

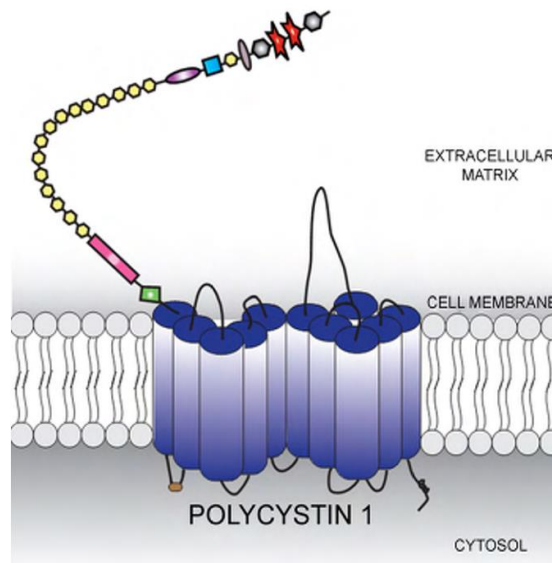


Εθνικό και Καποδιστριακό
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΤΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ- ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ
ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΝΗΣ-1 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΗΧΑΝΟΔΙΕΓΕΡΣΗ



ΗΛΙΑΝΝΑ ΖΩΗ

A.M.: 20130688

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΥΘΥΜΙΑ ΜΠΑΣΔΡΑ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΠΙΠΕΡΗ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πολλά πράγματα σου έρχονται στο μυαλό την στιγμή που επιλέγεις να εκπονήσεις τη διπλωματική σου εργασία, μεταξύ των οποίων η χαρά για την αναγνώριση της αξίας και του συνολικού σου προφίλ ως υποψηφίου, αλλά ταυτόχρονα και η συνειδητοποίηση της ευθύνης που αναλαμβάνεις για το επόμενο χρονικό διάστημα, όντας μέλος ενός εργαστηρίου. Αυτή την ευθύνη θεώρησα πως οφείλω να αναλάβω, όχι μόνο τυπικά, για την πραγματοποίηση της εργασίας μου, αλλά και ουσιαστικά, για την εισαγωγή μου στην νοοτροπία δουλειάς μέσα σε ένα εργαστήριο καθώς και στο κλίμα συνεργασίας που υπάρχει σε αυτό.

Ύστερα από ένα ακαδημαϊκό έτος στους χώρους του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών μπορώ να πω πλέον με σιγουριά, πως αυτά που αποκόμισα, τόσο σε επίπεδο γνώσεων, εμπειριών, οργάνωσης και δεξιοτήτων όσο και σε επίπεδο συναναστροφής με άτομα καταξιωμένα στο χώρο της επιστήμης της Βιολογίας, θα σταθούν σημαντικά εφόδια στην σταδιοδρομία μου. Θα αποτελούν μία ευχάριστη ανάμνηση, που δεν θα ξεχάσω ποτέ, αλλά και ένα μάθημα ζωής, το οποίο πάντα θα εκτιμώ απεριόριστα.

Με την ευκαιρία ολοκλήρωσης της διπλωματικής μου εργασίας λοιπόν, θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω θερμά ορισμένους ανθρώπους, που στάθηκαν αρωγοί δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησής της. Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Γ. Παπαβασιλείου και επιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω, επίσης στην Αν. Καθηγήτρια κ. Έφη Μπάσδρα και στην Αν. Καθηγήτρια Χριστίνα Πιπέρη, μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής. Μου έδωσαν την ευκαιρία να αποτελέσω κομμάτι των ερευνητικών τους αναζητήσεων, κατάφεραν να με κάνουν να νιώσω οικεία, ώστε να μπορέσω εύκολα να συνηθίσω τους καινούργιους ρυθμούς και να αποδώσω στο μέγιστο δυνατό βαθμό, ελπίζοντας πως στάθηκα αντάξια.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στους Τζήνα Νταλαγιώργου, Χρήστο Αδαμόπουλο και Αντώνη Γαργαλιώνη, Μεταδιδακτορικοί Συνεργάτες, οι

οποίοι ανέλαβαν να μου υποδείξουν και να μου εξηγήσουν τις τεχνικές του εργαστηρίου, ήταν δίπλα μου οποιαδήποτε στιγμή χρειαζόμουν τη συμβουλή τους και με βοηθούσαν άμεσα, σε διάφορα πρακτικά ζητήματα που προέκυπταν καθημερινά, ανεξαρτήτως του φόρτου εργασίας τους. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, αλλά πρωτίστως φίλους, την Μάιρα Κατσιάνου, τον Άρη Ανέστη, τη Φορούλα Γριβάκη, τον Κώστα Παπαβασιλείου, οι οποίοι με καλωσόρισαν με χαρά στην οικογένεια του εργαστηρίου και ήταν πάντα πρόθυμοι να μου προσφέρουν έμπρακτα τη βοήθειά αλλά και τις γνώσεις τους.

Τέλος, ίσως το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και τους φίλους, για την υπομονή και τη στήριξη που μου έδειξαν, ο καθένας με το δικό του τρόπο, καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του χρόνου. Ενός χρόνου με ιδιαίτερες απαιτήσεις που όμως πάντα θα θυμάμαι με τις ωραιότερες αναμνήσεις...

Ευχαριστώ,

H. Ζώη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1. Δομή των οστών
- 1.2. Κυτταρική δομή οστίτη ιστού
- 1.3. Κυτταρική Βιολογία Οστεοβλαστών
 - 1.3.1. Προέλευση και Κύκλος Ζωής Οστεοβλαστών
 - 1.3.2. Λειτουργίες Οστεοβλαστών
 - 1.3.3. Αυξητικοί παράγοντες και οστεοβλάστες
- 1.4. Οστική ανακατασκευή
 - 1.4.1. Οστική ανακατασκευή και η ρύθμισή της
 - 1.4.2. Παθοφυσιολογία της οστικής ανακατασκευής
 - 1.4.3. Οστική ανακατασκευή και μηχανική τάση
- 1.5. Οστεοβλαστική διαφοροποίηση και Runx2
- 1.6. Οστεοβλαστική διαφοροποίηση και Οστεοκαλσίνη
- 1.7. Περιοδοντικός σύνδεσμος
- 1.8. Πολυκυστίνες
 - 1.9. Η πολυκυστίνη-1
 - 1.9.1. Δομή της PC-1
 - 1.9.2. Ιστική εντόπιση και έκφραση της PC-1
 - 1.9.3. Κυτταρική κατανομή της PC-1
 - 1.9.4. Λειτουργία της PC-1
 - 1.9.4.1. Πολυκυστίνη-1 και οστεοβλάστες
 - 1.10. Η Πολυκυστίνη-2
 - 1.10.1. Δομή της PC-2
 - 1.10.2. Ιστική εντόπιση και έκφραση της PC-2
 - 1.10.3. Κυτταρική κατανομή της PC-2
 - 1.10.4. Λειτουργία της PC-2
 - 1.11. Μοντέλα δομής και λειτουργίας συμπλόκου πολυκυστινών
 - 1.11.1. Σύμπλοκο πολυκυστινών στους πρωτογενείς κροσσούς
 - 1.12. Πολυκυστίνη-1 και το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT
 - 1.12.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT
 - 1.12.2. Σηματοδότηση JAK/STAT στην πολυκυστική νόσο των νεφρών
 - 1.12.3. Πολυκυστίνη-1 και JAK/STAT
 - 1.12.4. Το μονοπάτι JAK/STAT στην οστική ανάπτυξη

2. ΣΚΟΠΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 3.1 Κυτταροκαλλιέργειες
 - 3.1.1. Εφαρμογή μηχανικής τάσης στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου
- 3.2. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα
- 3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford
- 3.4. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση
- 3.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)
- 3.6. Απομόνωση RNA- RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)
- 3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)
- 3.8. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης
- 3.9. Ανοσοφθορισμός
- 3.10. Duolink OLINK
- 3.11. Κυτταρομετρία ροής
- 3.12. TransAM

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 4.1 Εντοπικός της πρωτεϊνικής έκφρασης των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά

κύτταρα

4.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα

4.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των PC-1 και pJAK2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα

4.4 Διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων κλειδιών του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT μετά από μηχανική διέγερση και χειρισμό των κυττάρων

4.5 Μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα hPDL κυττάρων

4.6 Διερεύνηση της ρύθμισης της έκφρασης των οστεοβλαστοειδικών γονιδίων *runx2* και *osteocalcin* μέσω της PC-1 μετά από μηχανική διέγερση

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι πολυκυστίνες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις φυσικές αλληλεπιδράσεις των κυττάρων, λειτουργώντας ως «μηχανο-αισθητήρες», οι οποίες έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυτοσωμική επικρατούσα πολυκυστική νόσο των νεφρών (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD), την πιο συχνή μονογονιδιακή διαταραχή των νεφρών. Η ADPKD προκαλείται από μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια *PKD1* ή *PKD2* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες πολυκυστίνη-1 (PC-1) και πολυκυστίνη-2 (PC-2) αντίστοιχα. Η PC-1 αποτελείται από ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο, έντεκα διαμεμβρανικές περιοχές και ένα μικρό ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο και λειτουργεί σαν ένας πρωτεϊνικός υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptor). Η PC-2 αποτελείται από έξι διαμεμβρανικές περιοχές και λειτουργεί ως ένας διάυλος διαπερατός στα ιόντα ασβεστίου. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι PC-1 και PC-2 συμμετέχουν στη ρύθμιση της θεμέλιας ουσίας των κυττάρων, παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους, στη κυτταρική διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό καθώς και στην απόπτωση, ενεργοποιώντας ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, μεταξύ των οποίων το μονοπάτι του JAK/ STAT.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βιολογικής σημασίας της μηχανοευαίσθητης πρωτεΐνης, PC-1 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα, συσχετίζοντας τον πιθανό ρόλο της στη μηχανική φόρτιση με τη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/ STAT.

Υλικά Μέθοδοι: Αρχικά μελετήθηκε, με τεχνικές ανοσοφθορισμού και ανοσοσύτωσης Western, ο εντοπισμός των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινους οστεοβλάστες. Στη συνέχεια, μέσω της τεχνικής ανοσοφθορισμού Duolink διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνικών μορίων PC-2, PC-1, pJAK2. Ακολούθως, διερευνήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής η έκφραση μορίων-κλειδιών του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/ STAT μετά από μηχανική διέγερση. Παράλληλα, διερευνήθηκε με τη μέθοδο TransAM η πιθανή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 μετά από μηχανική τάση σε οστεοβλάστες. Τέλος, μελετήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής, η ρύθμιση της έκφρασης των οστεοβλαστοειδικών γονιδίων *runx2* και *osteocalcin* μετά από μηχανική διέγερση και χρήση ειδικών αναστολέων έναντι μορίων του μελετώμενου μονοπατιού.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε έκφραση των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών PC-1 και pJAK2. Παράλληλα, παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση της έκφρασης του pJAK2 (ενεργή μορφή) μετά από 1/2, 1 και 6 ώρες μηχανικής διέγερσης. Ενώ, επώαση των κυττάρων πριν την εφαρμογή μηχανικής διέγερσης με αναστολείς, απέτρεψε την παρατηρούμενη αύξηση του ενεργού pJAK2. Αντίστοιχα, τα επίπεδα του pSTAT3 αυξήθηκαν στην 1/2 ώρα και μειώθηκαν στη 1 ώρα και στις 6 ώρες επιστρέφοντας στα φυσιολογικά επίπεδα. Ενώ, η επώαση των κυττάρων πριν την εφαρμογή μηχανικής διέγερσης με αναστολείς, απέτρεψε την παρατηρούμενη αύξηση του pSTAT3. Επίσης, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του pSTAT3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα οστεοβλαστικών κυττάρων μετά από 1/2 ώρα μηχανικής διάτασης. Ενώ, η επώαση των κυττάρων με τους αναστολείς έναντι των JAK2, STAT3 ανέστειλε μερικώς αυτή την ενεργοποίηση. Τέλος, τα πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση του *runx2* γονιδίου ρυθμίζεται από το JAK2/ STAT3 μονοπάτι μετά από PC-1-μεσολαβούμενη μηχανική διέγερση των οστεοβλαστών, ενώ για αυτό της *osteocalcin* δεν είναι ξεκάθαρο.

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει τη διαμεσολάβηση της μηχανοευαίσθητης πρωτεΐνης PC-1 και του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/ STAT στη μηχανοδιέγερση των οστεοβλαστών και την δυναμική ρύθμιση οστεοβλαστικών γονιδίων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Δομή των οστών

Τα οστά είναι δύσκαμπτα όργανα που αποτελούνται από δύο τμήματα, το εξωτερικό και εσωτερικό τμήμα. Το εξωτερικό τμήμα ονομάζεται φλοιώδες ή συμπαγές οστό, και συνιστά το 80% της μάζας του σκελετού. Το τμήμα αυτό αποτελείται από συμπαγή οστίτη ιστό και μόνιμα κύτταρα, τα οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα εντοπίζονται βαθιά στο συμπαγές οστό κι επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω ενός δικτύου σωληνίσκων, τους Αβερσιανούς σωλήνες. Μέσω του παραπάνω δικτύου πραγματοποιείται η μεταφορά διαφόρων θρεπτικών ουσιών στα οστεοκύτταρα. Επειδή η αναλογία της επιφάνειας ως προς τον όγκο του συμπαγούς οστού είναι μικρή και τα οστεοκύτταρα λίγα σε αριθμό, η ανακατασκευή του συμπαγούς οστού γίνεται με αρκετά βραδύ ρυθμό.

Εσωτερικά του συμπαγούς οστού βρίσκεται το δεύτερο τμήμα του οστού, που ονομάζεται δοκιδώδες ή σπογγώδες οστό, και αποτελεί το 20% της μάζας του σκελετού. Το σπογγώδες οστό αποτελείται από λεπτές, διαπλεκόμενες δοκίδες που επικαλύπτονται με οστικά κύτταρα. Στα κενά που υπάρχουν μεταξύ αυτών των δοκίδων, υπάρχουν αιμοφόρα αγγεία και μυελός των οστών. Επειδή εδώ η αναλογία της επιφάνειας ως προς τον όγκο του σπογγώδους ιστού είναι μεγάλη και υπάρχει σε αυτό έντονη κυτταρική δραστηριότητα, η ανακατασκευή του σπογγώδους οστού γίνεται με ταχύτερο ρυθμό απ' ό,τι του συμπαγούς οστού. Τα οστά είναι υπεύθυνα για τη στήριξη μαλακών μερών, τη προστασία ζωτικών οργάνων και την αιμοποίηση. Επίσης, τα οστά χαρακτηρίζονται και ως μεταβολική αποθήκη (οικονομία ασβεστίου και φωσφόρου) και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των δυνάμεων που εξασκούνται από τους μύες και η κίνηση του σώματος με τη βοήθεια των μακρών οστών (Watkins, 1999).

1.2. Κυτταρική δομή οστίτη ιστού

Τα οστά αποτελούνται από τον οστίτη ιστό. Ο οστίτης ιστός είναι ένας εξειδικευμένος συνδετικός ιστός, που αποτελείται από ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία, την οστική μητρική ή θεμέλια ουσία, και πέντε διαφορετικά είδη κυττάρων, τα οστεοπρογονικά, τους οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, τους οστεοκλάστες και τα επενδυτικά οστικά κύτταρα (lining cells) ή οστεοβλάστες εν ηρεμία ή οστεοβλάστες επιφάνειας. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα αποτελούν

πολυδύναμα μεσεγγυματικά κύτταρα (stem cells) κι εντοπίζονται στις οστικές επιφάνειες.

Οι οστεοβλάστες, είναι επίσης διατεταγμένοι σε επιφάνειες οστίτη ιστού, ο ένας δίπλα στον άλλο και προέρχονται από οστεοπρογονικά κύτταρα διαταγμένα στο περιόστεο και στο ενδόστεο. Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση των πρωτεϊνών της μητρικής ουσίας και την ασβεστοποίησή της.

Τα οστεοκύτταρα, τα πιο πολυάριθμα κύτταρα του οστίτη ιστού βρίσκονται σε κοιλότητες (lacunae) μέσα στην ασβεστοποιημένη μητρική ουσία και είναι ανενεργοί οστεοβλάστες που έχουν παγιδευτεί στη θεμέλια ουσία. Επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω οστικών σωληναρίων, χασμοσυνδέσεων, καθώς και με τις αποφυάδες που διαθέτουν, εξασφαλίζοντας έτσι την παροχή τροφικών συστατικών και ρυθμιστικών παραγόντων.

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα πολυπύρνα κύτταρα που προέρχονται από συνένωση μονοκυττάρων του αίματος. Εντοπίζονται στα βοθρία οστικής απορρόφησης (βοθρία του Howship) και έχουν λειτουργικό ρόλο την απορρόφηση του οστού, εκκρίνοντας οξέα, κολλαγενάση και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία αποδομούν τον οστίτη ιστό στις περιοχές αναδόμησης του οστού .

Πιο συγκεκριμένα, οι οστεοκλάστες προσκολλώνται στο τμήμα του οστίτη ιστού που πρέπει να αναδομηθεί και αυξάνουν την επιφάνεια επαφής με πολλαπλές αναδιπλώσεις τις κυτταρικής μεμβράνης τους. Εκεί εκκρίνουν καρβονικό, κιτρικό και γαλακτικό οξύ τα οποία διαλύουν τον υδροξυαπατίτη και απελευθερώνουν κολλαγόνο. Ινοβλάστες, μονοκύτταρα και μακροφάγα εκκρίνουν κολλαγενάση και άλλες υδρολάσες αποικοδομώντας και απομακρύνοντας με κυτταροφαγία τα οργανικά υλικά.

Τέλος, τα επενδυτικά οστικά κύτταρα (lining cells) είναι αποπλατυσμένα κύτταρα τα οποία διαθέτουν μειωμένο αριθμό κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Προέρχονται από οστεοβλάστες που έπαψαν να είναι ενεργοί και που, όμως, δεν εγκλωβίστηκαν σε οστεοειδές (νεοσχηματισμένη θεμέλια ουσία που δεν έχει ασβεστοποιηθεί) για να μετατραπούν σε οστεοκύτταρα. Καλύπτουν μεγάλη έκταση των οστικών επιφανειών, προστατεύοντάς τες, από την αποικοδομητική δράση των οστεοκλαστών (Kular et al., 2012).

