεκτικότητα των κυττάρων έναντι της απόπτωσης με τη χρήση κατάλληλων αναστολέων.

Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των MMPs και TIMPs μετά από επεξεργασία των οστεοβλαστικών κυττάρων MG63 με IFN- γ , TNF- α και TGF- β και διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση-έκκριση του TIMP-1 παρουσία TNF- α , ενός παράγοντα που κυρίως επάγει απόπτωση, η οποία είναι συγκρίσιμη με εκείνη που προκαλεί ο TGF- β , ο οποίος κατά τα γνωστά προστατεύει από την απόπτωση. Παράλληλα, η ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TNF- α δεν προκάλεσε μείωση στο ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων, ούτε ανίχνευση μορφολογικών ή βιοχημικών χαρακτηριστικών απόπτωσης σύμφωνα με τον προσδιορισμό βιοχημικών δεικτών απόπτωσης, όπως η ενεργοποίηση των κασπασών και η έκφραση μορίων της οικογένειας BCL-2. Συνδυάζοντας την αύξηση στην έκφραση του TIMP-1 παρουσία TNF- α , ο οποίος κυρίως σηματοδοτεί απόπτωση, και λαμβάνοντας υπόψη πολύ πρόσφατες μελέτες που αποδίδουν στον TIMP-1 αντι-αποπτωτική δράση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η αντοχή των κυττάρων MG63 στην απόπτωση οφειλόταν εν μέρει στην αυξημένη έκφραση του TIMP-1. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από παρατήρηση μας σύμφωνα με την οποία η επαγόμενη από τον TNF- α αύξηση στα επίπεδα έκκρισης του TIMP-1 ελέγχεται εν μέρει από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB. Αυτό διαπιστώθηκε από τη διαφοροποίηση της έκφρασης του TIMP-1 παρουσία PDTC, ενός αναστολέα της ενεργοποίησης του NF-KB. Εξάλλου, η ενεργοποίηση του NF-KB παρουσία TNF- α πιστοποιήθηκε από τη μετατόπιση της p65 υπομονάδας από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με ανάλυση των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων και μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της. Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-KB, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων με αντι-αποπτωτική δράση, συνδέεται με την ενεργοποίηση γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία περιλαμβάνουν την AKT/PKB, που είναι

κομβική κινάση κυτταρικής επιβίωσης και τις MAPKs p38 και JNKs, που ρυθμίζουν την απόπτωση κυρίως σε συνθήκες στρες.

Επειδή η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1 παρουσία του TNF-α σχετίστηκε με προστασία από την απόπτωση, μελετήσαμε την επίδραση του TNF-α σε έντονα αποπτωτικές συνθήκες, προεπώζοντας τα κύτταρα με τον αναστολέα της πρωτεϊνσύνθεσης CHX πριν την επεξεργασία τους με τον TNF-α. Στις συνθήκες αυτές παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού της βιωσιμότητας των κυττάρων η οποία είχε χαρακτηριστικά απόπτωσης, όπως διαπιστώθηκε με μορφολογική εξέταση των κυττάρων, προσδιορισμό των θραυσμάτων DNA με κυτταρομετρία ροής και προσδιορισμό γνωστών βιοχημικών δεικτών απόπτωσης (ενεργοποίηση κασπάσης-3, πρωτεόλυση του υποστρώματός της PARP, μείωση στα επίπεδα έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL-X_L). Εξάλλου, το αποπτωτικό φαινόμενο συνδυάστηκε με παράλληλη δραματική μείωση των επιπέδων του TIMP-1. Κατά συνέπεια, διερευνήθηκε περισσότερο ο ρόλος του TIMP-1 στην προστασία των κυττάρων MG63 από την απόπτωση. Για το λόγο αυτό αποσιωπήθηκε το γονίδιο του TIMP-1 με την τεχνική siRNA με αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1 στα παραπάνω κύτταρα, η οποία ελάχιστα επηρεάστηκε από την ανάπτυξη τους παρουσία TNF-α. Σε αυτά τα κύτταρα διαπιστώθηκε μείωση της βιωσιμότητας και επαγωγή της απόπτωσης με βάση το ποσοστό πρωτεόλυσης του PARP και τα επίπεδα έκφρασης του BCL-X_L. Παράλληλα, κατά τη χορήγηση ανασυνδυασμένου ανθρώπινου TIMP-1 εξωγενώς, παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού της απόπτωσης και αύξηση του ποσοστού της βιωσιμότητας των κυττάρων MG63 που είχαν επεξεργαστεί με τους παράγοντες TNF-α+CHX.

Δεδομένης της συσχέτισης μεταξύ της αυξημένης έκφρασης του TIMP-1 και της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία του TNF-α, διερευνήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση μηχανισμών κυτταρικής επιβίωσης μέσω υποδοχέων κυτταρικής προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες. Η περαιτέρω μελέτη επικεντρώθηκε στις ιντεγκρίνες β1 και ανβ3 για τις οποίες έχει αναφερθεί ότι προστατεύουν τα κύτταρα από την επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση. Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης της β1 με παράλληλη αύξηση της ανβ3 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63 που είχαν αναπτυχθεί παρουσία TNF-α. Σε αποπτωτικές συνθήκες προεπώασης των κυττάρων με CHX και ανάπτυξης παρουσία TNF-α διαπιστώθηκε σημαντική μείωση των β1 και ανβ3 ιντεγκρινών στην

κυτταρική επιφάνεια, ενώ παρουσία CHX δε διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών $\beta 1$ και ανβ3.

Σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφική αναφορά η προστατευτική δράση του TIMP-1 έναντι αποπτωτικών παραγόντων σχετίζεται με την αλληλεπίδραση του με τη $\beta 1$ ιντεγκρινική υπομονάδα στην κυτταρική επιφάνεια και την ενεργοποίηση μονοπατιών επιβίωσης. Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 η οποία επίσης ενέχεται στην επιβίωση των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας και ανοσοκατακρήμνισης, οπότε διαπιστώθηκε συνεντοπισμός του TIMP-1 με την ιντεγκρίνη ανβ3 στην επιφάνεια των κυττάρων MG63. Ο λειτουργικός ρόλος της διασύνδεσης TIMP-1-ανβ3 προσδιορίστηκε με τη χρήση ειδικών αναστολέων των ιντεγκρινών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η εχιστατίνη (αναστολέας των ιντεγκρινών με συγγένεια για την ανβ3) και το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανβ3, LM609. Με προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων και του ποσοστού της απόπτωσης με βάση τα επίπεδα πρωτεόλυσης του PARP, διαπιστώθηκε μειωμένη ικανότητα προστασίας των κυττάρων από την απόπτωση παρουσία TIMP-1 σε συνθήκες προεπάσης των κυττάρων με εχιστατίνη. Αντίθετα, το μονοκλωνικό αντίσωμα LM609 δε δρα παρεμποδιστικά στην αλληλεπίδραση και επάγει αυξημένη έκφραση-έκκριση του TIMP-1, με αποτέλεσμα να ενισχύεται περαιτέρω η προστατευτική του δράση.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ανθεκτικότητα των κυττάρων MG63 έναντι της απόπτωσης από τον TNF- α , με παράλληλη αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TIMP-1 και ενεργοποίηση του NF-KB και των κινασών AKT/PKB, p38 και JNKs. Η ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης σχετίζεται με την προστατευτική δράση του TIMP-1, όπως διαπιστώθηκε σε συνθήκες αποσιώπησης του γονιδίου του TIMP-1 ή/και χορήγησης εξωγενώς ανασυνδυασμένου TIMP-1. Επίσης, συνδέεται με την πρόσδεση του TIMP-1 στην ιντεγκρίνη ανβ3 και την πιθανή ενεργοποίηση σηματοδοτικού μονοπατιού επιβίωσης.

8 SUMMARY

Bone is an important and dynamic tissue that is being remodeled continuously because of the balanced activity between osteoblasts and osteoclasts. After the process of generation of new bone, osteoblasts are embedded in extracellular matrix or die by apoptosis. Apoptosis is the programmed cell death that is mainly executed by caspases and is characterized by morphological and biochemical changes in the dying cell. Apoptosis signaling involves activation of the mitochondria or death receptors in the cell surface, including TNF-alpha receptors.

TNF-alpha is an inflammatory cytokine that regulates important cellular functions including apoptosis, cell proliferation and cell differentiation. The apoptotic action of TNF-alpha is prevented by activation of NF-KB transcription factor and activation of cell survival kinases that regulate the expression of anti-apoptotic genes. TNF-alpha regulates apoptosis partly through activation of matrix proteinases including metalloproteinases (MMPs) and their specific inhibitors TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Consequently, they are involved in several physiological processes including cell growth, tissue remodeling and apoptosis and pathological conditions including cancer growth and metastasis, inflammation, autoimmune diseases, osteoarthritis and osteoporosis. According to recent publications, TIMPs regulate several cellular functions including apoptosis and cell proliferation, apart from inhibition of MMPs. Especially, an anti-apoptotic action has been attributed to TIMP-1 in several cell types.