1.3. Κυτταρική Βιολογία Οστεοβλαστών

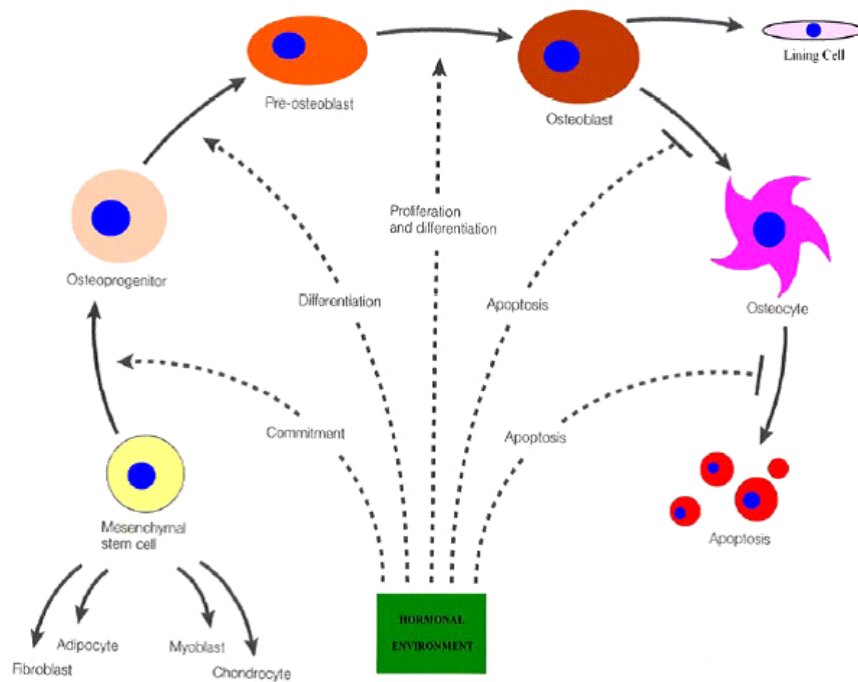
Τα πιο ενεργά κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες, υπεύθυνοι, αντίστοιχα, για την παραγωγή και την απορρόφηση του οστού.

1.3.1. Προέλευση και Κύκλος Ζωής Οστεοβλαστών

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από το μη-αιμοποιητικό μέρος του μυελού των οστών. Εκεί εδράζεται μια ομάδα αρχέγονων κυττάρων που μοιάζουν με ινοβλάστες και έχουν δυναμικό οστεογενούς διαφοροποίησης. Τα κύτταρα αυτά είναι γνωστά και ως αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal stem cells -MSCs) ενώ πολλές φορές αναφέρονται και ως αρχέγονα σκελετικά κύτταρα (skeletal stem cells -SSCs), στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών (bone marrow stromal cells -BMSCs) και πολυδύναμα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (multipotent mesenchymal stromal cells -MMSCs). Τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε μεσοδερμικού τύπου κύτταρα όπως οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα και πιθανώς σε μη μεσοδερμικού τύπου κύτταρα όπως νευρώνες και ηπατοκύτταρα (Ducy et al., 2000).

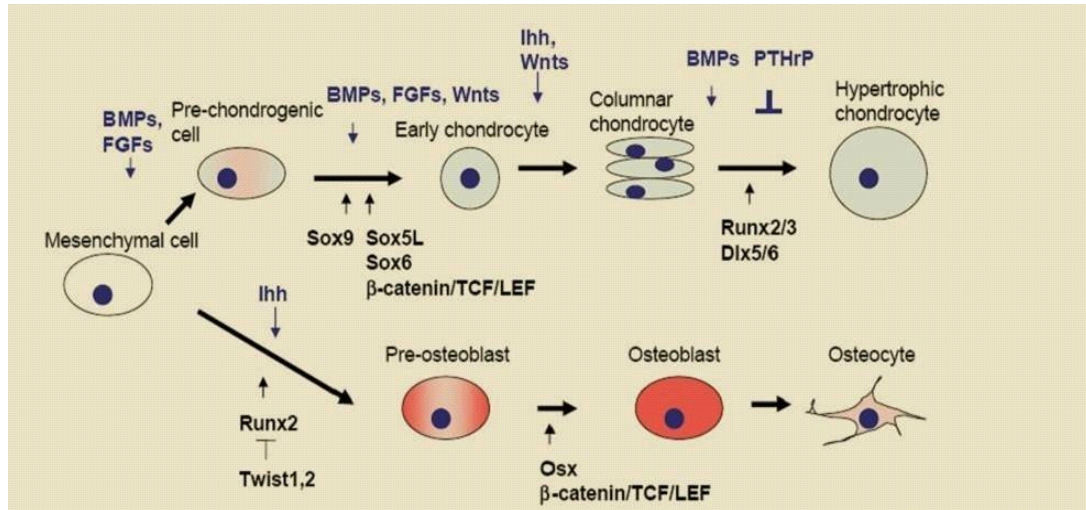
Στην αρχή της διαφοροποίησης προς τη σειρά των οστεοπαραγωγών κυττάρων, το αρχέγονο μεσεγχυματικό κύτταρο διαφοροποιείται προς το επαγωγίμο οστεοπρογονικό κύτταρο (osteoprogenitor), δηλαδή το κύτταρο που δεν έχει ακόμα λάβει το τελικό καθοριστικό μήνυμα διαφοροποίησης του προς οστεοβλάστη, αλλά που υπό κατάλληλες συνθήκες, όπως κατά την επαφή του με μη τιτανωμένο οστό, θα ακολουθήσει αυτή την οδό διαφοροποίησης. Η ύπαρξη τέτοιων επαγωγίμων οστεοπρογονικών κυττάρων πιστεύεται ότι εξηγεί την έκτοπη παραγωγή οστίτη ιστού σε εξωσκελετικούς ιστούς (Goltzman, 2002).

Το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης είναι ο προ-οστεοβλάστης, ο οποίος είναι προκαθορισμένος να εξελιχθεί σε οστεοβλάστη. Οι προ-οστεοβλάστες έχουν ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης, η οποία όμως μειώνεται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται περαιτέρω. Οι οστεοβλάστες δεν έχουν δυνατότητα διαίρεσης. Μικρό ποσοστό οστεοβλαστών εγκλωβίζεται σε τιτανωμένη μητρική ουσία και μετατρέπεται σε οστεοκύτταρα. Θεωρείται πως πολλοί οστεοβλάστες παραμένουν ανενεργοί στις οστικές επιφάνειες ως επενδυτικά κύτταρα. Ο κύκλος ζωής των οστεοβλαστών συνοψίζεται στην εικόνα 1.1 (Ducy et al., 1998).



Εικόνα 1.1 Ο κύκλος ζωής του οστεοβλάστη (Ducy et al., 1998)

Σε γενετικό επίπεδο, η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών είναι μια διαδικασία που γίνεται βαθμιαία (Kronenberg & Kobayashi, 2005). Κατά τον κύκλο της ζωής του, ο οστεοβλάστης εκφράζει όλα τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή οστίτη ιστού, αλλά όχι ταυτόχρονα. Στην αρχή εκφράζονται γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*Runx2*, *Osterix*), καθώς και γονίδια που αφορούν στη σύνθεση πρωτεϊνών της μητρικής ουσίας (κολλαγόνο και μη κολλαγόνες πρωτεΐνες) (Εικόνα 1.2). Στην συνέχεια ακολουθεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ωρίμανση του οστεοειδούς και τέλος, εκφράζονται γονίδια υπεύθυνα για την τιάνωση (π.χ. οστεοκαλσίνη, σιαλοπρωτεΐνη οστού, αλκαλική φωσφατάση και οστεοποντίνη).



Εικόνα 1.2 Διαδικασία διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα (Chiba & Komatsu, 1993)

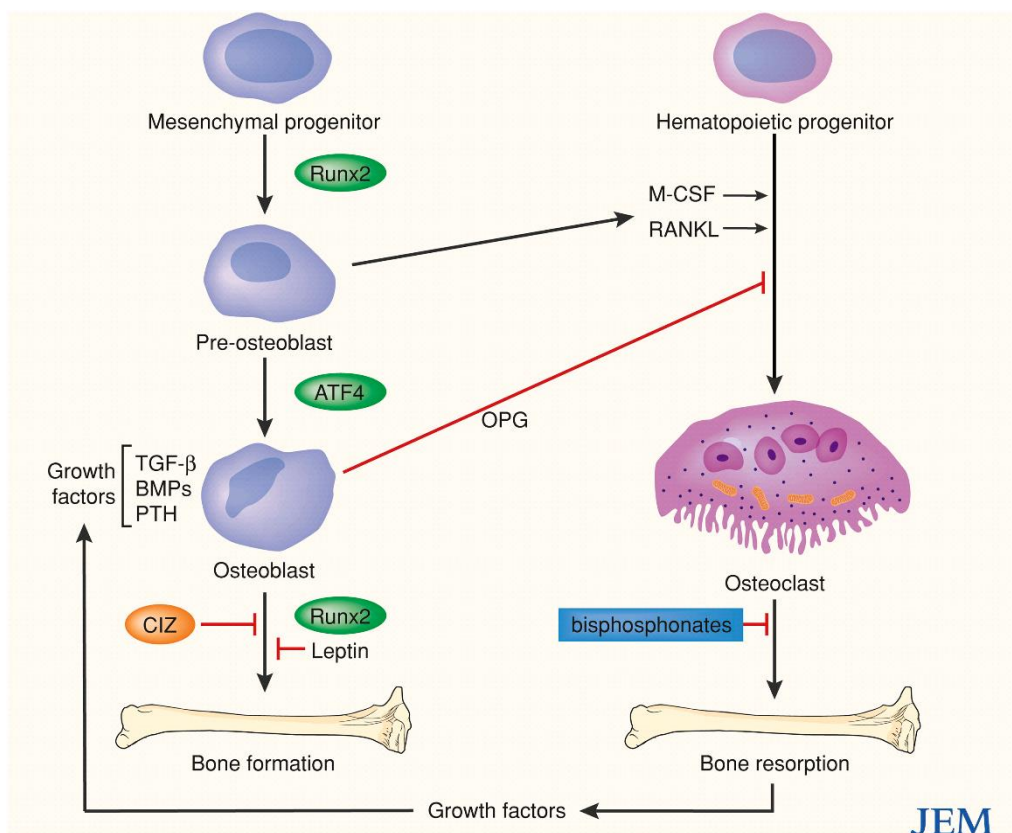
1.3.2. Λειτουργίες Οστεοβλαστών

Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για συγκεκριμένες λειτουργίες που σχετίζονται με: α) την παραγωγή δομικών συστατικών του οστίτη ιστού και β) την παραγωγή ρυθμιστικών παραγόντων κι ενζύμων που επηρεάζουν την παραγωγή και απορρόφηση του οστού (Aubin, 1998).

Έτσι οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή δομικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, με κυριότερη το κολλαγόνο τύπου I που αποτελεί το κύριο συστατικό του οστεοειδούς. Επιπρόσθετα, οι οστεοβλάστες, με την παραγωγή ενός ενζύμου, της αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, ALP), συμμετέχουν στην ασβεστοποίηση της εξωκυττάριας ουσίας. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των οστεοβλαστών, και σχετίζεται με τον σχηματισμό νέου οστίτη ιστού. Η οστεοκαλσίνη είναι μια ακόμα μη κολλαγόνα πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες κατά τη διάρκεια της φάσης ασβεστοποίησης του οστού.

Οι οστεοβλάστες είναι επίσης υπεύθυνοι για την παραγωγή αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και ενζύμων, απαραίτητων για το σχηματισμό και την απορρόφηση του οστού. Έτσι οι οστεοβλάστες παράγουν αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι εναποτίθενται και παραμένουν δεσμευμένοι στη θεμέλια ουσία του οστίτη ιστού. Όταν αργότερα με τη δράση των οστεοκλαστών γίνει απορρόφηση οστού, οι δεσμευμένοι αυτοί αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται, οδηγώντας στον

πολλαπλασιασμό οστεοπρογονικών κυττάρων κι επάγοντας έτσι τη διαφοροποίησή τους σε οστεοβλάστες (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Ωρίμανση και αλληλεπίδραση οστεοβλαστών-οστεοκλαστών (Krane, 2005)

1.3.3. Αυξητικοί παράγοντες και οστεοβλάστες

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες παραγόντων ανάπτυξης που επηρεάζουν την οστεοβλαστική δραστηριότητα καθώς και τις επιδράσεις άλλων ρυθμιστών της οστικής ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, τα μέλη της οικογένειας του μετατρεπτικού παράγοντα ανάπτυξης β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) επάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Επίσης, οι ομοιάζοντες προς την ινσουλίνη παράγοντες ανάπτυξης (Insulin Growth Factors, IGFs), επάγουν την οστεοβλαστογένεση μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου *Osterix*. Τέλος, οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenic Proteins, BMPs), στην αυτοκρινή και παρακρινή αναβολική δράση των οποίων μεσολαβούν οι ειδικοί υποδοχείς αυτών επηρεάζουν την οστεοβλαστική δραστηριότητα (Bikle, 2008).

Όμως κανείς από αυτούς τους παράγοντες ανάπτυξης δεν είναι ειδικός για την οστεοβλαστική ωρίμανση των κυττάρων, και έτσι είναι απαραίτητοι και μηχανισμοί που επάγουν την ειδικότητα του σκελετικού ιστού, και οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με άλλες ορμόνες της κυκλοφορίας (συμπεριλαμβανομένων γλυκοκορτικοειδών, στεροειδών του φύλου, παραθορμόνης [Parathormone Hormone, PTH] ή προσταγλανδίνης E2 [Prostaglandin E2, PGE2], οι οποίες και οι ίδιες έχουν γνωστές επιδράσεις στη βιολογία των οστών) καθώς και επίδραση ειδικών ενδοκυττάρων μεσολαβητών σε ειδικούς για το οστό μεταγραφικούς παράγοντες (Paparochroni et al., 2009).

Άλλοι παράγοντες ανάπτυξης, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), ο προερχόμενος εξ αιμοπεταλίων παράγοντας ανάπτυξης (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) και ο ινοβλαστικός παράγοντας ανάπτυξης (Fibroblast Growth Factor, FGF), εκκρίνονται από τα περιβάλλοντα αγγεία και εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Ο VEGF επάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και αυξάνει την εναπόθεση μεταλλικών στοιχείων στο αναγεννημένο οστό (Zelzer et al., 2005). Ο ρόλος του PDGF περιορίζεται σε καταστάσεις που σχετίζονται με φλεγμονή και επανόρθωση και ο FGF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των χονδροβλαστών και των οστεοβλαστών αλλά καταστέλλει τη σύνθεση νέου κολλαγόνου της θεμέλιας ουσίας (Kim et al., 2007).

1.4. Οστική ανακατασκευή

1.4.1. Οστική ανακατασκευή και η ρύθμισή της

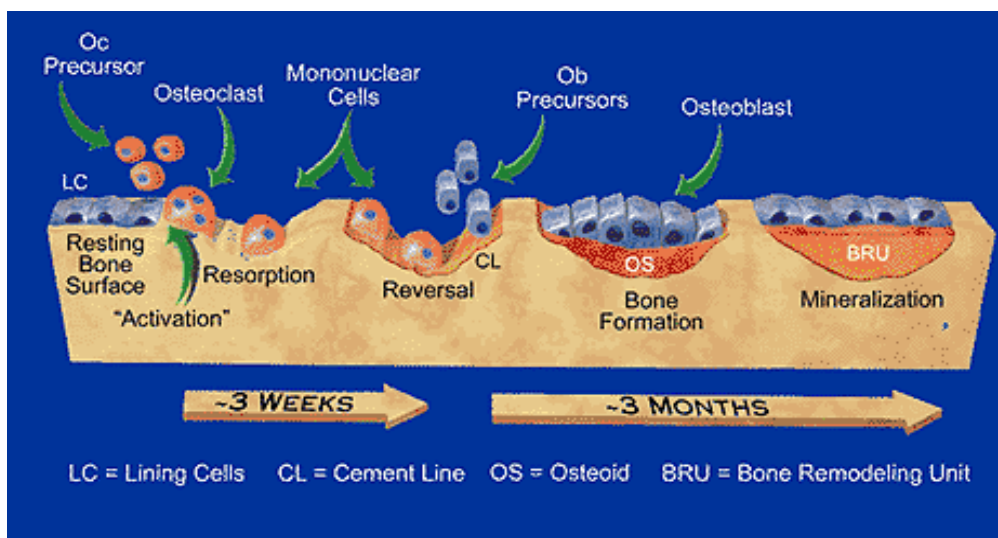
Κατά τη διάρκεια της ζωής πραγματοποιείται μια συνεχής ανακατασκευή των οστών με την αναρρόφηση του παλαιού οστού (καταβολική διαδικασία) από τους οστεοκλάστες, και την εναπόθεση του καινούργιου οστού (αναβολική διαδικασία) από τους οστεοβλάστες. Η διαδικασία αυτή είναι αναγκαία για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του σκελετού και για την περάτωση των μεταβολικών λειτουργιών του σκελετού, (το οστό λειτουργεί ως αποθήκη ασβεστίου και φωσφόρου). Η φάση ενεργοποίησης της οστικής ανακατασκευής εξαρτάται από την επίδραση τοπικών παραγόντων στα προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών, τα μεσεγχοματικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αλληλεπιδρούν με πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία θα σχηματίσουν τους οστεοκλάστες στην αναρροφητική φάση. Οι οστεοκλάστες, στο τέλος της αναρροφητικής διαδικασίας,

παράγουν μια σειρά «σημάτων» έναρξης της εναπόθεσης οστού, η οποία θα πραγματοποιηθεί από τους οστεοβλάστες (Raisz, 1999).