Based on the above observations the aims of the present study were as follows:

- a. Effect of cytokines and growth factors that are secreted in bone microenvironment in the expression of MMPs and TIMPs.
- b. Study of TIMP-1 effect in TNF-alpha-induced apoptosis.
- c. The mechanism of TIMP-1 anti-apoptotic action through its interaction with cell surface receptors.
- d. Study of the functional role of alphavbeta3 integrin receptor interaction with TIMP-1 in resistance to apoptosis using specific inhibitors.

Firstly, we studied the expression levels of MMPs and TIMPs in MG63 cells treated with IFN-gamma, TNF-alpha and TGF-beta and found that TIMP-1 expression levels were up-regulated in the presence of TNF-alpha. Up-regulation of TIMP-1 in the presence of pro-apoptotic TNF-alpha was comparable to up-regulation of TIMP-1 in the presence of anti-apoptotic TGF-beta. Moreover, treatment of MG63 cells with several concentrations of TNF-alpha did not reduce cell viability, nor induced morphological and biochemical features of apoptosis, as caspase activation and alterations in BCL-2 proteins expression. Taking into consideration the increased expression of TIMP-1 in the presence of TNF-alpha and recent reports suggesting an anti-apoptotic effect for TIMP-1 in several cell types, we made the hypothesis that resistance of MG63 cells to apoptosis was partly attributed to increased expression of TIMP-1. Our hypothesis was strengthened by our observation that TNF-alpha-induced up-regulation of TIMP-1 is partly controlled by activation of NF-kappaB transcription factor. To delineate the role of NF-kappaB in up-regulation of TIMP-1 expression levels, we used PDTC, an inhibitor of NF-kappaB activation, and observed reduced up-regulation of TIMP-1 in the presence of TNF-alpha. TNF-alpha-induced NF-kappaB activation was verified by p65 translocation from the cytoplasm to the nucleus and is correlated with transcription activation of several anti-apoptotic genes as well as activation of cell survival signalling pathways, including activation of AKT/PKB kinase and both stress activated MAPKs, p38 and JNKs.

To further document the anti-apoptotic role of newly synthesized TIMP-1 in MG63 cells, we studied the effect of TNF-alpha in MG63 cells sensitized to apoptosis. Treatment of MG63 cells with CHX, a protein synthesis inhibitor, prior to TNF-alpha addition, reduced cell viability and sensitized cells to apoptosis, as indicated by microscopic examination, determination of DNA fragmentation and detection of other biochemical markers of apoptosis (caspase-3 activation, proteolysis of caspase substrate PARP, reduction of BCL-X_L expression levels). In apoptotic conditions, TIMP-1 expression levels were dramatically reduced. To further investigate the protective role of TIMP-1 in MG63 cells, we have silenced the expression of TIMP-1 using siRNA. TIMP-1 expression levels were dramatically reduced in the above-mentioned cells, even in the presence of TNF- α . Upon TIMP-1 silencing, we observed reduced cell viability and sensitization to apoptosis, as indicated by PARP cleavage and BCL-X_L expression levels. Moreover, exogenously

added human recombinant TIMP-1 increased cell viability and reduced the extent of apoptosis in MG63 treated with CHX prior to TNF-alpha addition.

Knowing that resistance of MG63 to TNF-alpha is partly attributed to increased TIMP-1 expression levels, we studied the activation of cell survival signalling pathways that are mediated by cell surface adhesion receptors, integrins. In particular, we focused at $\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 3$ integrins, since it has been reported that they exert a protective role against TNF-alpha-induced apoptosis. FACS analysis revealed reduced expression levels of $\beta 1$ integrin subunit and increased expression levels of $\alpha \nu \beta 3$ integrin in the cell surface of MG63 cells treated with TNF-alpha. Cell surface expression levels of both $\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 3$ integrins were reduced in MG63 cells pre-treated with CHX prior to TNF-alpha, whereas there was no statistical significant difference in cell surface expression levels of MG63 cells treated with CHX alone.

According to previous reports the protective role of TIMP-1 against apoptotic stimuli involves TIMP-1 interaction with $\beta 1$ integrin subunit at the cell surface and activation of cell survival pathways. Next, we attempted to detect TIMP-1 interaction with $\alpha \nu \beta 3$ integrin, which also has an anti-apoptotic effect. Confocal microscopy and immunoprecipitation experiments revealed colocalization of TIMP-1 with $\alpha \nu \beta 3$ integrin in the cell surface of MG63 cells. To further explore the functional role of TIMP-1 interaction with $\alpha \nu \beta 3$ integrin, we used specific integrin inhibitors. In particular, we used echistatin (integrin inhibitor with high affinity for $\alpha \nu \beta 3$ integrin) and the specific monoclonal antibody against $\alpha \nu \beta 3$ integrin, LM609. Our results showed reduced protection by TIMP-1 in MG63 cells pretreated with echistatin, as indicated by estimation of cell viability and PARP cleavage. Contrarily, LM609 monoclonal antibody - without disrupting TIMP-1 interaction with $\alpha \nu \beta 3$ integrin - causes increased expression-secretion of TIMP-1 and increases its protective effect.

In conclusion, our results suggest that MG63 osteosarcoma cells are resistant against TNF-alpha-induced apoptosis with concomitant increased expression of TIMP-1 and activation of NF-kappaB transcription factor and AKT/PKB, p38 and JNK kinases. Resistance of MG63 cells against apoptosis is correlated with the protective effect of TIMP-1, as indicated by TIMP-1 silencing or addition of exogenous rTIMP-1; furthermore, it involves interaction of TIMP-1 with $\alpha \nu \beta 3$ integrin and possibly activation of cell survival pathways.

9 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

TIMP-1 ASSOCIATION WITH INTEGRINS PROMOTES CELL SURVIVAL BY IMPARTING RESISTANCE TO TNF- α -INDUCED APOPTOSIS IN MG63 OSTEOSARCOMA CELLS

Ioanna Tsagaraki, Effie Tsilibary, and Athina Tzinia

Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos" 15310 Agia Paraskevi, Athens, Greece.
e-mail: atzin@bio.demokritos.gr

Introduction: Cell-matrix interactions initiate survival signals for several cell types. The loss of these interactions and subsequent loss of matrix contact results in anoikis, one form of apoptosis. Anoikis is regulated by cytokines such as TNF- α , a multifunctional cytokine involved in inflammation and other important cellular functions. We investigated the effect of TNF- α on MG63 osteosarcoma cell apoptosis, as a model to interfere with this process in normal and pathological conditions.

Methods: Apoptosis induced by TNF- α +cycloheximide (CHX), was determined with nuclei DAPI staining, activation of effector caspase-3, proteolysis of its substrate PARP and expression levels of the Bcl-2 family of proteins.

Results: MG63 were resistant to TNF- α -induced apoptosis unless they were pre-treated with CHX. Under these conditions the expression levels of TIMP-1, β_1 and $\alpha_v\beta_3$ integrins were reduced. MG63 cells treated with TNF- α only were resistant to apoptosis. In fact treatment of MG63 cells with TNF- α resulted in activation of the cell survival Akt/PKB pathway and increased levels of TIMP-1 and $\alpha_v\beta_3$ integrin. This observation led us to suggest that TNF- α -induced upregulation of TIMP-1 facilitates interactions between TIMP-1 and cell surface integrins and protects MG63 from TNF- α -induced apoptosis. Our results indicate that TIMP-1 interacts with β_1 and $\alpha_v\beta_3$ integrins; down-regulation of TIMP-1 expression by siRNA resulted in increased proteolysis of PARP and reduced Bcl-x_L expression.

Conclusions: Our data suggest that resistance to TNF- α -induced apoptosis correlated with increased expression of TIMP-1 which might protect osteosarcoma cells from anoikis through interaction with cell surface integrins and potentiation of the Akt-mediated survival pathway.

TIMP-1 interaction with $\alpha v\beta 3$ integrin confers resistance to human osteosarcoma cell line MG-63 against TNF- α -induced apoptosis

Ioanna Tsagaraki · Effie C. Tsilibary · Athina K. Tzinia

Received: 29 April 2010 / Accepted: 21 July 2010 / Published online: 28 August 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a pleiotropic cytokine affecting diverse cellular responses. TNF- α is cytotoxic in many systems, but it can also act as an anti-apoptotic signal to promote cell survival pathways activated through integrins and extracellular matrix components. This is particularly evident in cancer cells. To unravel the basis of resistance to TNF- α -induced apoptosis, human osteosarcoma MG-63 cell line was used. Our data showed that resistance to apoptosis was accompanied by high levels of TIMP-1 expression in part mediated by NF- κ B activation, whereas under apoptotic conditions, in the presence of cycloheximide (CHX), TIMP-1 and $\alpha v\beta 3$ integrin protein levels were significantly reduced. Silencing TIMP-1 using siRNA led to increased apoptosis following treatment with TNF- α , whereas exogenously-added recombinant TIMP-1 reduced the extent of apoptosis. Immunoprecipitation and confocal microscopy experiments demonstrated that TIMP-1 interacted with $\alpha v\beta 3$ integrins. The biological role of this interaction was revealed by the use of echistatin, an antagonist of $\alpha v\beta 3$ integrin. In the presence of echistatin, decreased protection against apoptosis by recombinant TIMP-1 was observed.