Η ανακατασκευή του συμπαγούς οστού αρχίζει από ομάδες οστεοκλαστών που με τη δράση τους σχηματίζουν κωνοειδείς κοιλότητες στο εσωτερικό του οστού. Οι παραπάνω κοιλότητες επικαλύπτονται γρήγορα από οστεοβλάστες που εναποθέτουν στο τοίχωμά τους τα κυλινδρικά πέταλα του νέου οστού, με αποτέλεσμα την προοδευτική πλήρωση των κωνοειδών κοιλοτήτων από το νέο οστό. Η ανακατασκευή του σπογγώδους οστού επιτελείται στην επιφάνεια του οστού. Αρχικά, με τη δράση των οστεοκλαστών σχηματίζεται μια μικρή κοιλότητα, ενώ με τη δράση των οστεοβλαστών η κοιλότητα αυτή γεμίζει με νέο οστό. Σε έναν νεαρό ενήλικα, ο κύκλος αυτός απαιτεί περίπου 200 ημέρες για να ολοκληρωθεί. Στο φλοιώδες οστό η οστική ανακατασκευή διαρκεί πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (συνολικά περίπου 7 μήνες), ενώ στο σπογγώδες οστό η διαδικασία αυτή είναι συντομότερη (περίπου 3-4 μήνες). Σε κάθε περιοχή του οστού με ενεργό ανακατασκευή, οι διαδικασίες επαναρρόφησης και παραγωγής νέου οστού, είναι στενά συνδεδεμένες. Έτσι, η ποσότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού ισοδυναμεί απόλυτα με την ποσότητα του επαναρροφούμενου οστού. Οι φάσεις που διενεργείται η οστική ανακατασκευή είναι πέντε (Εικόνα 1.4):

1. Φάση ηρεμίας (quiescent phase): Η ελεύθερη επιφάνεια της μονάδος επιστρώνεται από άφθονα αποπλατυσμένα επενδυτικά κύτταρα, τα οποία είναι για την ώρα ανενεργά.
2. Φάση ενεργοποίησης (activation phase): Στη φάση αυτή ένας διεγέρτης των οστεοκλαστών κινητοποιεί τους προ-οστεοκλάστες, αυτοί συντήκονται σε πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα και σχηματίζουν τους οστεοκλάστες, οι οποίοι συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της μονάδας.
3. Φάση οστικής απορρόφησης (resorption phase): Η φάση αυτή διαρκεί 3-4 εβδομάδες στο σπογγώδες και 6-10 εβδομάδες στο φλοιώδες οστό. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής οι επιστρατευμένοι στην ελεύθερη επιφάνεια οστεοκλάστες απορροφούν προοδευτικά την αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία αδειάζοντας έτσι το περιεχόμενο της μεταβολικής μονάδας.
4. Φάση κυτταρικής αναστροφής (reversal phase): στην μη πλήρως κατανοητή αυτή φάση οι οστεοκλάστες αποκολλώνται και απομακρύνονται από τον πυθμένα της μεταβολικής μονάδας και στη θέση τους εμφανίζονται οι οστεοβλάστες.

5. Φάση οστικής παραγωγής (formation phase): Στη φάση αυτή, που διαρκεί 2-3 μήνες στο φλοιώδες και 145 περίπου ημέρες στο σπογγώδες οστό, οι οστεοβλάστες εναποθέτουν προοδευτικά οστό, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ισόποσο με εκείνο που απορροφήθηκε στην προηγούμενη φάση.



Εικόνα 1.4 Φάσεις οστικής ανακατασκευής (www.medscape.org/viewarticle/416478_4).

Η διαδικασία της ανακατασκευής των οστών δεν απαιτεί την άμεση συμμετοχή των ορμονών. Ωστόσο, οι ορμόνες είναι απαραίτητες για να εξασφαλίσουν την επαρκή παροχή ασβεστίου και φωσφόρου. Στην επιφάνεια των οστεοβλαστών βρίσκονται υποδοχείς για την παραθορμόνη (PTH) και την 1,25-διυδροξυβιταμίνη D (1,25 (OH)₂D), ενώ στους οστεοκλάστες δεν ανευρίσκονται τέτοιοι υποδοχείς. Επομένως, οι μεμονωμένοι οστεοκλάστες δεν ανταποκρίνονται στην παραθορμόνη ή στη βιταμίνη D παρά μόνο εάν βρίσκονται πλησίον οστεοβλαστών (Rodan and Martin, 1981).

1.4.2. Παθοφυσιολογία της οστικής ανακατασκευής

Η υγεία των οστών διατηρείται μέσω μιας ισορροπημένης διαδικασίας οστικής ανακατασκευής που έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχή αντικατάσταση παλαιού οστού, εξασθετισμένου από μικροκατάγματα, με νέο οστό. Η παραπάνω διαδικασία περιλαμβάνει οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες και νέο οστικό σχηματισμό από τους οστεοβλάστες. Αποτυχία απόκτησης της κορυφαίας οστικής μάζας ή ανακολουθία στον οστικό ανασχηματισμό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα

ευθραυστότητα των οστών. Ανωμαλίες της οστικής ανακατασκευής μπορούν να δημιουργήσουν σκελετικές διαταραχές όπως οστεοπόρωση, υπερ-παραθυρεοειδισμός και υπερθυρεοειδισμός, νόσος του Paget, ορθοπεδικές διαταραχές και οστεοπέτρωση (Raisz, 1999).

1.4.3. Οστική ανακατασκευή και μηχανική τάση

Η οστική ανακατασκευή είναι μία βιολογική διαδικασία που επιφέρει αλλαγές στην εξωτερική και στην εσωτερική διάπλαση του οστού, οι οποίες εξαρτώνται από το μηχανικό περιβάλλον του οστού. Όπως προαναφέρθηκε, οι λειτουργίες των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών ανταγωνίζονται συχνά μεταξύ τους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως είναι η μεταβολή των μηχανικών δυνάμεων που υφίστανται, καθώς και το μεταβολικό ή διατροφικό στρες.

Η αρχική απόκριση του οστού στη δημιουργία «σημάτων» έπεται από τοπικό μηχανικό στρες συντελείται μέσω οστικής απορρόφησης (Krane, 2005). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η σταθερά επαναλαμβανόμενη άσκηση φορτίου που προκαλεί υψηλές τιμές τάσης, οι υψηλοί ρυθμοί και οι ασυνήθεις διανομές της τάσης αυτής, διεγείρουν τις οστεογενετικές αποκρίσεις και διατηρούν μια υψηλή οστική μάζα.

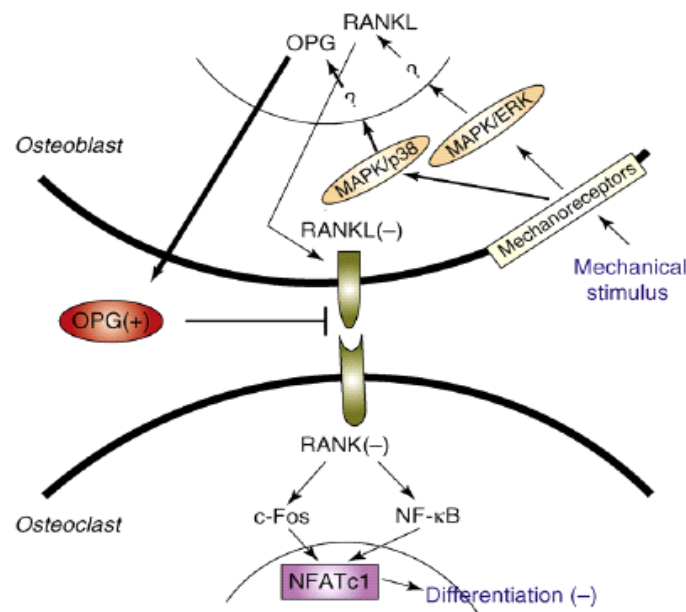
Αντίθετα, η εφαρμογή στατικής τάσης όπως επίσης η αργή εναλλαγή του δυναμικού της τάσης και η «προβλέψιμη και αλάνθαστη» τάση, επιτρέπει την οστική απώλεια και την χαμηλή οστική μάζα (Ehrlich et al., 2002, Forwood et al., 1996, Turner, 1998, Hatton et al., 2003). Επιπρόσθετα, έχει επισημανθεί βελτίωση στη δομή και την ισχύ του οστού μετά από μηχανική επιρροή φορτίου μακράς διάρκειας, εφόσον αυτή διακόπτεται από βραχείας διάρκειας παύσεις (Robling et al., 2002).

Η διαδικασία προσαρμογής των οστών προωθείται από δυναμική παρά από στατική επιρροή φορτίου. Είναι γνωστό ότι μια μηχανική διέγερση μικρής διάρκειας είναι αρκετή για την έναρξη μιας προσαρμοστικής απόκρισης. Η παράταση της διάρκειας αυτής έχει αρνητική επίδραση στην περαιτέρω οστική προσαρμογή. Τακτικά επαναλαμβανόμενη επιρροή μηχανικού φορτίου προκαλεί την μείωση της απόκρισης των οστικών κυττάρων λόγω συνήθειας και «σηματοδοτικής προβλεψιμότητας» (signaling prediction) (Turner, 1998). Η εφαρμογή των κανόνων αυτών απεικονίζεται στα αποτελέσματα της μικροβαρύτητας στο διάστημα, στην οστεοπόρωση ή την παράλυση (απώλεια οστού) (Robling et al., 2002, Agarwal et al., 2003) καθώς και στην αντισφαίριση σε επαγγελματικό επίπεδο (αύξηση οστού) (Yamamoto et al., 2006). Επιπλέον, η μηχανική τάση έχει και πολλές εφαρμογές στην

οδοντιατρική, την ορθοπεδική, την κρανιοπροσωπική ανάπτυξη και τη θεραπεία των καταγμάτων.

Οι αλλαγές στην μηχανική τάση, η επιδιόρθωση των μικροκαταγμάτων και η διατήρηση του κύκλου ανακατασκευής προκαλούν κυτταρικές αποκρίσεις που καθορίζονται τοπικά από κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και άλλα μόρια. Ειδικότερα η ιντερλευκίνη 1β (IL-1 β), ο TNF-α και η PGE2 (Agarwal et al., 2003, Murray & Rushton, 1990) καθώς επίσης οι IL-6, IL-8, RANKL και η OPG (Yamamoto et al., 2006, Wadal et al., 2006, Takeroni et al., 2007, Tsuji et al., 2004) φαίνεται να επάγονται μετά από μηχανική διάταση (Εικόνα 1.5). Παρομοίως και οι αυξητικοί παράγοντες όπως οι IGFs, TGF-β1 και FGFs (Cheng et al., 1999, Lean et al., 1995, Cillo et al., 2000, Gosain et al., 2000). Επιπλέον, οστεοβλάστες που υφίστανται μηχανική τάση εμφανίζουν αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA της οστεοποντίνης, οστεοκαλσίνης, του PDGF και του κολλαγόνο τύπου I και III (Harter et al., 1995, Jones et al., 1991).

Ταυτόχρονα, ένας κύριος ρυθμιστής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Runx2, ο οποίος προσδένεται στις περιοχές των υποκινητών όλων των σημαντικών οστεοβλαστοειδικών γονιδίων (οστεοκαλσίνης, κολλαγόνου τύπου I α3, σιαλοπρωτεΐνης οστού, αλκαλικής φωσφατάσης, οστεοποντίνης και κολλαγενάσης III), ελέγχοντας την έκφρασή τους (Ducy et al., 1997, Harada et al., 1999, Jimenez et al., 1999).



Εικόνα 1.5 Αλληλεπιδράσεις οστεοβλαστών και οστεοκλαστών κατά τη μηχανική διέγερση (Gupta et al., 1996).

1.5. Οστεοβλαστική διαφοροποίηση και Runx2

Ο Runx2 ή Cbfa1 είναι ένας σημαντικός οστεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας. Η έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα είναι απαραίτητη και επαρκής για την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλαστικά κύτταρα. Ο Runx2 αποτελεί μέλος της οικογένειας runx. Και τα τρία γονίδια μέλη της οικογένειας κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που περιέχουν μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA και δημιουργούν ετεροδιμερή με τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή πυρηνικό παράγοντα πρόσδεσης b (Core-binding factor b, Cbfb). Ο Cbfb δεν προσδέεται απευθείας στο DNA, αλλά προάγει αλλοστερικά την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών Runx στο DNA και αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής τους προσφέροντας σταθερότητα ενάντια στην πρωτεολυτική διάσπασή τους από το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (Ziros et al., 2008).

Ο Runx2 δρα ως βασικός ρυθμιστής ο οποίος προσδέεται στο οστεοβλαστοειδικό cis-στοιχείο 2 (osteoblast specific element 2, OSE2) του υποκινητή όλων των γονιδίων που σχετίζονται με τον οστεοβλάστη. Η έκφραση και η δράση του Runx2 ρυθμίζεται από διάφορα σήματα όπως το μηχανικό φορτίο, οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs), τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού (transforming growth factor), την παραθορμόνη (PTH) και τον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (Ziros et al., 2004). Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει αλληλεπίδραση του Runx2 με το μεταγραφικό παράγοντα, STAT3b. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί πως η αυξητική ορμόνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογία των οστών, εξασθενεί την μεταγραφική ενεργότητα του Runx2 μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ Runx2 και STAT3b (Ziros et al., 2004).

1.6. Οστεοβλαστική διαφοροποίηση και Οστεοκαλσίνη

Η οστεοκαλσίνη είναι μια οστεοειδική πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες και θεωρείται ως η πιο άφθονη μη-κολλαγονούχα πρωτεΐνη που απαντάται στην οστική εξωκυττάρια μήτρα (Henriquez et al., 2002). Η οστεοκαλσίνη αποτελεί δείκτη της προχωρημένης διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής της διαδικασίας της ασβεστοποίησης του οστού (Roberts et al., 2005, Pignolo et al., 2011). Ο μεταγραφικός παράγοντας Runx2, ένας κύριος ρυθμιστής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, προσδέεται στην περιοχή του υποκινητή της οστεοκαλσίνης ελέγχοντας την έκφρασή της (Ducy et al., 1997).

Ο σχηματισμός των οστών από τους οστεοβλάστες προϋποθέτει δύο κύρια στάδια: την εναπόθεση οργανικής ουσίας και την μετέπειτα ανοργανοποίηση της. Το πρώτο βήμα απαιτεί την έκκριση των πρωτεϊνών κολλαγόνου, κυρίως κολλαγόνο τύπου I, μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών (οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη, BSP II και οστεοποντίνη) και πρωτεογλυκανών όπως ντεκορίνη, όπως και διγλυκάνη. Αυτή η πρόσφατα σχηματισμένη, μη ανοργανοποιημένη μήτρα οστού ονομάζεται οστεοειδές. Στη φάση της ασβεστοποίησης η οστεοκαλσίνη βρίσκεται στην καρβοξυλιωμένη της μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή συγγένεια προς τον υδροξυαπατίτη και απαντάται στην μήτρα του οστού (Karsenty et al., 2012).

1.7. Περιοδοντικός σύνδεσμος

Ο περιοδοντικός σύνδεσμος είναι ο μαλακός πυκνός συνδετικός ιστός που εντοπίζεται μεταξύ του λεπτού στρώματος οστεΐνης που καλύπτει την ρίζα του δοντιού και του φατνιακού οστού που στηρίζει το δόντι και διατηρεί την δομική ακεραιότητα των μεταλλοποιημένων ιστών (Peverali et al., 2001). Περιέχει έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό που μπορεί να διαφοροποιηθεί είτε σε οδοντινοβλάστες είτε σε οστεοβλάστες (Seo et al., 2004).

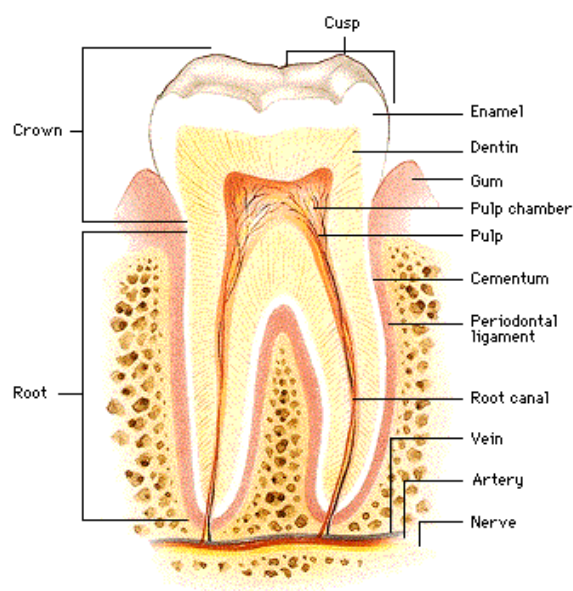
Ο περιοδοντικός σύνδεσμος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανατολή του δοντιού, στην ύπαρξη του δοντιού στο σαγόι, στη φυσιολογική κινητικότητα κατά την διάρκεια της μάσησης, ως πηγή οστεογενών κυττάρων, στη θρέψη δοντιού και στην ομοιόσταση και επιδιόρθωση κατεστραμμένου ιστού.

Οι ινοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου, τα κυρίαρχα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου, φέρουν οστεογενή χαρακτηριστικά όπως (Seo et al., 2004), ικανότητα σχηματισμού μεταλλοποιημένων οζιδίων *in vitro*, έκφραση δεικτών που σχετίζονται με τα οστά, (όπως αλκαλική φωσφατάση και οστική σιαλοπρωτεΐνη), απόκριση σε παράγοντες που επάγουν την δημιουργία οστών, όπως παραθυρεοειδής ορμόνη, παράγοντας ομοιάζων προς την ινσουλίνη 1 (insulin-like growth factor 1), οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (bone morphogenetic protein 2) και μετατρεπτικό παράγοντα ανάπτυξης β (transforming growth factor β).

Οι ινοβλάστες αυτοί μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες σε απόκριση εξωκυττάρων ερεθισμάτων. Μπορούν επίσης, μέσω διαφοροποίησης να συνεισφέρουν στην αναγέννηση και επιδιόρθωση του περιοδοντικού συνδέσμου καθώς και στην επαναδιαμόρφωση του παρακείμενου σκληρού ιστού (Kletsas et al., 2002).

Λόγω της θέσης τους, τα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου υπόκεινται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μηχανική καταπόνηση (π.χ μασητικές δυνάμεις, ορθοδοντική θεραπεία κτλ) (Lekic and McCulloch, 1996). Η ικανότητα αυτών των κυττάρων να αποκρίνονται σε μηχανικό φορτίο (Basdra et al., 1995, Kletsas et al., 1998, Konstantonis et al., 2014), υποδεικνύει ότι έχουν κεντρικό ρόλο στην οστική αναδιαμόρφωση που σχετίζεται με την ανάπτυξη, την λειτουργία και την αναγέννηση του μηχανισμού στήριξης του δοντιού τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Peverali et al., 2001).

Τα PDL κύτταρα συνιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην έρευνα των οστών λόγω του οστεοβλαστικού τους χαρακτήρα, αλλά και λόγω της σχετικά εύκολης πρόσβασης και απομόνωσής τους από την οδοντική ρίζα (Piche et al., 1989, Basdra and Komrosch, 1997). Επιπλέον, πολύτιμη είναι η δυνατότητα που έχουν να αποκρίνονται στην άσκηση μηχανικών δυνάμεων, διαμέσου κυτταρικών γεγονότων όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο καταβολισμός και η σύνθεση της θεμέλιας ουσίας, κάτω από τον έλεγχο των ίδιων παραγόντων που επιδρούν και στους οστεοβλάστες.



Εικόνα 1.5 Μορφολογία του δοντιού και θέση του περιοδοντικού συνδέσμου.