Keywords Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) · Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) · Integrins · Osteosarcoma cells · Extracellular matrix (ECM)

This research was funded by NCSR Demokritos, the General Secretariat for Research & Development (grant No 2005/ΣΕ01330081) and funds by BIOTREK, TRIAS and HALYPS companies.

I. Tsagaraki · E. C. Tsilibary · A. K. Tzinia (✉)
Institute of Biology, National Center for Scientific Research “Demokritos”,
15310 Agia Paraskevi,
Athens, Greece
e-mail: atzin@bio.demokritos.gr

Introduction

Osteosarcoma is a malignant tumor of connective tissue origin, in which osteosarcoma cells develop from genetic events that mediate immortalization. With improvement of chemotherapy protocols and surgical techniques, cure rates have increased to 60–80% in patients with localized disease. However, major problems associated with chemotherapy still remain, particularly acquisition of drug-resistant phenotypes and systemic toxicity. Thus, there is a pressing need to develop alternative approaches to osteosarcoma treatment that include cytotoxic factors secreted at the site of tumor growth (Sun et al. 2007).

In the case of bone cell-derived tumors, tumor cells in the bone microenvironment initiate an inflammatory response that leads to recruitment of activated osteoclasts followed by bone resorption. This process is a prerequisite for efficient establishment and growth of bone metastases (Yoneda and Hiraga 2005). TNF- α is an inflammatory cytokine which plays a key role in bone remodeling in part by promoting the proliferation and differentiation of osteoclast precursor cells and inhibiting the differentiation of osteoblasts (Gilbert et al. 2000). Moreover, TNF- α plays a major role in several cellular processes including apoptosis (Tsuboi et al. 1999). TNF- α induces apoptosis through activation of pro-caspases-8 and -3 (Chua et al. 2002), whereas resistance to apoptosis is mainly mediated by the transcription factor NF- κ B (NF- κ B) (Karin and Lin 2002). Alternatively, recent reports indicate that ligation of TNF- α to its receptors leads to cell survival through activation of cell survival pathways that include integrins (Bieler et al. 2007). Integrins are cell surface receptors that modulate important cellular processes, some of which involve components of the extracellular matrix (ECM), such as

matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors, TIMPs (Karadag and Fisher 2006).

The tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) family consists of four members (TIMP-1, -2, -3, -4) that are involved in several cellular processes apart from inhibition of MMPs' activity. In particular, TIMP-1 has been correlated with inhibition of apoptosis in various cell types through activation of cell survival pathways including PI-3 K and MAPKs (Boulday et al. 2004; Liu et al. 2003), whereas elevated levels of TIMP-1 in cancer patients were reported to predict poor survival and resistance to chemotherapy (Schrohl et al. 2006).

In the present study, we investigated the effect of TIMP-1 in TNF- α -induced apoptosis using MG-63 osteosarcoma cells as a model, in order to eventually contribute to developing means to interfere with this process in pathological conditions.

Materials and methods

Antibodies and reagents Antibodies to $\beta 1$ (clone P5D2), $\alpha v \beta 3$ (LM609) and TIMP-1 were purchased from Chemicon International (Temecula, California, USA) (Jung et al. 2006; Ratnikov et al. 2002; Sahni and Francis 2004; Talamagas et al. 2007). Antibodies to active caspase-3, PARP, Akt/PKB, ph-Akt/PKB (Ser 473), p38, ph-p38 (Thr 180, Tyr182), JNK and ph-JNK (Thr 183, Tyr 185) were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA USA) (Cheong et al. 2003; Fos et al. 2008; Matsumoto et al. 2000). Bcl-x_L monoclonal antibody was purchased from (Santa Cruz, CA, USA) (Cheong et al. 2003). All antibodies were used according to manufacturers' instructions and previous publications. Anti- β -tubulin as well as 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), echistatin, cycloheximide (CHX) and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) were purchased from Sigma (St. Luis, MO, USA). Peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Amersham (Uppsala, Sweden), Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse and Alexa Fluor 568 conjugated anti-rabbit antibodies were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Protein-A agarose beads were from Upstate (Temecula, CA, USA). Human recombinant TNF- α was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and human recombinant TIMP-1 from Calbiochem (Darmstadt, Germany). To silence TIMP-1 expression we used HP GenomeWide siRNA kit from Qiagen.

Cell culture and treatment MG-63 human osteosarcoma cells (CRL-1427; ATCC, Rockville, MD, USA) were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and antibiotics (all from Biochrom Seromed, Berlin, Germany). Cells were main-

tained at 37°C and 5% CO₂. Prior to TNF- α addition, cells were starved overnight in culture medium lacking FCS. To sensitize cells, 5 μ g/ml of CHX (an inhibitor of protein synthesis) was added 1 h prior to addition of TNF- α .

Immunoblotting and zymography Confluent cells were lysed in lysis buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaF, 1 mM Na₂VO₄, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100, cocktail of protease inhibitors) for 60 min on ice. Protein concentration was determined by the Bradford method (Pierce).

Equal amounts of total cell lysates or serum-free conditioned media were analyzed on 10 or 12% SDS-PAGE gels under reducing conditions as indicated in the figure legends. The volume of conditioned medium loaded per lane was adjusted according to the cell number obtained at harvest. The resolved proteins were subsequently transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham). Blots were saturated for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk in TRIS-buffered saline, 0.1% Tween-20 and incubated overnight at 4°C with the appropriate dilutions of antibodies, in the same buffer without Tween-20. Incubations with peroxidase-conjugated secondary antibodies and detection of peroxidase activity were carried out as described in the ECL-blotting detection system (Amersham). Images of western blots were analyzed using image-processing software (Bioprofil Vilber Loumart). For gelatin zymography, aliquots of conditioned media were subjected to SDS-PAGE under non-reducing conditions on 10 % polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin as previously described (Tzinia et al. 2002).

Immunoprecipitation For immunoprecipitation experiments, 500 μ l of serum-free culture conditioned media were incubated with protein-A agarose beads and 2 μ g of either anti-TIMP-1 antibody or anti-rabbit IgG, as a negative control. TIMP-1 immune complexes were formed overnight at 4°C. Confluent cells were solubilized in cold TNE (25 mM TRIS-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton x-100, cocktail of protease inhibitors) at 4°C for 60 min. The total cell lysates were pre-cleared with protein-A agarose beads at 4°C for 60 min and incubated with the immune complexes for 120 min at 4°C. Protein-A bound proteins were eluted with 2 $\times$ sample buffer, analyzed on 10% SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotted with anti- $\alpha v \beta 3$ antibody. Detection of $\alpha v \beta 3$ integrins was verified by immunoblotting total cell lysates with anti- $\alpha v \beta 3$ monoclonal antibody. For cross-immunoprecipitation, pre-cleared cell lysates were incubated with 2 μ g of either anti- $\alpha v \beta 3$ or anti-mouse IgG antibody overnight at 4°C for immune complexes to be formed. Complexes were incubated with 500 μ l of serum-free culture conditioned media for 2 h at 4°C. Bound and

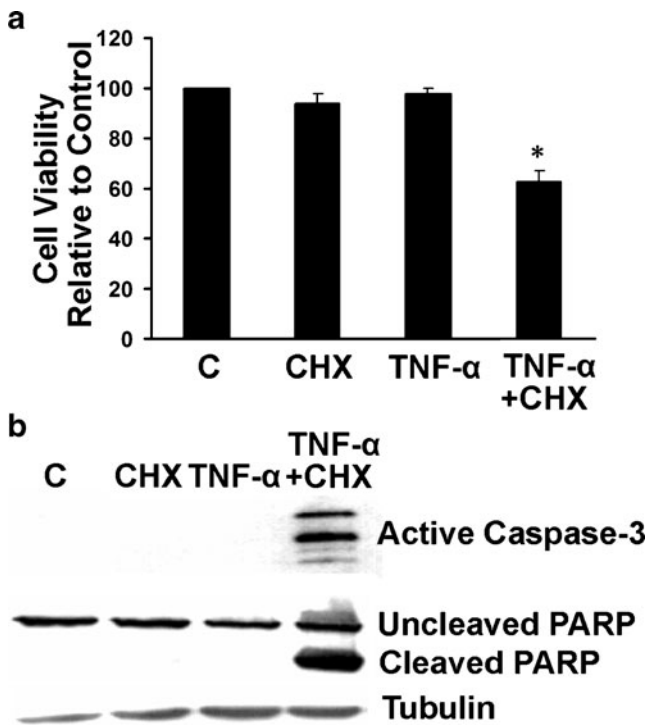


Fig. 1 Induction of apoptosis in MG-63 cells. To induce apoptosis, serum-starved MG-63 cells for 24 h, were sensitized with 5 μ g/ml CHX 1 h prior to TNF- α addition. TNF- α (100 ng/ml) was added and apoptosis was measured by the estimation of cell viability with the MTT assay (**a**). Equal amounts of total lysates from MG-63 cells treated as above were analyzed on 10 % SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotted with antibodies against activated caspase-3 (*upper panel*) and PARP (*lower panel*). To ensure equal loading, membranes were re-probed against tubulin (**b**). Units represent mean $\pm$ SD from three independent experiments. *Differences significant at $p < 0.05$

eluted immune complexes from protein-A agarose beads were analyzed on 10% SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotted with anti-TIMP-1 antibody. Detection of TIMP-1 was performed by immunoblotting culture supernatants with anti-TIMP-1 polyclonal antibody.