1.8. Οι πολυκυστίνες

Ο πολυκυστίνες αποτελούν μια νέα οικογένεια οχτώ διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που παρουσιάζουν σημαντική ομολογία. Τα δύο πιο αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας είναι η πολυκυστίνη-1 (Polycystin-1, PC-1) και η πολυκυστίνη-2 (Polycystin-2, PC-2) που εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) και *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*), τα υπεύθυνα γονίδια της αυτοσωμικής επικρατούσας πολυκυστικής νόσου των νεφρών (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD).

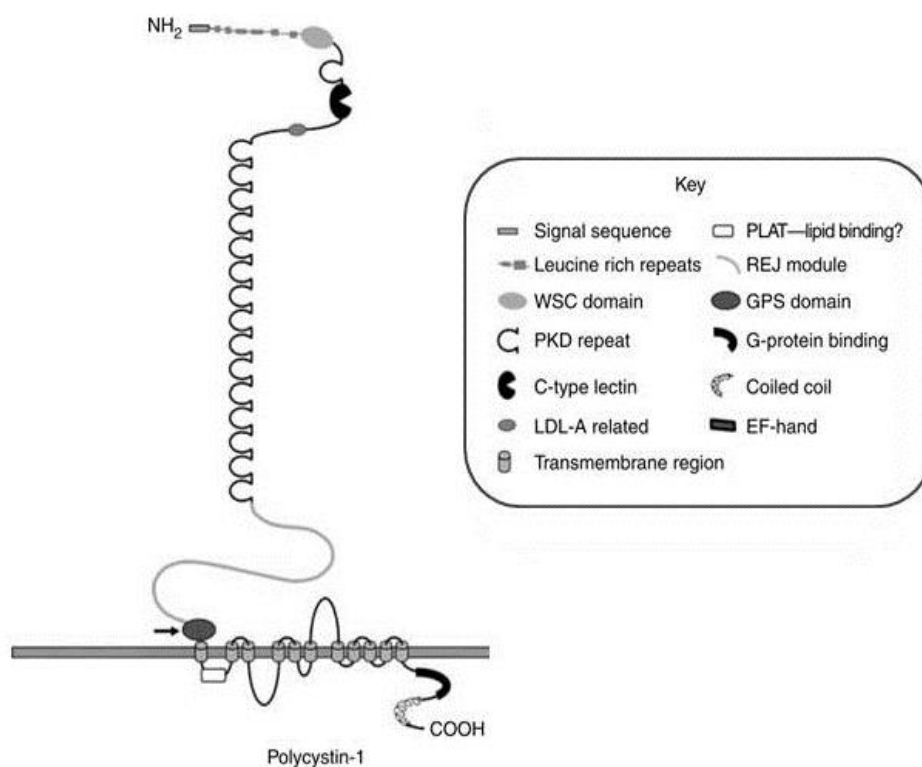
Βάση της λειτουργικής και δομικής συγγενείας τους οι πολυκυστίνες διακρίνονται σε δύο υπο-οικογένειες που περιλαμβάνουν α) τα μόρια τύπου υποδοχέα PC-1 (PC-1-receptor like molecules): PC-1, πολυκυστίνη-REJ, πολυκυστίνη-1L1 (PCL), πολυκυστίνη-1L2 και πολυκυστίνη-1L3 και β) τις πρωτεΐνες τύπου διάλυου ιόντων PC-2 (PC-2 ion channel-like proteins): PC-2, πολυκυστίνη-L (ή πολυκυστίνη-2L1) και την πολυκυστίνη-2L2 (Zhou, 2009). Η ομοιότητα των πολυκυστινών, ιδιαίτερα της PC-2 και των πρωτεϊνών τύπου διαύλου ιόντων PC-2 με τα κανάλια παροδικού δυναμικού υποδοχέα (Transient Receptor Potential-channels, TRP-κανάλια), έχει οδηγήσει στην κατάταξή τους σε μία υπο-οικογένεια (TRPP, Transient Receptor Potential Polycystic) της υπερ-οικογένειας των TRP-καναλιών (Torres & Harris, 2009; Zhou, 2009).

Η πρώτη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε ήταν η PC-1 μέσω κλωνοποίησης θέσης (positional cloning) του γονιδίου *PKD1* το 1994 (The European Polycystic Kidney Disease Consortium Cell 78, 725) στα πλαίσια της έρευνας πάνω στα αίτια της ADPKD, της γενετικής νόσου των νεφρών, οποία οδηγεί στη δημιουργία πολυκυστικών νεφρών και προοδευτικά στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *PKD1* και *PKD2*, τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 16 (γενετικός τόπος 16p13.3) και 14 (γενετικός τόπος 4q21-23) αντίστοιχα, συνδέονται αιτιολογικά με τη νόσο, ενώ η συνεχής έρευνα πάνω στη μοριακή γενετική της ADPKD παρέχει διαρκώς νέα δεδομένα για τη λειτουργία των πολυκυστινών (Torres, Harris, & Pirson, 2007).

1.9. Η πολυκυστίνη-1

1.9.1. Δομή της PC-1

Η PC-1 προέρχεται από τη μετάφραση ενός μεταγράφου με μήκος 14,5 kilobases (kb), το οποίο διαθέτει 228 νουκλεοτίδια στην 5' αλληλουχία και 1019 νουκλεοτίδια στην 3' αλληλουχία της αμετάφραστης περιοχής του (untranslated region, UTR). Το πολυπεπίδιο που κωδικοποιείται αποτελείται από 4304 αμινοξέα και έχει εκτιμώμενο μοριακό βάρος 462 kiloDalton (kDa). Διαθέτει ένα μεγάλο εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο, 11 διαμεμβρανικές περιοχές (Nims, Vassmer, & Maser, 2003) και ένα μικρότερο ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό (The European Polycystic Kidney Disease Consortium 1994, Hughes et al., 1995) (**Εικόνα 1.6.**).



Εικόνα 1.6. Η προβλεπόμενη δομή της PC-1 (προσαρμοσμένη από Ong & Harris, 2005).

Το εξωκυττάριο άκρο αποτελείται από περισσότερα από 3000 αμινοξέα και περιέχει ένα χαρακτηριστικό συνδυασμό πεπτιδικών περιοχών: δύο περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (Leukine Rich Repeats, LRR) που πλαισιώνονται από δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (cysteine rich domains), την περιοχή WSC (cell wall integrity and cell response component), μια περιοχή λεκτίνης τύπου C (C-type lectin domain), μια περιοχή ομόλογη με αυτή της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας A (LDL-A, Low-Density Lipoprotein A), 16 διακριτές περιοχές PKD (Polycystic Kidney

Disease) και μια περιοχή 1000 περίπου αμινοξέων που ονομάζεται REJ (Receptor for Egg Jelly) και είναι ομόλογη με την πρωτεΐνη που ανιχνεύεται σε αβγά αχινού (Qian, Wei, Germino, & Oberhauser, 2005). Οι περιοχές LRR και C-type lectin συναντώνται και σε άλλες δομές παίζοντας ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, στην κυτταρική προσκόλληση και στην εξωκυττάρια δέσμευση αμινοξέων-υδατανθράκων, ενώ ως σημείο πρόσδεσης λειτουργεί και η περιοχή LDL-A (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Οι επαναλαμβανόμενες δομές PKD, από τις οποίες οι 15 βρίσκονται σε διαδοχή, διαθέτουν δομή ανοσοσφαιρίνης και προσφέρουν μηχανική υποστήριξη, ελαστικότητα και επαγόμενη από μηχανικές δυνάμεις δυνατότητα αυξομείωσης της έκτασης του αμινοτελικού άκρου (Qian, Wei, Germino, & Oberhauser, 2005). Η περιοχή REJ, φαίνεται ότι δεν είναι ενιαία αλλά αποτελείται από επαναλαμβανόμενες δομές β-πτύχωσης επιφάνειας όπου μάλλον πρόκειται για περιοχές τύπου φμπρονεκτίνης III (Schroder et al., 2011).

Ακολουθεί μια πρωτεολυτική περιοχή 50 αμινοξέων τύπου υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptor Proteolytic Site, GPS), όπου η PC-1 υφίσταται λειτουργική *cis*-αυτοπρωτεόλυση και διάσπαση με αποτέλεσμα το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό να παραμένουν μη ομοιοπολικά προσδεδεμένα. Οι διαμεμβρανικές περιοχές περιέχουν 5 ενδοκυττάρια και 5 εξωκυττάρια βρόγχους, ενώ τέλος το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από 225 αμινοξέα, έχει τη δομή ενός σπειροειδούς πηγίου και έχει την ικανότητα λειτουργικής διάσπασης σε διαφορετικές περιοχές (Oatley, Stewart, Sandford, & Edwardson, 2012).

1.9.2. Ιστική εντόπιση και έκφραση της PC-1

Η PC-1 εμφανίζει ευρεία έκφραση σε ένα μεγάλο φάσμα ιστών του ανθρώπινου οργανισμού οι οποίοι περιλαμβάνουν τον θύμο αδένα, το δωδεκαδάκτυλο, την καρδιά, τις αμυγδαλές, το έντερο, τον σπλήνα, το θυρεοειδή αδένα, τους πνεύμονες, τους όρχεις, το στόμαχο, το ήπαρ και το αγγειακό ενδοθήλιο. Η έκφραση εντοπίζεται συνήθως στα επιθηλιακά κύτταρα κάθε ιστού, όπως στο ουροθήλιο της ουροδόχου κύστης, στο επιθήλιο των ηπατικών χοληφόρων, του μαστού και του παγκρέατος (Ibraghimov-Beskronnaya et al., 1997). Στον εγκεφαλικό φλοιό έχουν διαπιστωθεί πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ διάμεσα επίπεδα έκφρασης χαρακτηρίζουν τον νεφρικό ιστό (Ward et al., 1996).

Η έκφραση της PC-1 κατά τη διάρκεια σχηματισμού του νεφρού εντοπίζεται σε επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται είτε από το νεφρογενές μεσέγγυμα είτε από την ουρητηρική καταβολή (Ward et al., 1996). Πιο συγκεκριμένα, στον εμβρυικό νεφρικό ιστό, η PC-1 εντοπίζεται στους πρόδρομους επιθηλιακούς νεφρώνες (Ong, 2000) ενώ σε έμβρυα 5-6 εβδομάδων ανιχνεύεται στα σωληνάρια του μεσόνεφρου. Στις 15 εβδομάδες παρατηρούνται υψηλά επίπεδα έκφρασης στα νεφρικά σωληνάρια εγγύς της νεφρογενούς ζώνης, στο εγγύς σημείο της ουρητηρικής καταβολής καθώς και σε περιοχές της κάψας του Bowman σε ώριμα αγγειώδη σπειράματα. Η ένταση της έκφρασης αυξάνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης μέχρι την 24^η εβδομάδα και στη συνέχεια μειώνεται προοδευτικά για να καταλήξει σε χαμηλότερο επίπεδο στον διαφοροποιημένο νεφρικό ιστό (Chauvet et al., 2002).

Στον διαφοροποιημένο νεφρικό ιστό ισχυρή έκφραση παρατηρείται στα νεφρικά σωληνάρια του φλοιού γύρω από το σπείραμα, στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο, στην αγκύλη του Henle και στα αθροιστικά σωληνάρια (Ward et al., 1996). Το συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης φαίνεται να εγκαθιδρύεται κατά τα τελευταία στάδια της νεφρογένεσης (Ong, 2000). Επιπλέον, ασθενής έκφραση έχει παρατηρηθεί και στο αγγειακό ενδοθήλιο (Ibraghimov-Beskronnaya et al., 1997).

Στην ADPKD η έκφραση της PC-1 περιορίζεται επίσης στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα ενώ ανιχνεύεται στο 70-100% των κύστεων. Η έκφραση της PC-1 στα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τις παθολογικές κύστες παρουσιάζεται πολλαπλά διαφοροποιούμενη γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στις διαφορετικές θεωρίες για τον μηχανισμό έναρξης της νόσου (Ong, 2000). Έτσι αν και σε αρκετές μελέτες υπάρχει σαφής αύξηση στην ένταση της έκφρασης, μολονότι αυτή διαφοροποιείται πολλαπλά (Ward et al., 1996; Ibraghimov-Beskronnaya et al., 1997), στα επιθηλιακά κύτταρα των παθολογικών κύστεων, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ένταση της έκφρασης είναι ασθενέστερη από αυτή στον εμβρυικό και στον διαφοροποιημένο φυσιολογικό νεφρικό ιστό, ενώ σε ορισμένες μελέτες η έκφραση μπορεί ακόμη να απουσιάζει στο 10-30% των κύστεων (Chae et al., 2006). Μια πιθανή εξήγηση που δυσχεραίνει τον καθορισμό του προτύπου έκφρασης της PC-1 είναι το γεγονός ότι το 5' άκρο του γονιδίου *PKD1* βρίσκεται σε μια περιοχή του χρωμοσώματος 16 με πολλούς διπλασιασμούς, από όπου παράγονται μετάγραφα τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό πρωτεϊνών που εμφανίζουν σημαντική αντιγονική ομοιότητα (The European Polycystic Kidney Disease Consortium Cell, 1994).

1.9.3. Κυτταρική κατανομή της PC-1

Τα περισσότερα δεδομένα που αφορούν την κυτταρική εντόπιση της PC-1 προέρχονται από μελέτες στον νεφρικό ιστό, όπου εντοπίζονται οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της ADPKD. Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι διαφορετικών επιτόπων της πρωτεΐνης στον εξωκυττάριο βρόγχο της διαμεμβρανικής περιοχής και στο ενδοκυττάριο τμήμα της δείχνει ότι η έκφραση της PC-1 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και απουσιάζει από τον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων (Geng et al., 1996). Η κύρια κατανομή της εντοπίζεται στις βασικοπλευρικές επιφάνειες της κυτταρικής μεμβράνης των σωληναρικών επιθηλιακών κυττάρων (Kottgen & Walz, 2005) σε συμφωνία με τον προτεινόμενο ρόλο της PC-1 ως διαμεσολαβητή της διακυτταρικής επικοινωνίας. Παρόμοια εντόπιση εμφανίζει σε κυτταρικές καλλιέργειες νεφρικών σωληναριακών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας, εμφανίζοντας συν-εντοπισμό με μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως το PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 ή CD-31) (Ibraghimov-Beskronnaya et al., 1997). Δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκαλύπτουν ότι η πλειονότητα των μορίων της PC-1 σχετίζεται με διάφορες δομές κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (Geng et al., 1996). Σε νεφρικά κύτταρα από σκύλους MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), η PC-1 εντοπίζεται σε σύμπλοκα κυτταρικής προσκόλλησης στα δεσμοσώματα και βρίσκεται σε επαφή με πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, συμμετέχοντας στην κυτταρική μηχανική στήριξη και σταθεροποίηση (Scheffers et al., 2000). Αντίθετα, η PC-1 έχει ανιχνευθεί στην κορυφαία επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης στον εμβρυικό νεφρικό ιστό σε σχέση με τη βασική και τις πλευρικές επιφάνειες του κυττάρου (Geng et al., 1996), κάτι που συνάδει με τον συνεντοπισμό της με την E-καδερίνη και την κατενίνη στους συνδέσμους κυτταρικής προσκόλλησης που βρίσκονται κοντά στην κορυφαία επιφάνεια (Kottgen & Walz, 2005).

Η PC-1 εντοπίζεται επίσης και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) όπου η έκφρασή της μεταβάλλεται ανάλογα με την έκφραση της PC-2 (Grimm et al., 2003). Η «κυκλοφορία» και τοπολογία της PC-1 μέσα στο κύτταρο επηρεάζεται από διάφορους τύπους μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ADPKD, εμποδίζοντας κυρίως τη σταθερή σύνδεση των διαμεμβρανικών περιοχών 10 και 11 με την κυτταρική μεμβράνη (Nims, Vassmer, & Maser, 2011). Επίσης, η μετατόπιση της PC-1 στην πλευρική επιφάνεια διακόπτεται στα κύτταρα που έχουν ανεπάρκεια του

γονιδίου *TSC2* (Tuberous Sclerosis Complex 2) του συμπλέγματος οξώδους σκλήρυνσης, περιορίζοντας την PC-1 στη συσκευή Golgi (Kleyменова et al., 2001).

1.9.4. Λειτουργία της PC-1

Η PC-1 λειτουργεί ως ένας μηχανοαισθητήρας, ο οποίος αντιλαμβάνεται τα εξωκυττάρια, μηχανικά ερεθίσματα και διαμορφώνει ανάλογα την κυτταρική απάντηση ρυθμίζοντας βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση (Dalagiorgou et al., 2010). Η PC-1 λειτουργεί, κυρίως, ως άτυπος υποδοχέας συζευγμένος με τις G πρωτεΐνες. Όταν η PC-1 εκφράζεται μεμονωμένα, φαίνεται να ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια με απευθείας σύνδεση και ενεργοποίηση με τις ετεροτριμερείς Gαί/ο πρωτεΐνες. Ακολουθεί τροποποίηση των κατιοντοεκλεκτικών διαύλων ασβεστίου (Ca^{2+}) και καλίου (K^{+}) GIRK (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels) μέσω της απελευθέρωσης των Gβγ υπομονάδων (Delmas et al., 2002; Parnell et al., 1998). Βάσει αυτού του μηχανισμού παίζει ρόλο στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ενώ έχει βρεθεί να σχηματίζει πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες εστιακής προσκόλλησης, όπως η p130cas, η FAK (focal adhesion kinase), η paxillin, η pp60c-src (phospho p60 cellular-src) καθώς και με μόρια προσκόλλησης και διακυτταρικής επικοινωνίας όπως η E-καδερίνη, η β και η γ κατενίνες (Geng et al., 2000).

Η PC-1 σχηματίζει λειτουργικά σύμπλοκα, επίσης, με πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες τροποποιώντας, μέσω φωσφορυλίωσης, την ενεργότητά της. Για παράδειγμα η πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A, PKA) μπορεί να φωσφορυλιώνει την PC-1 στο καρβοξυτελικό της άκρο (Parnell, Magenheimer, Maser, & Calvet, 1999). Επίσης, η πρώτη PKD περιοχή της PC-1 αλληλεπιδρά με την ανοσοφαιρινική (Ig) περιοχή του πρωτεϊνικού υποδοχέα τυροσινικής φωσφατάσης RPTPσ (receptor protein tyrosine phosphatase σ) και οι καρβοξυτελικές περιοχές με τον RPTPγ (receptor protein tyrosine phosphatase γ). Κατά αυτόν τον τρόπο ο RPTPγ αποφωσφορυλιώνει την PC-1 στη θέση Y4237 και τροποποιεί πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, π.χ. με την PC-2, και επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια (Boucher et al., 2011). Παρομοίως, η PC-1 αλληλεπιδρά και αποφωσφορυλιώνεται από την φωσφατάση PP-1a (protein phosphatase-1a) και η αλληλεπίδραση αυτή εξασθενεί σημαντικά σε μεταλλάξεις της PC-1 που έχουν σχέση με την ADPKD (Parnell, Puri, Wallace, & Calvet, 2012).

Η PC-1 λειτουργεί ως κύριο μηχανοαισθητήριο μόριο και στα αγγεία καθώς εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Φαίνεται ότι η ομοιοστατική ρύθμιση της PC-1, όσον αφορά στην τοπολογία και τη λειτουργία της, είναι προαπαιτούμενη για τη μεταβίβαση της εξωκυττάριας διατμητικής τάσης λόγω ροής, τη μετατροπή της σε ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω αλλαγής της συγκέντρωσης του ασβεστίου και τη βιοχημική σύνθεση ενός σημαντικού αγγειοδιασταλτικού παράγοντα, του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO) (Nauli et al., 2008). Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη απεδείχθηκε για πρώτη φορά, η συμμετοχή των PC-1 και PC-2 στην επαγωγή της αθηροσκλήρωσης, ως μηχανοαισθητήρια μόρια που ανιχνεύουν αλλαγές στη διατμητική τάση. Τα μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στις αθηρωματικές βλάβες, έχοντας εμπλοκή σε φλεγμονώδεις διεργασίες και στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας (Varela et al., 2015).

Η PC-1 μπορεί να ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες μέσω ενεργοποίησης βασικών μεταγραφικών παραγόντων. Η PC-1 έχει αποδειχθεί ότι σε νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης JAK2 (Janus Kinase 2), γεγονός που οδηγεί σε φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η πρωτεολυτική διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της PC-1, όμως, και η μετατόπισή του στον πυρήνα αποτρέπει την απευθείας ενεργοποίηση του STAT3, ενώ το αποκομμένο καρβοξυτελικό άκρο λειτουργεί, μαζί με κυτταροκίνες και αυξητικούς παραγόντες, ως συνενεργοποιητής του STAT3 (Talbot et al., 2011). Ως εκ τούτου το καρβοξυτελικό άκρο της PC-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης. *In vivo* πειράματα σε διαγονιδιακούς μύες έδειξαν ότι η PC-1 στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα, υπό την εφαρμογή μηχανικών ερεθισμάτων, υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση στο καρβοξυτελικό της άκρο, το οποίο στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί σηματοδοτικές διαδικασίες (Chauvet et al., 2004). Πειράματα διαμόλυνσης με πλασμίδιο που κωδικοποιεί τα τελευταία 193 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου στην κυτταρική σειρά MDCK έδειξαν ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών φαινοτύπων. Στα κύτταρα με ενδογενή έκφραση της PC-1 η εισαγωγή της ελλειπτικής μορφής ουσιαστικά μιμήθηκε τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Αντίθετα, σε κύτταρα που είχε γίνει υπερέκφραση της PC-1 η ελλειπτική μορφή ανέστειλε τις επιπτώσεις της PC-1 στις λειτουργίες του κυττάρου, υποδηλώνοντας τη γένεση μηχανισμών παλίνδρομης ρύθμισης της ενδογενούς PC-1

από το καρβοξυτελικό άκρο της. Το καρβοξυτελικό άκρο της PC-1 περιέχει επίσης μοτίβα που επηρεάζουν τη μορφή και την τοπολογία του δικτύου των μικροσωληνίσκων και του ενδοπλασματικού δικτύου (Basavanna et al., 2007).

1.9.4.1. Πολυκυστίνη-1 και οστεοβλάστες

Μελέτες έδειξαν ότι οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα μυών εκφράζουν μετάγραφα των PC-1, PC-2 και πρωτεϊνών που εντοπίζονται στους κροσσούς (Xiao et al., 2006, 2008). Αναλύσεις του σκελετικού φαινότυπου και των οστεοβλαστών που προέρχονται από μια ποικιλία PKD1 ελλειμματικών μοντέλων μυών υποστηρίζουν ένα ρόλο για την PC-1 στην ανάπτυξη των οστών καθώς και πρωταρχικό ρόλο στην λειτουργία των οστεοβλαστών. Πιο συγκεκριμένα, μετά από ιστολογική ανάλυση οστού μυών ετερόζυγων για τη μεταλλαγή στο γονίδιο *pkd1* και φυσιολογικών, εντοπίστηκε εξασθενημένος σχηματισμός οστού που πραγματοποιείται μέσω οστεοβλαστών. Στον ορό των ετερόζυγων μυών παρατηρείται μείωση στην οστεοκαλσίνη, οστεοπροτεγερίνη, και RankL, που αποτελεί περαιτέρω απόδειξη για την οστεοβλαστική δυσλειτουργία. Τα επίπεδα του TRAP στον ορό, ένας δείκτης της οστικής επαναρρόφησης, ήταν επίσης μειωμένα στους ετερόζυγους σύγκριση με τους φυσιολογικούς μύες. Έκφραση του Runx2-II, (Xiao et al., 2005) μειώθηκε σημαντικά στους ετερόζυγους μύες τόσο σε εμβρυϊκό όσο και σε ενήλικο στάδιο. Επιπλέον, στους ετερόζυγους μύες παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στην καθοδική γονιδιακή έκφραση, συμπεριλαμβανομένης μιας σημαντικής μείωσης των οστεοβλαστικών (οστεοκαλσίνη, *osterix*, OPG, και RANKL) και των οστεοκλαστικών (TRAP) ειδικών μεταγράφων σε έμβρυα και ενήλικους μεταλλαγμένους μύες. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα χαμηλά ποσοστά οστικού σχηματισμού παρά η αυξημένη επαναρρόφηση συμβάλλουν στη χαμηλή οστική πυκνότητα και όγκο των μηριαίων οστών που παρατηρήθηκαν στους ετερόζυγους μύες.

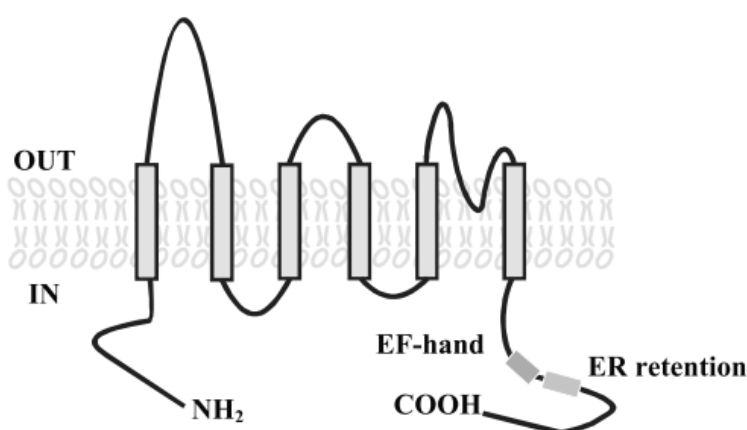
Η PC-1 συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του οστεοειδικού μεταγραφικού παράγοντα Runx2. Η υπερέκφραση του καρβοξυτελικού άκρου σε οστεοβλάστες μυών επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου *Runx2* μέσω ρύθμισης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου (Xiao, Zhang, Magenheimer, Luo, & Quarles, 2008). Η γονιδιακή έκφραση του Runx2 ενεργοποιείται επίσης σε οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα PDL (periodontal ligament cells) μέσω της σηματοδότησης καλσινευρίνης/ NFAT (nuclear factor of activated T-cells) ενισχύοντας το ρόλο της PC-1 ως ένα μηχανοευαίσθητο μόριο το οποίο μπορεί να

ρυθμίζει την οστεοβλαστική γονιδιακή μεταγραφή και έτσι την οστική διαφοροποίηση και ανάπτυξη (Dalagiorgou et al., 2013).

1.10. Η Πολυκυστίνη-2

1.10.1. Δομή της PC-2

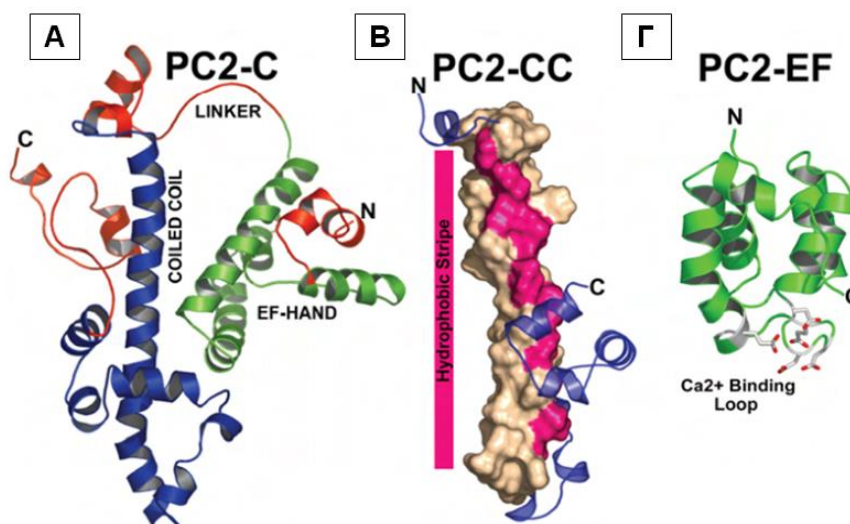
Η PC-2, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 968 αμινοξέα και έχει προβλεπόμενο μοριακό βάρος περίπου 110 kDa. Αποτελεί το γονιδιακό προϊόν του γονιδίου *PKD2*, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 4 και διαθέτει μια αλληλουχία περίπου 5057 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp) (Mochizuki et al., 1996). Το γονίδιο *PKD2* διαθέτει 21% ταυτόσημη και 46% ομόλογη αλληλουχία με το γονίδιο *PKD1* που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 3688-4109 του καρβοξυτελικού άκρου της PC-1 (Schneider et al., 1996). Η PC-2 διαθέτει έξι διαμεμβρανικές περιοχές, ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό άκρο. Οι βρόγχοι 1, 3 και 5 των διαμεμβρανικών περιοχών είναι εξωκυττάριοι ενώ όταν η PC-2 εντοπίζεται στη μεμβράνη του ΕΔ, εκτείνονται μέσα στον αυλό του ΕΔ, ενώ οι βρόγχοι 2 και 4 εκτείνονται μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η προσέγγιση αυτή επιβεβαιώνει τον κυτταροπλασματικό προσανατολισμό του καρβοξυτελικού και αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης (Hoffmeister, Gallagher, Rasclé, & Witzgall, 2011) (**Εικόνα 1.7.**).



Εικόνα 1.7. Αναπαράσταση της προβλεπόμενης τοπολογίας της PC-2 (Li et al., 2003)

Βιοφυσικές αναλύσεις καθώς και η μοριακή μοντελοποίηση έχουν δείξει ότι το καρβοξυτελικό άκρο της PC-2 (PC-2 C-terminal cytoplasmic tail, PC2-C) αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές. Η πρώτη περιοχή είναι δομή «χέρι EF» (EF hand) (PC2-EF), που αντιστοιχεί σε δομή έλικας-βρόγχου-έλικας, ειδική για τη δέσμευση ιόντων ασβεστίου. Η δεύτερη είναι μια ευέλικτη περιοχή σύνδεσης (linker)

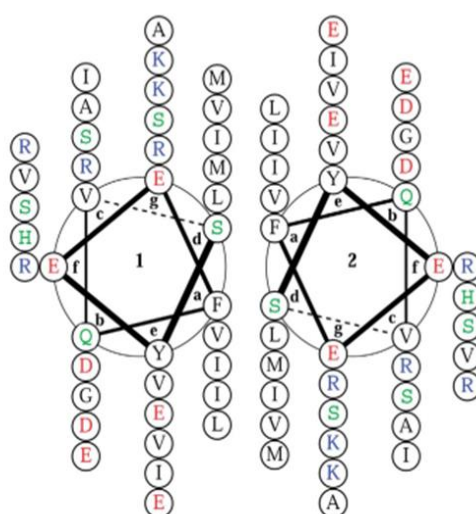
και η τρίτη ένα μοτίβο με τη μορφή σπειροειδούς πηνίου «coiled coil» (PC-2 C-terminal coiled coil, PC2-CC) που αποτελεί και την καταλυτική περιοχή διμερισμού της πρωτεΐνης. Συνεπώς, η PC2-EF περιοχή αποτελεί έναν αισθητήρα για τα ιόντα ασβετίου και υφίσταται μεταβολές διαμόρφωσης που εξαρτώνται από τη συγκεκριμένη λειτουργία (Εικόνα 1.8.) (Petri et al., 2010).



Εικόνα 1.8. Μοντελοποίηση της κυτταροπλασματικής καρβοξυτελικής περιοχής της PC-2. (Α) Οι τρεις λειτουργικές περιοχές στο καρβοξυτελικό άκρο (PC2-C) της PC-2: η περιοχή PC-2-EF (EF-HAND), η περιοχή σύνδεσης (linker) και η περιοχή με τη μορφή σπειροειδούς πηνίου (coiled coil) (Petri ET, 9176). (Β) Μοντέλο (ROBETTA) της περιοχής PC2-CC στο οποίο η κεντρική έλικα απεικονίζεται ως επιφάνεια. Τα κατάλοιπα «a» και «d» της δομής coiled coil διασύνδεσης του σπειροειδούς πηνίου όπως προβλέφθηκαν από το πρόγραμμα MARCOIL είναι τονισμένα με ροζ χρώμα. (Γ) Μοντέλο ROBETTA της περιοχής PC2-EF στο οποίο απεικονίζονται με ράβδους τα πιθανά κατάλοιπα δέσμευσης ιόντων ασβετίου (Ca²⁺) (Celic et al., 2008).

Η PC-2, όπως προαναφέρθηκε μαζί με την PC-1 και τα άλλα μέλη της οικογένειας των πολυκυστινών είναι μέλη της υποοικογένειας TRPP της υπερ-οικογένειας των TRP-καναλιών. Συγκεκριμένα η PC-2 διαθέτει την ικανότητα δημιουργίας ομο- ή ετερο-πολυμερών τόσο με την PC-1 αλλά και με διαφορετικά μέλη της υπερ-οικογένειας των TRP-καναλιών, όπως με το κανάλι TRPC1. Το PC-2/TRPC1 ετερο-πολυμερές εμφανίζει διακριτή λειτουργία σε σχέση με τα ετεροδιμερή PC-1/PC-2, εφόσον στα επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα mIMCD3 έχει δειχθεί ότι ενεργοποιείται μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων GPCR (Bai et al., 2008). Πέρα από την καταλυτική περιοχή διμερισμού της πρωτεΐνης στην coiled coil

περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου, έχει ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά και μια νέα περιοχή διμερισμού στο αμινοτελικό άκρο της PC-2 διαμορφώνοντας ένα μοντέλο συνάθροισης των μορίων της PC-2 ως ένα λειτουργικό ομο-τετραμερές, που εξαρτάται από τη λειτουργία και των δύο περιοχών διμερισμού της πρωτεΐνης (**Εικόνα 1.9.**) (Feng et al., 2008). Πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε την τετραμερή διαμόρφωση της PC-2 ως μια σταθερή και λειτουργική δομή της πρωτεΐνης, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ιόντων ασβεστίου και έδειξε ότι μόνο η καρβοξυτελική περιοχή ολιγομερισμού είναι ικανή για την διαμόρφωση του τετραμερούς (Ferreira et al., 2011).



Εικόνα 1.9. Ελικοειδής προβολή της καρβοξυτελικής coiled coil περιοχής (CC2) (S835–A873). Οι θέσεις της Coiled-coil δομής απεικονίζονται με γράμματα a-g ενώ τα αμινοξέα με χρώματα: υδροφοβικά-μαύρα, βασικά-μπλε, όξινα-κόκκινα, πολικά-πράσινα. Τα υδροφιλικά κατάλοιπα στην διασύνδεση της δομής κάνουν τον ολιγομερισμό (Giamarchi et al., 2010).

1.10.2. Ιστική εντόπιση και έκφραση της PC-2

Η PC-2 έχει ανιχνευθεί στους περισσότερους εμβρυικούς και ώριμους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Σε διαφοροποιημένους ιστούς η υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους νεφρούς, στο πάγκρεας και το μυοκάρδιο ενώ σε εμβρυικούς ιστούς η έκφραση της είναι υψηλή στους νεφρούς και τους πνεύμονες (Chauvet et al., 2002). Κατά την έκτη ημέρα (E6) εμβρυικής ζωής παρατηρήθηκε έντονη έκφραση της PC-2 στο εξώδερμα, στο βρεγματικό ενδόδερμα, στα κυλινδρικά κύτταρα και στο εξω-εμβρυικό ενδόδερμα ενώ μέχρι την ημέρα E9.5, η PC-2 ανιχνευόταν στο

μεσέγγυμα των σωματιών και στα κύτταρα του μυοκαρδίου (Markowitz et al., 1999). Όσον αφορά στον εμβρυικό νεφρικό ιστό, παρατηρήθηκε έντονη έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο του γονιδίου *PKD2* μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας στον μεσόνεφρο, στο μετανεφρικό μεσέγγυμα και στην ουρητηρική καταβολή. Από τη 10^η εβδομάδα και έπειτα όλες οι αναπτυσσόμενες δομές του επιφανειακού φλοιού και οι κλάδοι της ουρητηρικής καταβολής παρουσίασαν επίσης έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο. Στο υποκείμενο παρέγγυμα, σε όλα τα σωληναριακά τμήματα εντοπίστηκε έκφραση του γονιδίου *PKD2*, αλλά ισχυρότερη έκφραση εντοπίστηκε στα άπω σωληνάρια και στο ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Η ένταση της έκφρασης ήταν υψηλή σε όλες τις δομές του εξωτερικού φλοιού, στις αρτηρίες και στα λεία μυικά κύτταρα μέχρι και την 36^η εβδομάδα ενώ μετά την παρέλευσή της εμφανίστηκε ταχεία μείωση του επιπέδου της έκφρασης, η οποία σχεδόν εξαφανίστηκε στα εγγύς σωληνάρια με το πέρας της διαφοροποίησής τους (Chauvet et al., 2002).

Στον πλήρως διαφοροποιημένο νεφρικό ιστό εμφανίζεται έκφραση στα άπω και στα αθροιστικά σωληνάρια, στο ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και στα αιμοφόρα αγγεία ενώ παρόμοιο πρότυπο έκφρασης ανιχνεύτηκε και σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης (Chauvet et al., 2002). Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση σε τομές διαφοροποιημένου νεφρικού ιστού έδειξε ίδιο πρότυπο έκφρασης με απουσία της έκφρασης στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, στο διάμεσο ιστό, στο αγγειώδες σπείραμα και στο αγγειακό δίκτυο (Foggensteiner et al., 2000). Όσον αφορά στις κύστες των *PKD1* πολυκυστικών νεφρών δείχθηκε ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός στην πλειονότητα των κυττάρων που επενδύουν τις κύστες καθώς επίσης συνέκφραση της PC-2 και της PC-1 ξεχωριστά σε κάθε κύτταρο (Ong et al., 1999).