TIMP-1 silencing by siRNA Cells were transfected with siRNA targeting the indicated sequence or negative control siRNA using RNAiFect as the transfection reagent. The sequence of TIMP-1 siRNA was designated by Qiagen (5'-TCCCATCTTTCTTCCGGACAA-3'). Transfections were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, MG-63 cells were plated at a density of 2×10^4 cells/12-well plates. After 24 h, cells were transfected with 2 μ g of TIMP-1 siRNA or with a non-targeting siRNA sequence (scramble), as negative control, 12 μ l of RNAiFect and allowed to culture for a 24 h recovery period. Cells were starved and treated with TNF- α as stated above. The conditioned media and cell lysates were collected and stored at -20°C .

MTT assay To measure cell viability, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay was used. Briefly, 5,000 cells/well were seeded in a flat-bottomed 96-well plate and treated as described above. The cells were incubated with MTT solution (5 mg/ml) for 4 h at 37°C and 5 % CO_2 atmosphere. Subsequently, formazan crystalline precipitates were resolubilized in DMSO and absorption was measured at a wavelength of 570 nm in a microtiter plate reader.

Confocal microscopy Cells were cultured on coverslips for 24 h, fixed with 2 % formaldehyde in PBS and incubated overnight at 4°C with 10 μ g/ml polyclonal anti-TIMP-1

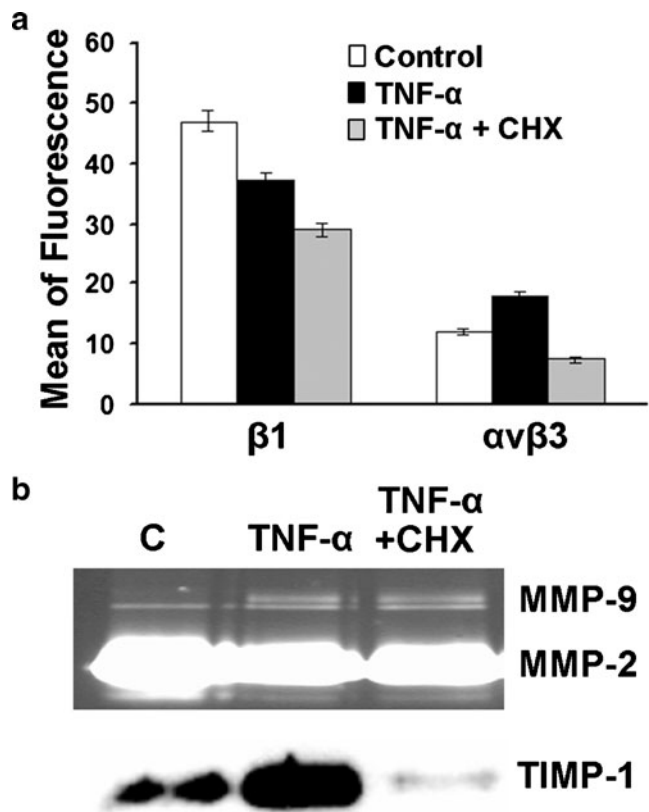


Fig. 2 TNF- α -induced apoptosis correlates with alterations on synthesis of ECM components and integrins. CHX-sensitized or non-sensitized cells were cultured in the presence or absence of TNF- α for 24 h. **a** Distribution of cell surface integrins was determined by Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis using anti- $\beta 1$ and anti- $\alpha v \beta 3$ integrins monoclonal antibodies at saturating concentrations. **b** To detect changes of MMPs secretion levels, aliquots of serum free conditioned media were analyzed on 10 % polyacrylamide gel containing 0.1 % gelatin under non-reducing conditions (*upper panel*). TIMP-1 secretion levels were detected by western blot analysis of serum-free conditioned media. Aliquots of each sample were subjected to 12 % SDS-PAGE under reducing conditions. Electrophoretically transferred proteins were immunoblotted using antibodies against TIMP-1 (*lower panel*). The volume of conditioned medium loaded per lane was adjusted according to the cell number obtained at harvest. Units represent mean $\pm$ SD from three independent experiments. *Differences significant at $p < 0.05$

and monoclonal anti- $\alpha v\beta 3$ antibodies. After extensive washing with PBS, cells were incubated with secondary antibodies, Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit IgG for TIMP-1 and Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG for $\alpha v\beta 3$ integrins for 1 h at 25°C. The nuclei were counterstained with DAPI using VECTA-SHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Coverslips were examined with a Bio-Rad confocal microscope (MRC 1024 ES) equipped with Lasersharp software (BioRad) and a krypton-argon laser with a motor step of 0.5 μm . Images from confocal microscopy were processed with Confocal Assistant.

Flow cytometry To estimate cell surface distribution of integrins, starved cells were treated with TNF- α in the presence or absence of CHX for 24 h. After treatment, surface distribution of integrins was estimated as previously described (Tzinia et al. 2002).

Statistical analysis Mean values were derived from experiments performed in triplicate. These values were compared using the Student's *t* test. Additionally, post-hoc testing, using the Newman-Keuls (SNK) test was used to compare the differences between the selected pairs of means. In all instances, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Sensitization of MG-63 cells to TNF- α -induced apoptosis

Treatment of MG-63 cells with TNF- α alone even at high concentrations (100 ng/ml) did not result in significant extent of cell death as indicated by the MTT assay. However, sensitization of cells by CHX, 1 h prior to TNF- α addition, led to significant cell apoptosis, the most extensive of which was at concentrations of 100 ng/ml of TNF- α (Fig. 1a). Hence, for further experiments 100 ng/ml TNF- α were used. To assess the extent of cell death depending on incubation time, we examined the cells by DAPI staining following 6, 24, and 48 h in culture in the presence of TNF- α . A significantly increased extent of apoptosis was observed after 24 h in culture (data not shown).

Pro-caspases are zymogen forms of cysteine proteases that are activated during the apoptotic process. Caspase activation is an important event during the commitment and execution of programmed cell death, leading to the apoptotic phenotype (Zhivotovsky, 2003). The presence of activated caspase-3 was demonstrated by western blot analysis of total lysates from cells sensitized with CHX which were subsequently treated with TNF- α , whereas in

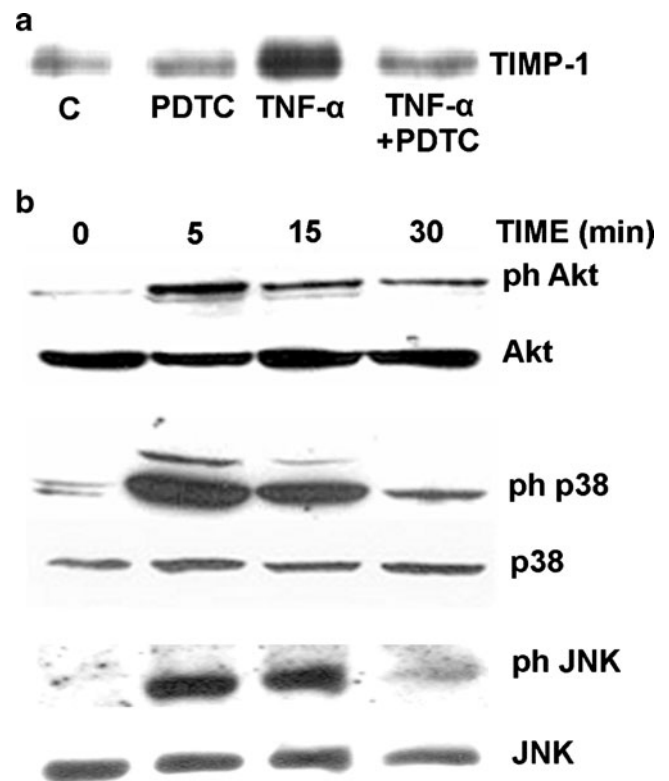


Fig. 3 NF- κ B participates in TIMP-1 up-regulation in the presence of TNF- α . MG-63 cells serum starved overnight were treated with 100 ng/ml TNF- α for 24 h in the presence or absence of 100 μM PDTC. The inhibitor was added 1 h prior to TNF- α addition. **a** Samples of culture supernatants were analyzed on 12 % SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotted with anti-TIMP-1 antibody. The volume of conditioned medium loaded per lane was adjusted according to the cell number obtained at harvest. **b** Activation of Akt, p38 and JNK2 kinases was determined by western blot analysis. Equal amounts of total cell lysates were analysed on 10 % SDS-PAGE under reducing conditions. Electrophoretically transferred proteins were immunoblotted with antibodies against their phosphorylated forms. For normalization of the results the filters were re-probed with antibodies against the non-phosphorylated proteins

non-sensitized cells, activated caspase-3 was not present (Fig. 1b, upper panel). Caspase-3 processing in sensitized cells was detected as early as 6 h after treatment. In addition to the activation of caspase-3, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a caspase-3 substrate, becomes activated in response to DNA damage and is implicated in the repair of DNA strand breaks. Caspase-mediated proteolytic cleavage of its substrate PARP is an early event in the process of apoptosis (Lazebnik et al. 1994). Immunoblotting of processed cell lysates revealed that, in addition to the activation of caspase-3, increased PARP cleavage occurred after the induction of apoptosis (Fig. 1b, lower panel).

Effect of TNF- α on integrins and ECM components

TNF- α has been shown to regulate the expression levels of integrins, MMPs and TIMPs, molecules involved in bone

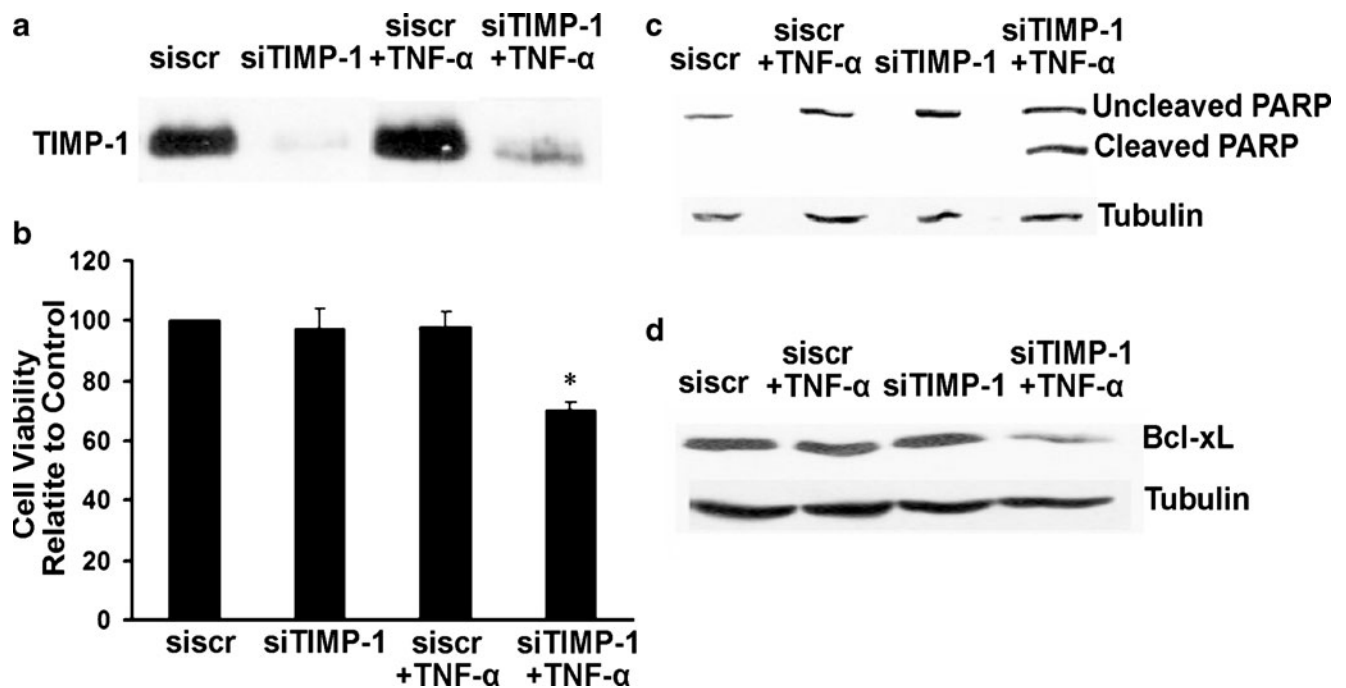


Fig. 4 Effect of TIMP-1 gene silencing on MG-63 cells apoptosis. MG-63 clones in which endogenous TIMP-1 expression was down-regulated by TIMP-1-siRNA sequence were generated. Subsequently, starved cells were treated with 100 ng/ml TNF-α to induce apoptosis. To determine secreted TIMP-1 levels, samples of culture supernatants were analysed on 12% SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotted using anti-TIMP-1 antibody **a**. The volume of conditioned medium loaded per lane was adjusted according to the

cell number obtained at harvest. Under the same experimental conditions cell viability was measured by MTT **b**. Equal amounts of total cell lysates were analyzed on 10 % SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotted with antibodies against PARP **c** and the anti-apoptotic protein Bcl-x_L **d**. To ensure equal loading, membranes were re-probed against tubulin. Units represent mean±SD from three independent experiments. *Differences significant at $p<0.05$

turnover, in various bone-related cell types (Inoue et al. 2000; Uchida et al. 2000). Therefore, fluorescence-activated cell sorting (FACS) was performed in non-permeabilized cell populations to verify alterations in the protein synthesis of cell surface β1 and αvβ3 integrins in the above mentioned conditions, by the use of specific anti-integrin monoclonal antibodies. Flow cytometry experiments indicated that approximately 47 % of control cells produced the β1 integrin subunit, and 12 % produced αvβ3 integrin. Furthermore, treatment of non-sensitized MG-63 cells with TNF-α alone led to a modest decrease of β1 synthesis whereas the production of αvβ3 was increased by 50 %. Under pro-apoptotic conditions (TNF-α/CHX) the cell surface β1 and αvβ3 integrins in MG-63 cells decreased by 38% as revealed by flow cytometry (Fig. 2a). Treatment of cells with CHX alone had no effect on cell surface levels of these integrins (data not shown).

To examine the effect of TNF-α in synthesis of ECM proteins, we performed either zymography or western blot analysis on conditioned culture supernatants under apoptotic and non-apoptotic conditions. There was no significant alteration of MMP-9 or levels of the enzymatic activity of MMP-2 in the presence of TNF-α in both non-sensitized

(non-apoptotic) and sensitized (apoptotic) cells (Fig. 2b, upper panel). On the contrary, non-sensitized cells produced high levels of TIMP-1, whose secretion was abolished following sensitization with CHX (Fig. 2b, lower panel).

TNF-α-induced TIMP-1 up-regulation involves NF-κB activation

NF-κB activation has been reported to be involved in induction of TIMP-1 by proinflammatory cytokines in several cell types (Weise et al. 2008). To examine whether NF-κB activation is involved in the signal transduction pathway that leads to TNF-α-induced up-regulation of TIMP-1, we used a NF-κB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). PDTC was added at a concentration of 100 μM one hour prior to addition of TNF-α. Western blot analysis of conditioned culture supernatants of MG-63 cells, treated with TNF-α in the presence or absence of PDTC indicated that TNF-α-induced up-regulation of TIMP-1 expression was abrogated in the presence of PDTC (Fig. 3a).

TNF-α-induced NF-κB activation also involves the activation of Akt/PKB kinase and/or MAPKs. Treatment

of cells with TNF- α for 0–30 min showed activation of the kinases Akt/PKB, p38 and JNK as early as 5 min following stimulation (Fig. 3b).

These results suggest that PDTC-mediated abrogation of TIMP-1 upregulation in the presence of TNF- α is the result of inhibition of NF- κ B activation.