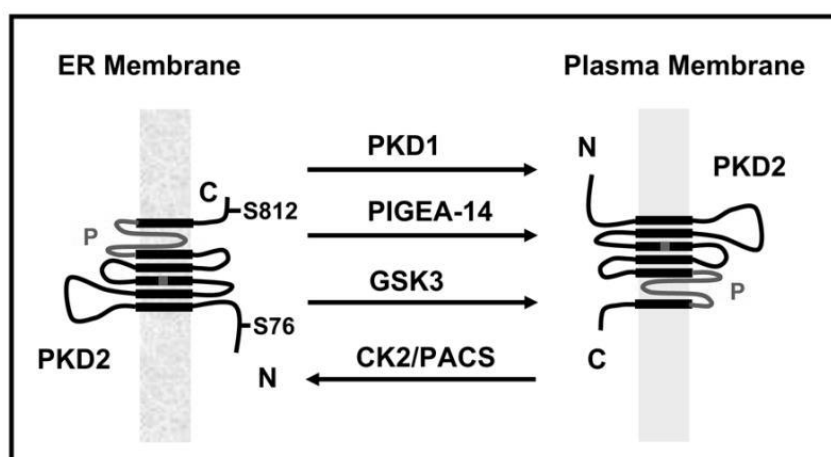
Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας η PC-2 εκφράζεται διάχυτα σε μια πλειάδα ιστών των εξωνεφρικών ιστών που περιλαμβάνουν το νευρικό σωλήνα, τα νευρικά γάγγλια, το ήπαρ και το μυοκάρδιο, ενώ τη 16^η εβδομάδα έντονη είναι η έκφραση στις πρόσθιες ρίζες του νωτιαίου μυελού (Chauvet et al., 2002). Η PC-2 εντοπίστηκε επίσης σε διάφορα είδη επιθηλιακών κυττάρων, όπως για παράδειγμα στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπτυσσόμενου βρογχικού αδένου στις 14 εβδομάδες, με ισχυρή έκφραση στο επιθήλιο της τραχείας, στα χονδροκύτταρα παρακείμενα των αναπτυσσόμενων βρόγχων και στα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα του οισοφάγου στις 20 εβδομάδες (Foggensteiner et al., 2000).

1.10.3. Κυτταρική κατανομή της PC-2

Η PC-2 εντοπίζεται εκτός από την κυτταρική μεμβράνη, κυρίως στο ΕΔ και στους πρωτογενείς κροσσούς (Kottgen & Walz, 2005) ενώ έχει εντοπιστεί στη μιτωτική άτρακτο και στο κεντρόσωμα σε κύτταρα υπό διαίρεση και σε κύτταρα σε ηρεμία αντίστοιχα (Jurczyk et al., 2004; Rundle, Gorbsky, & Tsiokas, 2004). Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση σε διαφοροποιημένο νεφρικό ιστό, αλλά και πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι η PC-2 εντοπίζεται κυρίως στη βασική και στις πλευρικές επιφάνειες των επιθηλιακών κυττάρων (Foggensteiner et al., 2000). Πειράματα ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές σειρές διαμολυσμένες με το γονίδιο *PKD2* έδειξαν ένα διακριτό κυτταροπλασματικό και περιπυρηνικό πρότυπο έκφρασης, το οποίο συνάδει με την εντόπιση της PC-2 στο ΕΔ. Το γεγονός ότι η PC-2 εδράζεται κυρίως στο ΕΔ επιβεβαιώθηκε με διπλός ανοσοφθορισμό έναντι της PC-2 και της πρωτεϊνικής δισουλφιδικής ισομεράσης (*Protein Disulfide Isomerase, PDI*) πρωτεΐνης-δείκτη του ΕΔ. Τα ευρήματα έδειξαν σημαντική αλληλοεπικάλυψη των δύο πρωτεϊνών αποδεικνύοντας την ειδική εντόπιση της PC-2 στο ΕΔ με το καρβοξυτελικό άκρο της να φέρει μοτίβο δέσμευσης στο ΕΔ (*ER retention motif*) καθιστώντας το απαραίτητο για την συγκεκριμένη εντόπιση. Μια σειρά από μελέτες σε κολοβώματα της PC-2 όπου έλειπε το αντίστοιχο μοτίβο δείχνει ότι η πρωτεΐνη μεταναστεύει και εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη. (Cai et al., 1999; Scheffers et al., 2002). Οι διαφορές στα ευρήματα που αφορούν στην έκφραση της PC-2 φαίνεται να οφείλονται στην ιστοειδική έκφρασή της, στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που μελετώνται και στα διαφορετικά στάδια κυτταρικής διαφοροποίησης (Kottgen & Walz, 2005).

Ο εντοπισμός της PC-2 σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που ρυθμίζουν δυναμικά και ελέγχουν την τοποθέτηση της PC-2 κυρίως μεταξύ ΕΔ και κυτταρικής μεμβράνης (Kottgen & Walz, 2005). Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι οι πρωτεΐνες-προσαρμογείς PACS-1 και PACS-2 (*Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein-1, -2*), οι οποίες αναγνωρίζουν ένα όξινο σύμπλεγμα στο καρβοξυτελικό άκρο της PC-2 και κατευθύνουν ανάλογο την τοποθέτησή της. Η δέσμευση στις PACS-1 και PACS-2 εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της PC-2 στη σερίνη 812 (Ser^{812}) από την πρωτεϊνική κινάση της καζείνης 2 (*Casein Kinase 2, CK2*). Η παρεμπόδιση της δέσμευσης με τις πρωτεΐνες-προσαρμογείς με μεταλλαγμένες μορφές της PC-2 καθώς και η αναστολή της CK2, οδηγούν στη μεταφορά της PC-2 στην κυτταρική

μεμβράνη, όπου λειτουργεί ως διάλυλος ιόντων ασβεστίου. Η διαδικασία στόχευσης της PC-2 στην κυτταρική μεμβράνη φαίνεται να είναι μια διαδικασία δύο σταδίων, όπου στο πρώτο στάδιο ελέγχεται από την PACS-2 στο ΕΔ και στο δεύτερο στάδιο από την PACS-1 στο σύστημα Golgi (Kottgen & Walz, 2005; Kottgen et al., 2005; Crump et al., 2001). Η κυτταρική κατανομή της PC-2, όμως, εξαρτάται και από τη φωσφορυλίωσή της στη θέση Ser⁷⁶/Ser⁸⁰ του αμινοτελικού άκρου της από την κινάση συνθετάσης του γλυκογόνου GSK3 (glycogen synthase kinase 3), που παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής σπειραματικής και σωληναριακής μορφολογίας του νεφρού (Streets, Moon, Kane, Obara, & Ong, 2006). Επίσης, μια πρόσθετη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως ρυθμιστής της ενδοκυττάριας στόχευσης της PC-2, η οποία κατευθύνει τη μεταφορά της από το ΕΔ στο σύστημα Golgi είναι η PIGEA-14 (Polycystin-2 Interactor, Golgi- and Endoplasmic reticulum-Associated protein) (Hidaka, Konecke, Osten, & Witzgall, 2004) (Εικόνα 1.10.).



Εικόνα 1.10. Δυναμική ρύθμιση της «κυκλοφορίας» της PC-2 στο κύτταρο από το ΕΔ στην κυτταρική μεμβράνη. Οι φυσικές αλληλεπιδράσεις με την PC-1 (PKD1) και την PIGEA-14 ή η φωσφορυλίωση από την GSK3 στη Ser⁷⁶ διευκολύνουν τη μεταφορά από το ΕΔ στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ η φωσφορυλίωση από την CK2 στη Ser⁸¹² και η δέσμευση στις PACS εγκλωβίζει την PC-2 στο ΕΔ (Tsiokas, Kim, & Ong, 2007)

1.10.4. Λειτουργία της PC-2

Η PC-2 είναι ένα TRP-κανάλι, ως μέλος της υποοικογένειας TRPP της υπερ-οικογένειας των TRP-καναλιών, που μπορεί να ενεργοποιηθεί από ένα ευρύ φάσμα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων ερεθισμάτων υπό τη δράση της φωσφολιπάσης C (phospholipase C, PLC) και να λειτουργεί έτσι ως κυτταρικός αισθητήρας (Clapham,

2003). Η λειτουργία της PC-2 διαφοροποιείται ανάλογα με το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εντοπίζεται κάθε φορά. Έτσι στο ΕΔ βρέθηκε πρωταρχικά ότι η PC-2 λειτουργεί ως ένας διάυλος ιόντων ασβεστίου, ο οποίος μπορεί να ενεργοποιείται αποκλειστικά ως απόκριση στην αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου και όχι της εξωκυττάριας. Φαίνεται επίσης ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *PKD2* στη νεφρική επιθηλιακή κυτταρική σειρά LLC-PK1 ενισχύει την ένταση και τη διάρκεια της παροδικής απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου που επάγεται από τους υποδοχείς GPCR (Koulen et al., 2002). Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώθηκε περαιτέρω, αφού η PC-2 μπορεί να αλληλεπιδρά με την ισομορφή 1 του διαύλου ιόντων ασβεστίου IP₃R1 (inositol trisphosphate receptor 1) ενισχύοντας έτσι τη διάρκεια παρά την ένταση της παροδικής απελευθέρωσης ασβεστίου (Li, Wright, Qian, Germino, & Guggino, 2005). Ως εκ τούτου, τα δεδομένα αυτά, δείχνουν ότι η PC-2 λειτουργεί αποκλειστικά ως ένας διάυλος απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου που επάγεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του.

Στην κυτταρική μεμβράνη φαίνεται ότι η PC-2 από μόνη της δεν έχει την ικανότητα σχηματισμού ενός λειτουργικού διαύλου παρά μόνο με τη συμβολή της PC-1, η συμβολή της οποίας δεν περιορίζεται μόνο στο σχηματισμό του διαύλου, αλλά και διευκολύνοντας τη μεταφορά της PC-2 στην κυτταρική μεμβράνη λειτουργώντας ως πρωτεΐνη-μοριακή συνοδός (chaperone) (Hanaoka et al., 2000). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν μικρές διαφορές ανάμεσα στα ευρήματα των σχετικών μελετών, το κοινό συμπέρασμα ήταν ότι η PC-2 μπορεί να σχηματίσει έναν λειτουργικό διάυλο στην κυτταρική μεμβράνη που ενεργοποιείται διαρκώς από την υπερέκφρασή της και λειτουργεί ως ένας μη εκλεκτικός διάυλος κατιόνων διαθέτοντας μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τα ιόντα ασβεστίου σε σχέση με τα ιόντα καλίου (K⁺) και νατρίου (Na⁺) αλλά με υψηλότερη αγωγιμότητα για τα ιόντα καλίου (Cantiello, 2004; Tsiokas, Kim, & Ong, 2007).

Φαίνεται πως και στους πρωτογενείς κροσσούς είναι απαραίτητη η συνδρομή της PC-1 για την λειτουργία της PC-2 όπου επάγονται μετά από μηχανική διέγερση λόγω ροής υγρού στα νεφρικά σωληνάρια σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω ιόντων ασβεστίου (Nauli et al., 2003). Αντιθέτως άλλες μελέτες δείχνουν ότι η PC-2 μπορεί να λειτουργήσει και ανεξαρτήτως της παρουσίας PC-1 στους πρωτογενείς κροσσούς, κάτι που φαίνεται στην περίπτωση απουσίας της PC-1 στους πρωτογενείς κροσσούς του εμβρυικού κόμβου (Karcher et al., 2005). Η μεταφορά της PC-2 στις μιτωτικές

ατράκτους από την πρωτεΐνη mDia1 (mammalian Diaphanous related formin 1) μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων δείχνει τον πιθανό ρόλο της PC-2 στη σηματοδότηση του ασβεστίου σε διαρούμενα κύτταρα (Rundle, Gorbsky, & Tsiokas, 2004), ενώ η ανίχνευσή της στο κεντρόσωμα υποδηλώνει την πιθανή λειτουργία της ως ένα ρυθμιστή μαζί με άλλους παράγοντες του συστήματος της ενδομαστιγιακικής μεταφοράς (intraflagellar transport, IFT) κατά τον σχηματισμό των πρωτογενών κροσσών (Jurczyk et al., 2004).

Εκτός από την PC-1, μέσω της οποίας η PC-2 δέχεται σήμα για μεταφορά της στη κυτταρική μεμβράνη (Delmas et al., 2004) υπάρχουν και άλλοι παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF). Η διέγερση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR) στην επιθηλιακή κυτταρική σειρά LLC-PK1 είναι ικανή να ενεργοποιήσει την PC-2 (Ma et al., 2005). Ο EGF ενεργοποιεί την PC-2 μέσω της δραστηριότητας της $\gamma 2$ ισομορφής της PLC (PLC- $\gamma 2$) και της κινάσης 1,4,5 τριφωσφο-ινοσιτόλης *PI3K* (phosphoinositide 3-kinase) καθώς και της παράλληλης μείωσης της δραστηριότητας του φωσφολιπιδίου *PIP2* (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) (Ma et al., 2005). Εξάλλου, σε μύες με ομόζυγη απαλοιφή του γονιδίου του *EGFR* (*EGFR*^{-/-}) εμφανίστηκε κυστική διεύρυνση στα αθροιστικά σωληνάκια υποδεικνύοντας τη συμβολή της διαταραγμένη σηματοδότησης του ασβεστίου στη δημιουργία κύστεων (Threadgill et al., 1995).

1.11. Μοντέλα δομής και λειτουργίας συμπλόκου πολυκυστινών

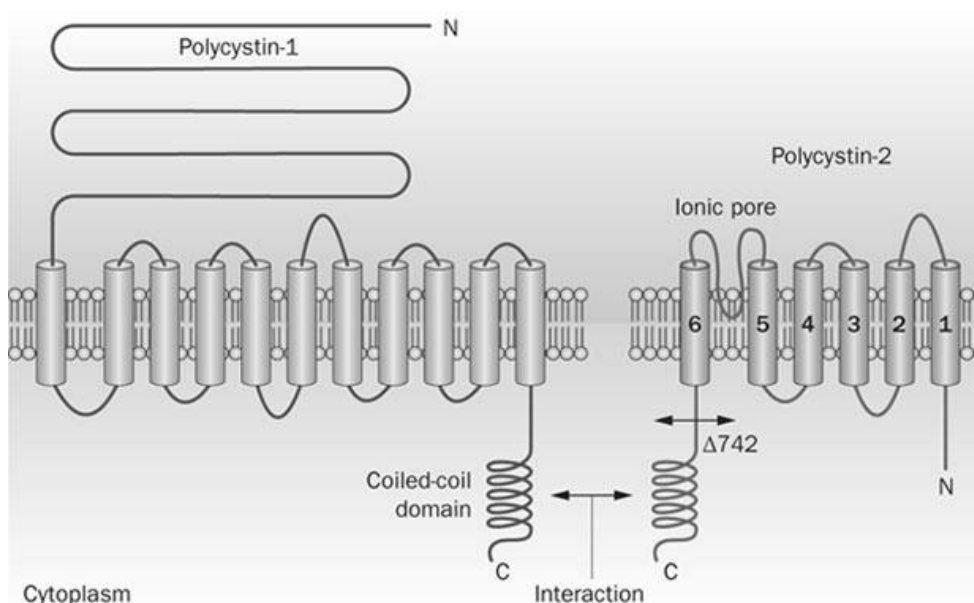
Όπως προαναφέρθηκε οι PC-1 και PC-2 μπορούν μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων στα καρβοξυτελικά άκρα τους να σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα *in vivo* στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έτσι μη εκλεκτικούς διαύλους κατιόντων διαπερατούς για τα ιόντα ασβεστίου. Απουσία της PC-1 φαίνεται ότι η PC-2 παραμένει στο κυτταρόπλασμα ενώ παρουσία της μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη (Newby et al., 2002, Hanaoka et al., 2000). Ο ρόλος της PC-1 δεν περιορίζεται μόνο στη μεταφορά της PC-2 στην κυτταρική μεμβράνη λειτουργώντας ως πρωτεΐνη-μοριακός συνοδός για τη δημιουργία του συμπλόκου PC-1/PC-2, όπως αρχικά πιστευόταν, αλλά παίζει ρόλο στη λειτουργικότητα του συμπλόκου αυτού καθεαυτού, ενεργοποιώντας και σταθεροποιώντας την λειτουργία διαύλου της PC-2. Ο ρόλος αυτό έγινε φανερός από πειράματα με τη χρήση μεταλλαγμένων μορφών των πολυκυστινών. Έτσι μονή σημειακή μετάλλαξη

(Q4215P) στην coiled coil περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της PC-1 κατήργησε το ρυθμιστικό ρόλο της στη λειτουργία διαύλου της PC-2 ενώ η μεταλλαγμένη ελλειπτική μορφή της PC-2 (R742X) στην οποία έχει χαθεί το μεγαλύτερο τμήμα της κυτταροπλασματικής ουράς, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής σύνδεσης με την PC-1, δεν ρυθμίζεται από την coiled coil περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της PC-1 (Xu et al., 2003). Η PC-1 λειτουργεί ως ένας ανεξάρτητος ενεργοποιητής των πρωτεϊνών τύπου $G_{i/o}$ μέσω απελευθέρωσης των υπομονάδων $G\beta\gamma$ ενώ η PC-2 ανταγωνίζεται αυτή την ενεργοποίηση. Η συνέκφραση των PC-2 και PC-1 σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων εμπόδισε αυτή την ανταγωνιστική δράση της PC-2 δείχνοντας ότι πιθανές μεταλλάξεις στις περιοχές αλληλεπίδρασης μπορούν να οδηγήσουν στην ακανόνιστη ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών από την PC-1 (Delmas et al., 2002).

Το συμπλόκο αλληλεπίδρασης των PC-1 και PC-2 στην κυτταρική μεμβράνη όπως αποδείχθηκε δεν συνιστά ετεροδιμερές όπως θεωρήθηκε αρχικά. Βιοχημικές μέθοδοι και κρυσταλλογραφία ακτίνων-X αποκάλυψαν την ύπαρξη σε κύτταρα ενός συμπλόκου το οποίο αποτελείται από ένα ομοτριμερές της PC-2 που συνδέεται με ένα μόριο της PC-1, σχηματίζοντας έτσι ένα ετερομερές με στοιχειομετρία 3:1 (Yu et al., 2009). Συγκεκριμένα η PC-2 σχηματίζει ομοτριμερή καθώς τρία μόρια της αλληλεπιδρούν μέσω ενός μοτίβου σπειροειδούς πηνίου και το ομοτριμερές της συνδέεται με ένα μόριο της PC-1 μέσω του μοτίβου σπειροειδούς πηνίου της στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η παρουσία μεταλλάξεων είναι ικανή να εμποδίζει το σχηματισμό τόσο του ομοτριμερούς της PC-2 όσο και του ετερομερούς συμπλόκου που περιέχει και την PC-1, καθώς και να περιορίζει την έκφραση και των δύο πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου (Yu et al., 2009). Η στοιχειομετρία 3:1 για τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς συμπλόκου PC-1/PC-2 επιβεβεώθηκε πρόσφατα από συνδυασμό υπολογιστικών και πειραματικών δεδομένων (Zhu et al., 2011) (**Εικόνα 1.11.**).

Η PC-2 επίσης επηρεάζει και σταθεροποιεί τη διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της PC-1 που μεταναστεύει στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης πάλι του δικού της καρβοξυτελικού άκρου και ευνοεί τη διάσπαση της PC-1 στην περιοχή GPS, διαδικασίες που είναι ανεξάρτητες από τη λειτουργία της PC-2 ως διάυλος ιόντων ασβεστίου (Bertuccio et al., 2009; Chapin et al., 2010). Άλλωστε, φαίνεται ότι η διαφορές που παρουσιάζονται στο πρότυπο έκφρασης της PC-1 μέσα στο κύτταρο οφείλονται εν μέρει στα επίπεδα έκφρασης της PC-2. Όταν η PC-1 εκφράζεται μόνη

της ανιχνεύεται στην κυτταρική μεμβράνη και στο ΕΔ, ενώ η συν-έκφραση με υψηλά επίπεδα PC-2 οδηγεί σε αποκλειστική έκφραση της PC-1 στο ΕΔ μαζί με την PC-2 (Grimm et al., 2003).



Εικόνα 1.11. Αναπαράσταση του συμπλόκου PC-1/PC-2 στην κυτταρική μεμβράνη. Ο πόρος του διαύλου κατιόντων βρίσκεται μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων 5 και 6 της PC-2. Η PC-2 μπορεί να υπάρχει στην κυτταρική μεμβράνη ως ομοτριμερές, το οποίο μπορεί να αλληλεπιδρά με την PC-1 ώστε να σχηματιστεί ένα ετερομερές με στοιχειομετρία 3:1. Ελλειπτική μορφή της PC-2 ($\Delta 724$) στην οποία απουσιάζει το σήμα για διατήρησή της στο ΕΔ. Η PC-2 και PC-1 αλληλεπιδρούν μέσω των καρβοξυτελικών coiled-coil περιοχών τους (Patel & Honore, 2010).

Τέλος, οι PC-1 και PC-2 εμφανίζουν κοινά ρυθμιστικά στοιχεία στις περιοχές των υποκινητών στα δύο γονίδια που τις κωδικοποιούν. Η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών όσον αφορά στις αλληλουχίες των υποκινητών έδειξε ότι υπάρχουν ομόλογες και καλά συντηρημένες περιοχές με θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και για τα δύο γονίδια. Οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F, EGRF, Ets (E-twenty six), MZF1 (myeloid zinc finger 1), Sp1 (Specificity protein 1), και ZBP-89 (zinc-binding protein-89) αναδείχθηκαν ως δυνητικά κοινοί ρυθμιστές της έκφρασης τόσο του *PKD1* όσο και του *PKD2* (Lantinga-van Leeuwen et al., 2005).

1.11.1. Σύμπλοκο πολυκυστινών στους πρωτογενείς κροσσούς

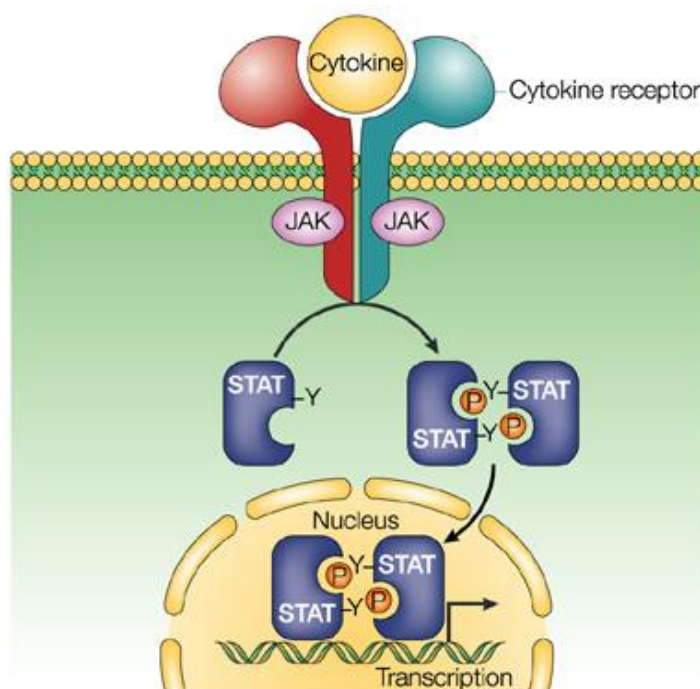
Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το μοντέλο σχηματισμού συμπλόκου από τις δύο πρωτεΐνες στους πρωτογενείς κροσσούς, έναν κυτταρικό σχηματισμό αποτελούμενο από μικροσωληνίσκους στην επιφάνεια πολλών επιθηλιακών κυττάρων. Τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν μέσω των καρβοξυτελικών τους άκρων ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ως απόκριση σε εξωκυττάρια μηχανικά ερεθίσματα που λαμβάνουν οι κροσσοί από τη ροή υγρού στα νεφρικά σωληνάρια (Nauli et al., 2003) Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η PC-1 λειτουργεί ως αισθητήριο μόριο μηχανικής διέγερσης στους πρωτογενείς κροσσούς των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (Nauli et al., 2008).

1.12. Πολυκυστίνη-1 και το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT

1.12.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT

Το μονοπάτι JAK/ STAT είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο δίκτυο σηματοδότησης που εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα διακριτών κυτταρικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της απόπτωσης, του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της ανάπτυξης. Οι JAKs είναι κυτοσολικές κινάσες τυροσίνης οι οποίες σχετίζονται με την ενδοκυτταρική περιοχή μεμβρανικών υποδοχέων, των οποίων η λειτουργία είναι να μετάγουν σήματα από εξωκυττάριους συνδέτες όπως κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες στον πυρήνα προκειμένου να ενεργοποιήσουν την κατάλληλη κυτταρική απόκριση (O'Shea et al., 2002). Στα θηλαστικά υπάρχουν τέσσερα μέλη της οικογένειας κινασών Janus (JAK): JAK1, JAK2, JAK3 και TYK2 (κινάση της τυροσίνης 2). Οι JAKs ενεργοποιούν τους καθοδικούς τους στόχους, τους Stats (Signal transducers and activators of transcription), μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, με επτά μέλη στα θηλαστικά: STATs 1-4, STAT5A, STAT5B και STAT6 (Leonard & O'Shea 1998). Αν και η οικογένεια των μεταγραφικών αυτών παραγόντων αποτελείται από δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες, είναι λειτουργικώς ετερογενείς (Levy & Daenell, 2002). Οι STATs διαθέτουν μια σειρά από συντηρημένες δομικές περιοχές, η αμινοτελική περιοχή εμπλέκεται σε αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις των STAT και είναι χαλαρά προσδεσμένη με την υπόλοιπη STAT πρωτεΐνη, η coiled coil περιοχή περιέχει συναινετικές θέσεις για πυρηνική μεταφορά, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA δεσμεύεται με συντηρημένες ρυθμιστικές αλληλουχίες υποκινητών των γονιδίων στόχων, η ομολογία src 2 (SH2) περιοχή ελέγχει την πρόσδεση στον υποδοχέα και η

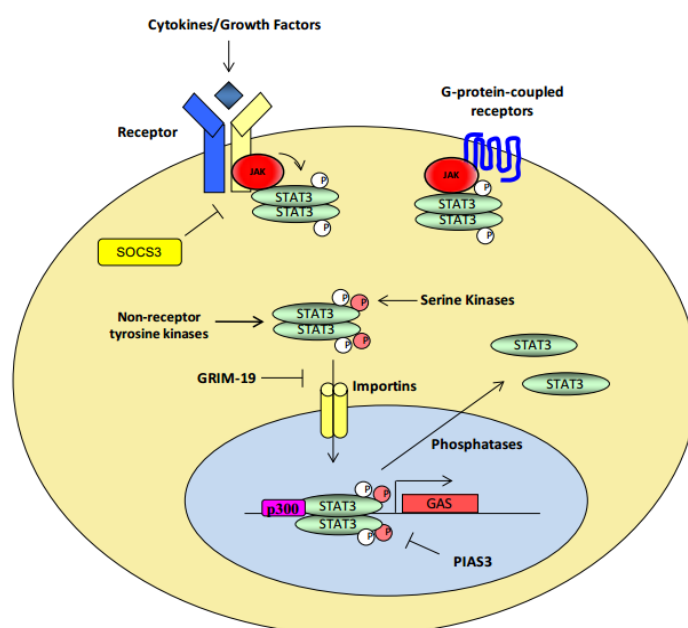
καρβοξυτελική περιοχή περιέχει τις απαραίτητες θέσεις φωσφορυλίωσης για την ενεργοποίηση της STAT.



Εικόνα 1.12 Το JAK/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι. Με την σύνδεση του προσδέτη, οι JAKs που σχετίζονται με τον υποδοχέα κυτοκινών ενεργοποιούνται. Αυτές με την σειρά τους μεσολαβούν στην φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης του υποδοχέα και στρατολογούν τους STATs. Οι ενεργοποιημένοι STATs ελευθερώνονται από τον υποδοχέα, διμερίζονται και μετακινούνται στον πυρήνα και συνδέονται σε μέλη της οικογένειας των GAS ενισχυτών (Shuai and Liu, 2003).

Μια μεγάλη ποικιλία κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων αξιοποιούν το JAK/ STAT δίκτυο για να μετάγουν το σήμα τους στον πυρήνα. Η πρόσδεση του συνδέτη στην εξωκυττάρια περιοχή των υποδοχέων κυτοκίνης που συνδέονται με τον JAK επάγει το διμερισμό του υποδοχέα και την αυτοφωσφορυλίωση του JAK. Επαγωγικά, οι JAKs διαφωσφορυλιώνουν την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα κυτοκίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας θέσης σύνδεσης για την SH2 περιοχή των STAT (Levy & Darnell, 2002). Μόλις, οι STATs δεσμευτούν με την ενδοκυτταρική περιοχή του υποδοχέα, φωσφορυλιώνονται από τις JAKs σε διακριτά κατάλοιπα τυροσίνης, προκαλώντας τις προσδεδεμένες STATs να απελευθερωθούν από τον υποδοχέα και να μετατοπιστούν στον πυρήνα όπου προσδέονται σε ειδικές αλληλουχίες των υποκινητών των γονιδίων στόχων (Levy & Darnell, 2002). Μόλις προσδεθούν στο DNA, το αμινοτελικό άκρο είναι υπεύθυνο

για την στρατολόγηση της RNA Pol II και των συν-παραγόντων, όπως η p300 ακετυλοτρανσφεράση ιστόνης (Hou et al.,2008) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.13 Αναπαράσταση του JAK/ STAT3 δικτύου. Τα μέλη των JAK κινασών τυροσίνης στρατολογούνται στους υποδοχείς κυτοκινών, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ή υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες. Φωσφορυλιώνουν τον STAT3 σε κατάλοιπα τυροσίνης, με αποτέλεσμα την μετατόπισή του προς τον πυρήνα. Επιπλέον, ο STAT3 μπορεί να φωσφορυλιωθεί από κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης και κινάσες σερίνης. Η μεταφορά στον πυρήνα ελέγχεται από τις importins. Στον πυρήνα, ο ενεργός STAT3 δεσμεύεται με αλληλουχίες στόχους και υποβοηθείται από ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης όπως η p300. Η αποφωσφορυλίωση επιτρέπει στον STAT3 να αποδεσμευτεί από το DNA και να επιστρέψει στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση του STAT3 ανταγωνίζεται από την SOCS3 και η πυρηνική μετατόπιση μπλοκάρεται από τη GRIM-19. Στον πυρήνα, η PIAS3 μπλοκάρει την πρόσδεση του STAT3 στο DNA (Barry et al., 2009).

Υπάρχουν περίπου 36 γνωστοί συνδυασμοί υποδοχέων κυτοκινών που ανταποκρίνονται σε 38 κυτοκίνες, οι οποίες χρησιμοποιούν ξεχωριστούς συνδυασμούς JAKs και STATs μορίων (Murray, 2007). Επίσης, το JAK/ STAT δίκτυο μπορεί να διεγερθεί από υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες, όπως ο

υποδοχέας της αγγειοτασίνης II, και αυτό μπορεί να διαμεσολαβείται μέσω των GTPρασών της Rho οικογένεια (Marrero et al., 1995, Pelletier et al., 2003). Ένας άλλος τρόπος ενεργοποίησης του JAK/ STAT μονοπατιού είναι μέσω κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης, όπως η Src, Fer, Abl, Etk και Lck που όλες επάγουν την δραστικότητα του STAT3 (Yu et al., 1995, 1997, Nelson et al., 1998, Lund et al., 1999, Wen et al., 1999, Priel-Halachami et al., 2000).

1.12.2. Σηματοδότηση JAK/STAT στην πολυκυστική νόσο των νεφρών

Η ενεργοποίηση του JAK/ STAT μονοπατιού στην APKD μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κύστεων. Οι Talbot et al., παρατήρησαν ότι ο STAT3 είναι έντονα ενεργοποιημένος μετά από τη φωσφορυλίωση τυροσίνης σε κύτταρα που επενδύουν τις κύστες σε ανθρώπινα νεφρά με APKD και σε τέσσερα διαφορετικά PKD μοντέλα μυών (Talbot et al., 2011). Δύο άλλα εργαστήρια ανέφεραν επίσης, ισχυρή ενεργοποίηση του STAT3 σε δύο ανεξάρτητα Pkd1 μοντέλα μυών (Leonhard et al., 2011, Takakura et al., 2011). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι οι προσπάθειες για την αναστολή του STAT3 σε μοντέλα μυών PKD έχουν οδηγήσει σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Η αγωγή Pkd1 μυών με υψηλές δόσεις της φυσικής ένωσης κουρκουμίνη οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης της νεφρικής κύστης (Leonhard et al., 2011). Η κουρκουμίνη έχει ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα μοριακών στόχων, συμπεριλαμβανομένων των κινασών σερίνης/ θρεονίνης (συμπεριλαμβανομένων των mTOR), κινασών τυροσίνης, αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων κυτοκινών, φλεγμονωδών ενζύμων και αρκετών μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου τον STAT3 (Kunnumakkara et al., 2008). Η ευεργετική δράση της κουρκουμίνης που παρατηρήθηκε σε Pkd1 μύες μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην αναστολή της STAT3. Επίσης, η κουρκουμίνη πρόσφατα βρέθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη κύστεων σε ένα *in vitro* σύστημα καλλιέργειας κυττάρων και σε καλλιέργεια εμβρυακών νεφρών αλλά δεν διερευνήθηκε κάθε πιθανός ρόλος του STAT3 (Gao et al., 2011). Μια άλλη ομάδα χαρακτήρισε την αντιπαρασιτική ένωση πυριμεθαμίνη ως νέο αναστολέα του STAT3 και έδειξε ότι αναστέλλει τη νεφρική δραστικότητα του STAT3 και την ανάπτυξη νεφρικών κύστεων σε ένα Pkd1 μοντέλο μυός (Takakura et al., 2011). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας έναν άλλο αναστολέα του STAT3, S3I-201 (Takakura et al., 2011). Παρόλο που η ειδικότητα αυτών των ενώσεων έναντι του STAT3 είναι είτε χαμηλή ή όχι καλά εδραιωμένη, συνολικά αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι ο STAT3

μπορεί να είναι ένας εξαιρετικά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία της PKD.

1.12.3. Πολυκυστίνη-1 και JAK/STAT

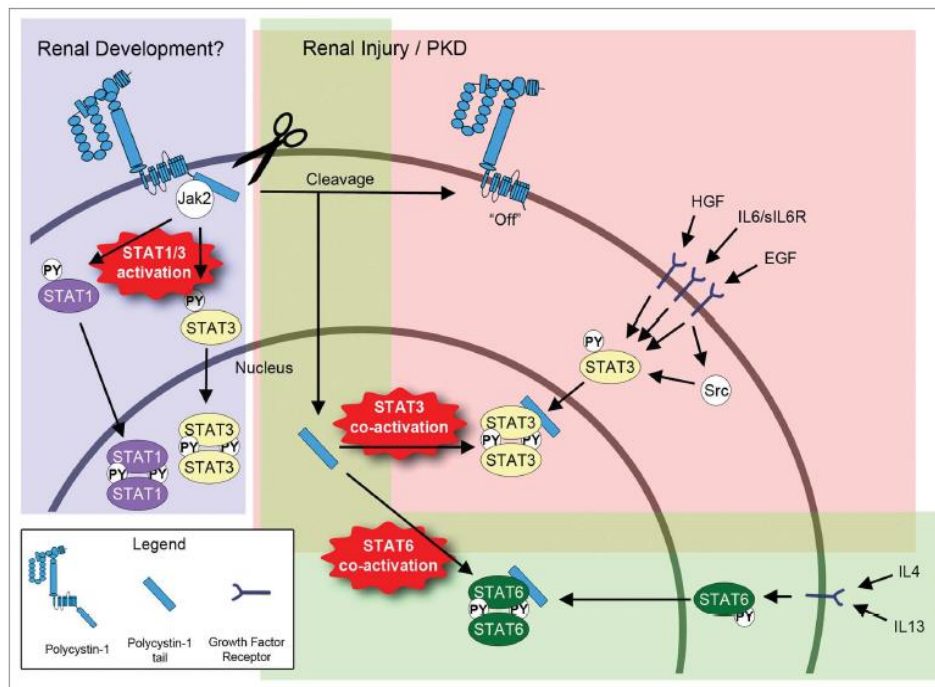
Το εργαστήριο του Gregory Germino παρατήρησε για πρώτη φορά ότι η PC-1 μπορεί να ελέγχει τη δραστηριότητα του STAT (Bhunia et al., 2002). Οι ανωτέρω συγγραφείς έδειξαν ότι η υπερέκφραση της PC-1 προκαλεί ενεργοποίηση του STAT1 (μέσω φωσφορυλίωσης στις θέσεις Ser727 και Tyr701) που οδηγεί στην ενεργοποίηση του αναστολέα της κινάσης εξαρτώμενων από την κυκλίνη, p21^{WAF1}, ο οποίος επάγει την απόπτωση καθώς και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Η PC-1 βρέθηκε επίσης να δεσμεύει τη JAK2 γεγονός που υποδηλώνει ότι η PC-1-μεσολαβούμενη ρύθμιση της δραστηριότητας της JAK2 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της STAT1. Τέλος, PC-1-null έμβρυα μύος στην E15.5 στερούνταν σχεδόν ολοκληρωτικά φωσφορυλιωμένης STAT1 σε θέση τυροσίνης και έκφρασης p21^{WAF1} υποδηλώνοντας ότι η PC-1 είναι ο κύριος ρυθμιστής της STAT1 / p21^{WAF1} σηματοδότησης σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο σε ολόκληρο έμβρυο. Ο STAT3 βρέθηκε επίσης, να ενεργοποιείται από την υπερέκφραση της PC-1 αν και σε μικρότερο βαθμό, και για αυτό δεν ερευνήθηκε περαιτέρω.