TIMP-1 participates in resistance of MG-63 cells against TNF- α -induced apoptosis

Previous studies suggested an anti-apoptotic role for TIMP-1 (Boulday et al. 2004; Guedez et al. 1998). Since treatment of osteosarcoma cells with TNF- α alone resulted in a substantially increased TIMP-1 secretion in the absence of apoptosis, we examined the possibility that TNF- α -induced up-regulation of TIMP-1 protein levels confers resistance of MG-63 cells against apoptosis. To address this we generated MG-63 clones in which endogenous TIMP-1 expression was down-regulated by TIMP-1 siRNA sequence, as indicated by western blot analysis (Fig. 4a, lane 2). Treatment of the latter cell clones with TNF- α did not result in significant increase of TIMP-1 levels (Fig. 4a, lane 4). In this case, TNF- α caused increased apoptosis as indicated by reduced cell viability (Fig. 4b) and increased PARP cleavage (Fig. 4c). Since the involvement of Bcl-x_L was previously reported to mediate the anti-apoptotic action of TIMP-1 (Guedez et al. 1998), we examined its levels under the above-mentioned conditions. Figure 4d shows that Bcl-x_L protein levels were decreased by approximately 50% when TIMP-1 was silenced, leading to apoptosis after the addition of TNF- α .

To further document the anti-apoptotic effect of TIMP-1 in MG-63 cells, human recombinant TIMP-1 (rTIMP-1) was added exogenously 1 h prior to induction of apoptosis and cell viability was estimated by the MTT assay (Fig. 5a). The addition of exogenous rTIMP-1 at concentration of 800 ng/ml reduced apoptosis which was induced by the combined presence of TNF- α and CHX by approximately 37%. Moreover rTIMP-1 reduced PARP cleavage by approximately 35% and reversed reduction of Bcl-x_L protein levels which was observed in apoptotic conditions (Fig. 5b, c).

TIMP-1 associates with cell surface α v β 3 integrins to confer protection from apoptosis

Both TIMP-1 and integrins β 1 and α v β 3 were previously reported to activate cell survival pathways in several cell types (Bieler et al. 2007; Jung et al. 2006; Liu et al. 2003; Matter and Ruoslahti 2001). In our experiments, treatment of MG-63 cells with TNF- α , resulted in increased secreted levels of TIMP-1 concomitant with resistance of these cells against apoptosis. Under these conditions down-regulation of β 1 integrin and subsequent up-regulation of α v β 3 integrins were observed as indicated in Fig. 2a.

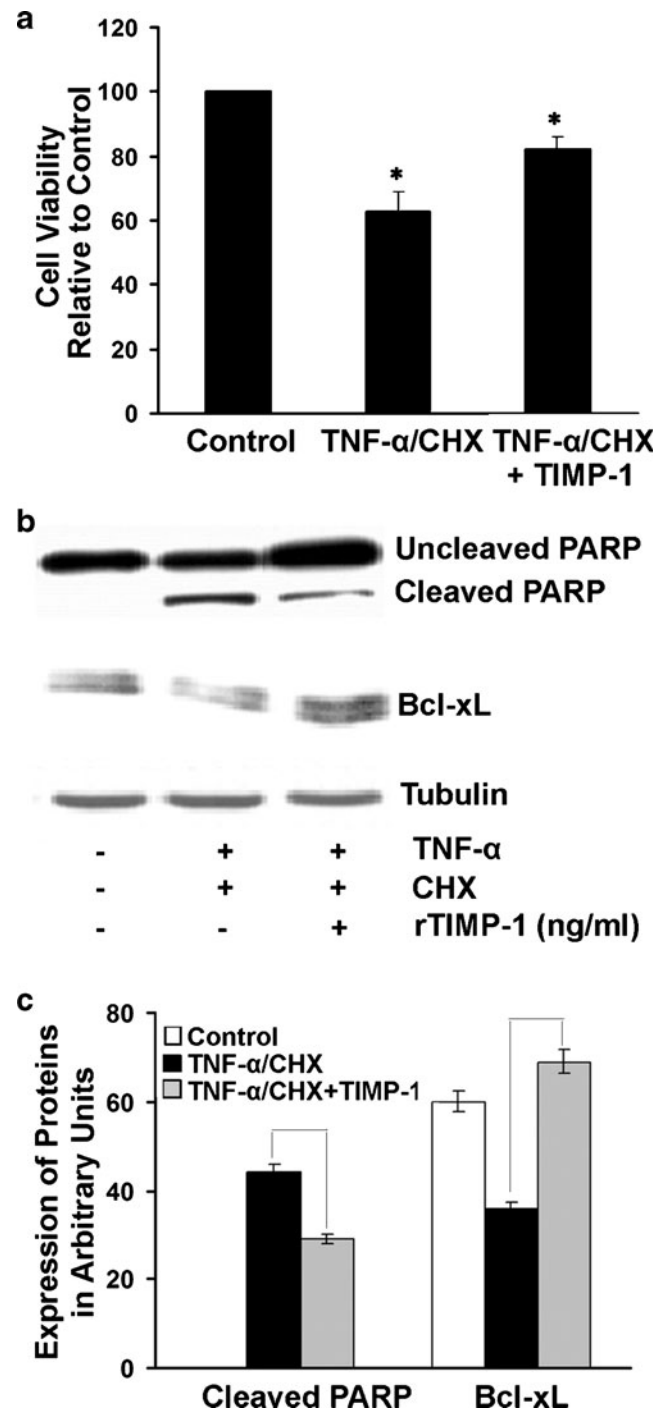


Fig. 5 Treatment of cells with human rTIMP-1 inhibited apoptosis. CHX-sensitized MG-63 cells were treated with exogenously added, human recombinant TIMP-1 (800 ng/ml), 1 h prior to induction of apoptosis with 100 ng/ml TNF- α . **a** Cell viability was estimated by MTT. **b** Equal amounts of total lysates from cells treated as above were analyzed on 10% SDS-PAGE under reducing conditions and subsequently immunoblotted with antibodies against PARP and the anti-apoptotic protein Bcl-x_L. To ensure equal loading, membranes were re-probed against tubulin. **c** PARP and Bcl-x_L protein levels were estimated by scanning densitometry. Units represent mean $\pm$ SD from three independent experiments. *Differences significant at $p < 0.05$

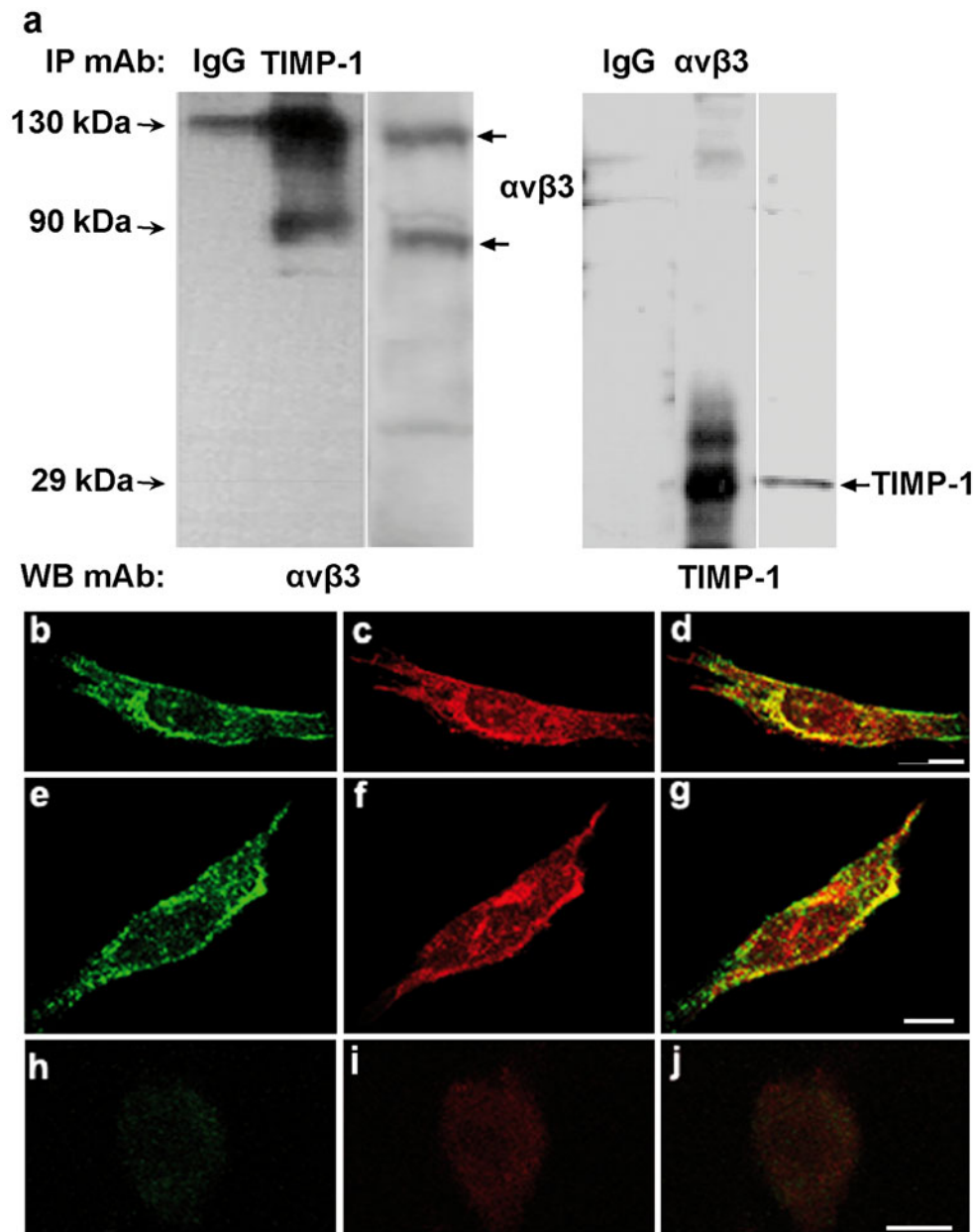


Fig. 6 Integrin $\alpha v\beta 3$ associates with TIMP-1. **a** Anti-TIMP-1 immunoprecipitates of MG-63 supernatants were analyzed on 10 % SDS gels under reducing conditions and immunoblotted with monoclonal antibody against $\alpha v\beta 3$ integrin (left panel, lane 2). In cross-immunoprecipitation, pre-cleared total cell lysates were immunoprecipitated with anti- $\alpha v\beta 3$ monoclonal antibody, analyzed on 10% SDS gels under reducing conditions and immunoblotted with anti-TIMP-1 polyclonal antibody (right panel, lane 5). As a negative control, supernatants or cell lysates were incubated with agarose beads in the presence of non specific immunoglobulins (lanes 1 and 4). Detection of $\alpha v\beta 3$ integrins in total cell lysates and TIMP-1 in culture supernatants was verified by immunoblotting with the appropriate

antibodies (lanes 3 and 6, respectively). **b–j** Intact MG63 cells cultured on coverslips for 24 h were fixed in 2% formaldehyde and subsequently incubated with anti- $\alpha v\beta 3$ monoclonal antibody (**b** and **e**) and anti-TIMP-1 polyclonal antibody (**c** and **f**) at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each. Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG and Alexa Fluor 568 conjugated anti-rabbit antibodies were used for $\alpha v\beta 3$ integrins and TIMP-1 respectively. MG-63 cells were incubated with anti-mouse and anti-rabbit non specific immunoglobulins (**h** and **j**). Coverslips were mounted with VECTASHIELD mounting medium and examined under confocal microscope. Superimposed images are shown in (**d,g** and **j**). Scale bar 15 μm

We have addressed the question whether TIMP-1 interacts with $\alpha v\beta 3$ integrin receptors. As shown in Fig. 6a, anti-TIMP-1 antibody co-immunoprecipitated two protein bands corresponding to $\alpha v\beta 3$ integrins from pre-cleared cell lysates

(Fig. 6a, lane 2). Detection of $\alpha v\beta 3$ integrins was performed by immunoblotting total cell lysates with anti- $\alpha v\beta 3$ monoclonal antibody (Fig. 6a, lane 3). Cross-immunoprecipitation experiments with anti- $\alpha v\beta 3$ co-precipitated a protein band at

29 kDa, corresponding to TIMP-1 from culture supernatants (Fig. 6a, lane 4), as confirmed by western blot analysis of culture supernatants with anti-TIMP-1 polyclonal antibody (Fig. 6a, lane 5). As a negative control immunoprecipitation experiments were repeated with non specific immunoglobulins as described in the methods section (Fig. 6a, lanes 1 and 4).

Using confocal microscopic analysis of non-permeabilized cells, we further examined TIMP-1/ α v β 3 interactions on the cell surface. Immunofluorescent staining of non-permeabilized cells with antibodies against α v β 3 integrins (Fig. 6b and e) and TIMP-1 (Fig. 6c and f), followed by confocal microscopy, demonstrated co-localization of TIMP-1 with α v β 3 integrins at least in part (Fig. 6d and g). Incubation of cells with non specific immunoglobulins showed minimal fluorescence (Fig. 6h–j).

To examine whether interactions of TIMP-1- α v β 3 participate in TIMP-1-mediated cell survival, ligation to α v β 3 integrin was disrupted with echistatin, an inhibitor of α v β 3 integrins (Zhou et al. 2004). The use of 100 nM echistatin resulted in approximately 30% decrease of the anti-apoptotic effect of exogenously administered rTIMP-1, as indicated by the amount of cleaved PARP on immunoblots (Fig. 7a, b, compare lanes 3 and 4). Moreover, in the concomitant presence of echistatin and exogenous rTIMP-1 cell viability by the MTT assay was decreased compared to rTIMP-1 alone (Fig. 7c).

Discussion

Osteosarcoma, a malignant tumor of connective tissue, is usually treated with chemotherapeutic agents. Nevertheless, chemotherapeutic agents display a number of side effects, including cytotoxicity and acquisition of resistance by cancer cells. In order to improve osteosarcoma treatment, new therapeutic approaches should be developed to render osteosarcoma cells susceptible to apoptosis by cytotoxic factors secreted from immune cells at the site of tumor growth (Locklin et al. 2007; Sun et al. 2007).

TNF superfamily members are secreted in the bone microenvironment and play a pivotal role in regulation of several cellular processes including cell differentiation, proliferation and survival. Previous studies have documented that resistance of cancer cells to TNF- α -induced apoptosis involves activation of NF- κ B and synthesis of proteins with anti-apoptotic effects including inhibitors of apoptosis and Bcl-2 family members (Karin and Lin 2002).

In our system, resistance of MG-63 osteosarcoma cells to TNF- α -induced apoptosis was accompanied by increased production of TIMP-1 by 5-fold, whereas addition of CHX, a protein synthesis inhibitor, prior to TNF- α treatment, sensitized MG-63 cells to TNF- α and suppressed synthesis

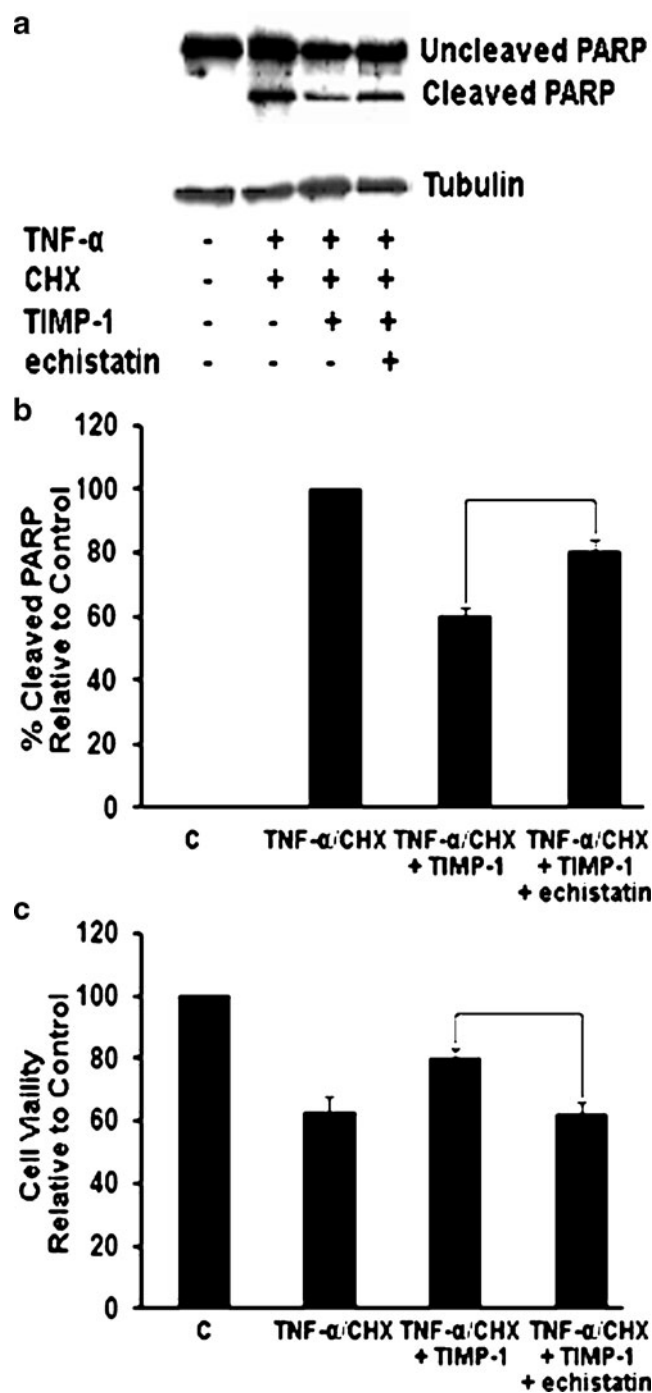


Fig. 7 TIMP-1- α v β 3 interactions are involved in TIMP-1-mediated resistance of MG-63 cells to apoptosis. In order to inhibit TIMP-1- α v β 3 interactions, MG-63 cells which were serum-deprived overnight, were treated with 100 nM echistatin, an integrin antagonist, 30 min prior to induction of apoptosis by TNF- α /CHX. Where it is indicated, 800 ng/ml human rTIMP-1 was added. **a** Equal amounts of lysates from cells treated with echistatin were analyzed on 10% SDS-PAGE under reducing conditions and were subsequently immunoblotted using antibodies against PARP. To ensure equal loading, membranes were re-probed against tubulin. **b** Cleaved and uncleaved PARP levels were estimated by scanning densitometry. **c** Cell viability under the above mentioned conditions was measured by MTT. Bars represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments. *Differences significant at $p < 0.05$

of TIMP-1. Taking into consideration that TIMP-1, apart from inhibiting the activity of metalloproteinases (MMPs), has also been reported to have anti-apoptotic activity in several instances (Boulday et al. 2004; Guedez et al. 1998), we have put forward the hypothesis that newly synthesised TIMP-1 conferred apoptosis resistance to MG-63 cells.

Previous reports suggest that regulation of TIMP-1 expression is controlled by several transcription factors including NF- κ B. Therefore, we used PDTC, an inhibitor of NF- κ B, and we observed that TNF- α -induced TIMP-1 up-regulation was reduced about 80 %, which is consistent with previous studies indicating that proinflammatory cytokines induced TIMP-1 mRNA through NF- κ B activation (Weise et al. 2008).

In addition, TIMP-1 has been reported to confer resistance against apoptosis in several cell lines through pathways that include activation of Akt/PKB and MAPKs (Boulday et al. 2004; Liu et al. 2003). Accordingly, we have observed phosphorylation of Akt/PKB and p38, JNK MAPKs in our system, a result that strengthens our hypothesis.

To further document the anti-apoptotic role of newly synthesized TIMP-1 in MG-63 cells, we have silenced the expression of TIMP-1 using siRNA. Upon TIMP-1 silencing, addition of exogenous TNF- α led MG-63 cells to apoptosis, as indicated by the MTT assay and increased levels of cleaved PARP and decreased levels of the anti-apoptotic protein Bcl-x_L. TIMP-1 protein levels correlated with Bcl-x_L levels in our system, an observation which has also been documented for other cell types (Guedez et al. 1998). Moreover, exogenously-added human recombinant TIMP-1 reduced the extent of apoptosis. These observations are consistent with the hypothesis that components of bone microenvironment regulate the apoptosis of bone cell types.

Previous studies have provided evidence that several of the biological activities of TIMP-1 appeared to be the result of a direct cellular effect mediated by cell surface receptors. For example, TIMP-1 binding to CD63- β 1 complex on the cell surface of MCF10A cells maintained the activated conformation of the β 1 integrin subunit and resulted in activation of cell survival pathways (Jung et al. 2006). Additionally, integrins α 5 β 1 and α v β 3 have been associated with resistance against apoptosis (Bieler et al. 2007; Matter and Ruoslahti 2001). We investigated the effect of TNF- α on protein synthesis of β 1 and α v β 3 integrins in MG-63 cell line. FACS analysis showed that MG-63 cells treated with TNF- α produced reduced levels of β 1 integrin and increased levels of α v β 3 on the cell surface. According to recent reports, cross-talk between integrins occurs in several cell types (Retta et al. 2001). Hence, we hypothesized that the observed increase of α v β 3 receptors on the cell surface might compensate for the decreased levels of β 1, and at the same time exert an anti-apoptotic activity. In previous studies, the anti-apoptotic effect of α v β 3 integrins in the

presence of TNF- α has been suggested to involve ligation to α v β 3 integrin and subsequent activation of Akt/PKB kinase, independently of NF- κ B activation (Bieler et al. 2007). In our system, cross-immunoprecipitation and confocal microscopy analysis revealed an association between α v β 3 integrins and TIMP-1 on the surface of MG-63 cells. This observation suggests that TIMP-1- α v β 3 integrin interactions led to resistance against TNF- α -induced apoptosis.

In conclusion, our results suggest that MG-63 osteosarcoma cells are resistant to TNF- α -induced apoptosis partly due to newly synthesized proteins. TIMP-1 expression is increased via activation of NF- κ B and contributes to resistance to TNF- α -mediated apoptosis through interactions with cell surface integrins, especially α v β 3. These results should eventually contribute to developing means of interfering with protein levels of TIMP-1 and/or its anti-apoptotic activities in several types of bone-derived tumours.

Acknowledgments The authors thank Dr. Marina Sagnou for her expert assistance with confocal microscopy experiments and Drs. Dimitris Kletsas and Harris Pratsinis for their useful discussions.

References

- Bieler G et al (2007) Distinctive role of integrin-mediated adhesion in TNF-induced PKB/Akt and NF-kappaB activation and endothelial cell survival. *Oncogene* 26:5722–5732
- Boulday G et al (2004) Exogenous tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes endothelial cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Ann NY Acad Sci* 1030:28–36
- Cheong JW et al (2003) Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 9:5018–5027
- Chua CC et al (2002) TGF-beta1 inhibits multiple caspases induced by TNF-alpha in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1593:1–8
- Fos C et al (2008) ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 181:1969–1977
- Gilbert L et al (2000) Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 141:3956–3964
- Guedez L et al (1998) In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102:2002–2010
- Inoue M et al (2000) Tumor necrosis factor alpha regulates alpha(v)beta5 integrin expression by osteoclast precursors in vitro and in vivo. *Endocrinology* 141:284–290
- Jung KK et al (2006) Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 25:3934–3942
- Karadag A, Fisher LW (2006) Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to alpha(v)beta3-integrin. *J Bone Miner Res* 21:1627–1636
- Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221–227
- Lazebnik YA et al (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346–347

- Liu XW et al (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 278:40364–40372
- Locklin RM et al (2007) Selective targeting of death receptor 5 circumvents resistance of MG-63 osteosarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 6:3219–3228
- Matsumoto M et al (2000) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem* 275:31155–31161
- Matter ML, Ruoslahti E (2001) A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 276:27757–27763
- Ratnikov BI et al (2002) An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 277:7377–7385
- Retta SF et al (2001) Cross talk between beta(1) and alpha(V) integrins: beta(1) affects beta(3) mRNA stability. *Mol Biol Cell* 12:3126–3138
- Sahni A, Francis CW (2004) Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires alphavbeta3. *Blood* 104:3635–3641
- Schrohl AS et al (2006) Primary tumor levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 12:7054–7058
- Sun J et al (2007) Induction of apoptosis in osteogenic sarcoma cells by combination of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand and chemotherapeutic agents. *Chin Med J (Engl)* 120:400–404
- Talamagas AA et al (2007) Abeta(1–40)-induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPalpha release by association with cell surface APP. *Neurobiol Dis* 28:304–315
- Tsuboi M et al (1999) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med* 134:222–231
- Tzinia AK et al (2002) Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions. *Exp Cell Res* 274:169–177
- Uchida M et al (2000) Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 185:207–214
- Weise S et al (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA production and protein secretion are induced by interleukin-1 beta in 3 T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 198:169–174
- Yoneda T, Hiraga T (2005) Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 328:679–687
- Zhivotovsky B (2003) Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39:25–40
- Zhou X et al (2004) Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 279:23996–24006

Calcitonin induces Fibronectin expression via NF-kappaB activation in MG63 osteosarcoma cells

INTRODUCTION

Calcitonin (CT) is a 32 aminoacid peptide that is produced by C cells of mammalian thyroid. The main physiological role of CT involves regulation of bone remodeling, by inhibition of bone resorption by osteoclasts and regulation of sodium, phosphate and calcium levels (Chambers and Magnus 1982).

CT has been used clinically to treat osteoporosis and humoral hypercalcemia of malignancy (McDermott and Kidd 1987; Zaidi, Moonga et al. 1990). However recent studies indicate that CT plays a major role in several cellular processes including cell survival, cell growth and proliferation in several cell types (Ritchie, Thomas et al. 1997; Thomas and Shah 2005), including osteosarcoma cell lines (Farley, Wergedal et al. 1991). Moreover CT regulates cell invasion and metastasis in several cell lines and is involved in wound healing (Sabbisetti, Chirugupati et al. 2005; Han, Nakamura et al. 2006).

CT mediates its effects through binding to its cell surface receptor, calcitonin receptor (CTR) and subsequent activation of several signaling mechanisms which include Akt/PKB, ERK1/2, Ca^{2+} -PKC, cAMP-PKA and phospholipases C, D and A_2 (Horne, Shyu et al. 1994; Chen, Shyu et al. 1998). In addition, CT mediates its effects partly through regulation of expression of extracellular matrix (ECM) components, such as degradation of type II collagen.

One of the major components of ECM that is highly expressed in the bone is Fibronectin (Fn); Its expression is controlled by a number of transcription factors including NF- κ B and AP-1 (Chen, Khan et al. 2003; Tang, Yang et al. 2007). Fn is a high molecular weight glycoprotein that consists of two nearly identical (250 kDa)