Ακολούθως, αποκαλύφθηκε ότι η PC-1 μπορεί επίσης να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της STAT6, αν και ο ρυθμιστικός μηχανισμός διέφερε σημαντικά από τη ρύθμιση των STAT1 και 3. Διαπιστώθηκε ότι η καρβοξυτελική κυτταροπλασματική ουρά της ενσωματωμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης PC-1 απελευθερώνεται από τη μεμβράνη με πρωτεολυτική διάσπαση με αποτέλεσμα τα καρβοξυτελικά θραύσματα, που υποβάλλονται σε πυρηνική μετατόπιση, να αλληλεπιδρούν με το STAT6 και τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή P100 και να συν-ενεργοποιούν την έκφραση των STAT6 εξαρτώμενων γονιδίων (Low et al., 2006). Αντίθετα, η PC-1 που είναι αγκυροβολημένη στη μεμβράνη ανέστειλε την δραστηριότητα του STAT6 (Low et al., 2006). Ο STAT6 βρέθηκε ότι μετατοπίζεται μεταξύ των πρωτογενών κροσσών και τον πυρήνα, ανάλογα τη ροή στην κορυφαία περιοχή (Low et al., 2006). Μαζί με την ανακάλυψη ότι η διάσπαση της ουράς της PC-1 ρυθμίζεται από τη ροή (Chauvet et al., 2004), αυτά τα αποτελέσματα πρότειναν επίσης, ότι η PC-1-μεσολαβούμενη ρύθμιση της δραστηριότητας της STAT6 παίζει ένα ρόλο στην αντίληψη αλλαγών στη ροή του αυλού και επηρεάζει τις αντίστοιχες μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση (Low et al., 2006). Ακολούθως, αποδείχθηκε ότι ο

STAT6 ενεργοποιείται με παρεκκλίνοντα τρόπο στα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν την κύστη, είναι μέρος μιας θετικής ανάδρασης με την ιντερλευκίνη 13 και τον υποδοχέα της IL13, και ότι η αναστολή της STAT6 οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης νεφρικών κύστεων σε ένα PKD μοντέλο μύος (Olsan et al., 2011). Μία σημαντική διαφορά από μηχανιστική άποψη σε σχέση με τους STAT1/ 3 είναι ότι η αγκυροβολημένη στη μεμβράνη PC-1 δεν ήταν σε θέση να "ενεργοποιήσει" τον STAT6 με φωσφορυλίωση σε θέση τυροσίνης αλλά ότι, αντίθετα, η διαλυτή, διασπώμενη ουρά της PC-1 ήταν σε θέση να «συν-ενεργοποιήσει» τον STAT6 που είχε προηγουμένως "ενεργοποιηθεί" από την σηματοδότηση της IL13 κυτοκίνης.

Για να διαλευκανθεί ο μηχανισμός ρύθμισης των STAT από την PC-1 αποτέλεσε αντικείμενο νέας έρευνας η επίπτωση στα STAT1/ 3. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι δυνατό να ανιχνεύει η ενεργοποίηση του STAT1 από την PC-1, ανακαλύφθηκε ένας αξιοσημείωτος διπλός μηχανισμός της ρύθμισης του STAT3 (Talbot et al., 2011) (Εικόνα 1.14). Η PC-1 που είναι αγκυροβολημένη στη μεμβράνη πράγματι προκάλεσε ενεργοποίηση της STAT3 μέσω της JAK2 με φωσφορυλίωση σε θέση τυροσίνης, και το πλησίον της μεμβράνης μέρος της κυτταροπλασματικής ουράς της PC-1 ταυτοποιήθηκε ως θέση πρόσδεσης της JAK2. Τα νεφρά των ADPKD ασθενών συσσωρεύουν δύο θραύσματα της κυτταροπλασματικής ουράς της PC-1 (~ 15 kDa και ~ 30 kDa) (Talbot et al., 2011). Η απομάκρυνση των 15 ή 30 kDa θραυσμάτων από την αγκυροβολημένη στη μεμβράνη PC-1 περιορίζει την ικανότητά της να ενεργοποιεί τον STAT3, υποδηλώνοντας ότι τα εν λόγω συμβάντα διάσπασης εμπλέκονται στην υπορύθμιση της PC-1-επαγόμενης STAT3 σηματοδότησης. Ωστόσο, παραδόξως, το 30 kDa προϊόν διάσπασης της PC-1 ουράς ήταν σε θέση να συν-ενεργοποιήσει τόσο τον STAT3 όσο και τον STAT1 που είχαν φωσφορυλιωθεί σε θέσεις τυροσίνης από τη σηματοδότηση κυτοκίνης (Talbot et al., 2011). Αυτό έδειξε ότι η PC-1 μπορεί να ρυθμίσει τους STATs σε δύο επίπεδα: Πρώτον, η αγκυροβολημένη στη μεμβράνη, πλήρους μήκους PC-1 μπορεί να δράσει παρόμοια με έναν ενεργοποιημένο υποδοχέα αυξητικών παραγόντων και ενεργοποιεί τον STAT1 και τον STAT3 με JAK2-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση τυροσίνης. Δεύτερον, μετά τη διάσπαση της PC-1 -π.χ., κατά τη διάρκεια νεφρικής βλάβης- η κυτταροπλασματική της ουρά μπορεί να συν-ενεργοποιήσει είτε τον STAT1, είτε τον STAT3 ή τον STAT6 ανάλογα ποιους από αυτούς τους STATs έχει ήδη ενεργοποιηθεί από συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες. Ως εκ τούτου, η διασπασμένη PC-1 δεν μπορεί από μόνη της να ενεργοποιήσει τη STAT

σηματοδότηση αλλά μπορεί να ενισχύσει τη STAT σηματοδότηση σε απόκριση του περιβάλλοντος αυξητικών παραγόντων του κυττάρου που μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις συμπεριλαμβανομένης του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (Talbot et al., 2011).



Εικόνα 1.14 Ρύθμιση της σηματοδότησης STAT από την PC-1. Κατά τη διάρκεια της νεφρικής ανάπτυξης, η αγκυροβολημένη στη μεμβράνη, πλήρους μήκους PC-1 μπορεί να προκαλέσει άμεση ενεργοποίηση των STAT1 και STAT3 μέσω της JAK2 που σχετίζεται με την C-τελική, κυτταροπλασματική ουρά της. Άμεση ενεργοποίηση των STAT1/ 3 από την PC-1 θα ήταν μια ενδογενής οδός, ανεξάρτητη από αυξητικούς παράγοντες. Αυτή τη στιγμή είναι άγνωστο το πώς ρυθμίζεται η άμεση ενεργοποίηση των STAT1/ 3 από την πλήρους μήκους PC-1. Είναι πιθανό ένας - ακόμη αγνώστος- εξωκυττάριος συνδέτης να μπορεί να προκαλέσει την STAT1/ 3 ενεργοποίηση, ή η εξωκυτταρική περιοχή της PC-1 να εμπλέκεται σε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις. Είναι επίσης πιθανό να μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα αυτή η ροή του υγρού. Κατά τη διάρκεια νεφρικής βλάβης και στη PKD, η PC-1 φαίνεται να υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση που απελευθερώνει την κυτταροπλασματική ουρά της στο κυτταρόπλασμα. Με αποτέλεσμα, το υπόλοιπο τμήμα της PC-1 που είναι αγκυροβολημένο στη μεμβράνη αδυνατεί να ενεργοποιήσει τους STAT1/ 3. Ωστόσο, η διαλυτή ουρά της PC-1 μπορεί τώρα μετατοπίζεται στον πυρήνα και συν-

ενεργοποιεί τον STAT3 που έχει ενεργοποιηθεί από την προηγούμενη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων. Επίσης, η διασπασμένη PC-1 ουρά μπορεί να συν-ενεργοποιεί τον STAT6 και τον STAT1 (δεν φαίνεται εδώ). Ως εκ τούτου, η διασπασμένη PC-1 ουρά θα έχει την ικανότητα να ενισχύει διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις ανάλογα με το περιβάλλον αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών (Weimbs et al., 2013).

Ο ρόλος της PC-2 στην STAT σηματοδότηση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Η PC-2 αποδείχθηκε αναγκαία για την PC-1-επαγόμενη ενεργοποίηση του JAK2/STAT1 και της μετέπειτα p21 έκρασης και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου (Bhunia et al., 2002). Επίσης, η PC-2 έχει φανεί ότι αναστέλλει άμεσα τον πολλαπλασιασμό από την αλληλεπίδραση με τον αναστολέα της p21, Id2, ωστόσο οποιαδήποτε εμπλοκή του STAT1 δεν έχει διερευνηθεί (Li et al., 2005). Μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι η PC-2 επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό με ένα STAT1/ p21-ανεξάρτητο τρόπο (Felekakis et al., 2008). Συμπερασματικά, ενώ είναι σαφές ότι η PC-1 ενεργοποιεί τους STAT1 και STAT3, η συμβολή ή/ και η ανεξάρτητη λειτουργία της PC-2 σε αυτή τη διαδικασία δεν είναι ακόμη σαφής.

1.12.4. Το μονοπάτι JAK/STAT στην οστική ανάπτυξη

Ο ρόλος του μονοπατιού στην βιολογία των οστεοβλαστών δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως, ωστόσο υπάρχουν αυξανόμενες μελέτες που προτείνουν τη συμμετοχή του μονοπατιού στη ρύθμιση την οστικής ομοιόστασης και της οστικής απόκρισης σε μηχανικά ερεθίσματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι αρκετές κυτοκίνες που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/ STAT επηρεάζουν τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Μελέτες με JAK, STAT knockout ζώα προτείνουν ότι το JAK/ STAT σηματοδοτικό μονοπάτι είναι σημαντικό για την σκελετική ανάπτυξη. Παρόλα αυτά δεν είναι όλα τα JAKs και STATs ισότιμα απαραίτητα στη βιολογία των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών.

Οι JAK1, JAK2, και Tyk2 εκφράζονται στα οστικά κύτταρα και εμπλέκονται στο σχηματισμό των οστών. Για παράδειγμα, η OSM είναι σε θέση να επάγει μια ταχεία φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης των JAK1, JAK2, και Tyk2 σε οστεοβλάστες που προέρχονται από κρανίο μυός (Levy et al., 1996). Μεταξύ αυτών των 3 μελών της οικογένειας JAK, η Tyk2 δεν σχετίζεται άμεσα με αναπτυξιακές

ανωμαλίες στο σκελετό, επειδή μύες με έλλειψη του γονιδίου της *Tyk2* είναι βιώσιμοι και γόνιμοι και δεν παρουσιάζουν εμφανή φαινότυπο (Shimoda et al., 2000, Karaghiosoff et al., 2000). Οι JAK1 knockout μύες πεθαίνουν κατά τον τοκετό, αλλά δείχνουν μια σημαντικά μικρή μάζα σώματος σε σύγκριση με τα αδέρφια τους (Rodig et al., 1998). Νεογέννητοι μύες με JAK1-ανεπαρκή ζυγίζουν 40% λιγότερο από τα ετερόζυγα ή φυσικού τύπου αδέρφια τους. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν καθυστερήσεις στην ανάπτυξη των οστών, χωρίς JAK1 στο έμβρυο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η JAK1 είναι κρίσιμη για τη σκελετική ανάπτυξη. Οι JAK2 knockout μύες πεθαίνουν από αναιμία την εμβρυϊκή ημέρα 12.5 πριν αρχίσει ο σχηματισμός των οστών (Parganas et al., 1998, Neubauer et al., 1998). Μελέτη σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες μυών που προέρχονται από JAK2 null έμβρυα και ινοβλάστες φυσικού τύπου εμβρύων από την ίδια γέννα αποδεικνύει ότι η έλλειψη της JAK2 αποσυνδέει τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα αυξητικής ορμόνης από τους καθοδικούς τελεστές της, STAT 5A και 5B (Parganas et al., 1998, Neubauer et al., 1998). Αυτό υπονοεί ότι η JAK2 μπορεί να εμπλέκεται και στην οστική ανάπτυξη, επειδή η αυξητική ορμόνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών. Δυστυχώς, δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής ιστολογική εξέταση σε JAK1 ή JAK2 ανεπάρκειες οστικών ιστών. Ο υποκείμενος μηχανισμός για το πώς οι JAK1 και JAK2 επηρεάζουν σηματοδοτικά μονοπάτια στους οστεοβλάστες, είναι ακόμα άγνωστος.

Όλα τα γονίδια και οι πρωτεΐνες STAT έχουν εντοπιστεί σε ιστούς των οστών. Μεταξύ των επτά STATs, μόνο οι STAT5A και STAT5b knockout μύες δείχνουν εμφανώς ελαττωματική οστική ανάπτυξη (Liu et al., 1997, Teglund et al., 1998, Udy et al., 1997). Οι STAT5A και STAT5b έχουν πλειοτροπικές λειτουργίες. Βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν υπογραμμίσει το σημαντικό ρόλο που παίζουν οι STAT5A και STAT5b κατευθύνοντας βιολογική απόκριση στις IL-3, μονής αλυσίδας (π.χ., αυξητικής ορμόνης) και γc (IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, και, ενδεχομένως, IL-21) οικογένειες υποδοχέων (Schindler et al., 2007). Τα αρσενικά και τα θηλυκά STAT5A/5B διπλά μεταλλαγμένοι μύες ζυγίστηκαν 30-40% και 20-30% λιγότερο από τα φυσικού τύπου αδέρφια τους (Teglund et al., 1998). Φυσιολογική μάζα σώματος παρατηρείται σε μύες που φέρουν STAT5A μετάλλαξη, ενώ οι αρσενικοί STAT5B μύες είναι σταθερά 20-30% μικρότεροι σε σχέση με τα φυσικού τύπου αδέρφια τους. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν καθυστερημένη οστική ανάπτυξη σε STAT5A/5B μεταλλαγμένους μύες. Η καθυστερημένη σκελετική ανάπτυξη που προκαλείται από

τη STAT5A/ 5B μετάλλαξη είναι συνεπής με τη λειτουργία του IGF-1 στα οστά. Τα επίπεδα του IGF-1 ήταν σημαντικά μειωμένα σε STAT5A/ B μεταλλαγμένους αρσενικούς σε σχέση με τους φυσικού τύπου και τους θηλυκούς μύες (Teglund et al., 1998). Τα επίπεδα IGF-1 στον ορό ήταν σημαντικά μειωμένα σε αρσενικούς STAT5b μεταλλαγμένους μύες, αλλά όχι στους θηλυκούς, ενώ τα επίπεδα ήταν φυσιολογικά τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς μεταλλαγμένους STAT5A μύες.

Οι STAT1 και STAT3 επηρεάζουν τη σκελετική ανάπτυξη με διαφορετικούς τρόπους. Τα γονίδια στόχοι του STAT1 φαίνεται να προάγουν τη φλεγμονή και να ανταγωνίζονται τον πολλαπλασιασμό. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη προ-πολλαπλασιαστική και αντι-φλεγμονώδη δράση που σχετίζονται με το STAT3. Έτσι, η ικανότητα ποικίλων κυτοκινών να ενεργοποιούν τόσο το STAT1 όσο και το STAT3 μπορεί να αντανακλούν μια προσπάθεια να επιτευχθεί μια πιο ισορροπημένη απόκριση. Τα STAT1 και STAT3 έχουν αντίθετη επίδραση στον οστίτη ιστό.

Αν και οι STAT1^{-/-} μύες είναι δυσδιάκριτοι σε σχέση με τους φυσιολογικούς, (Meraz et al., 1996, Durbin et al., 1996) η αδρανοποίηση του STAT1 οδηγεί πράγματι σε ένα φαινότυπο με υψηλότερη οστική μάζα (Kim et al., 2003). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την ανασταλτική επίδραση της STAT1 στη μεταγραφή του Runx2 στους οστεοβλάστες. Όπως έχει ήδη ειπωθεί ο Runx2 είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Σε συμφωνία με την υψηλότερη οστική μάζα σε STAT1-ανεπαρκείς μύες, η αδρανοποίηση του STAT1 μπορεί να επιταχύνει την επιδιόρθωση κατάγματος (Tajima et al., 2010). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο STAT1 ρυθμίζει αρνητικά τον σχηματισμό οστού in vivo.

Ο STAT3 είναι απαραίτητος στην πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, γιατί στοχευμένη διακοπή του STAT3 γονιδίου σε μύες οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα την 6.5-7.5 μέρα (Takeda et al., 1997). Επιλεκτική αδρανοποίηση του STAT3 σε οστεοβλάστες προκαλεί μικρότερη μάζα σώματος και χαμηλότερη οστική μάζα λόγω της αναστολής του σχηματισμού των οστών, γεγονός που υποδηλώνει ένα σημαντικό ρόλο του STAT3 στην ανάπτυξη των οστών. Περίπου το 10% αυτών των μυών έχουν σοβαρή παραμόρφωση της σπονδυλικής στήλης. Επίσης, η σηματοδότηση του STAT3 είναι επίσης κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των οστών.

Οι STAT2, STAT4 και STAT6 μπορεί να μην παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετού, επειδή STAT2, Stat4 και STAT6 null μύες είναι βιώσιμοι και γόνιμοι και δεν δείχνουν εμφανείς φαινοτυπικές ανωμαλίες (Kalpan et al., 1996, 1996, Park et al., 2000, Takeda et al., 1996, Thierfelder et al., 1996, Shimida et al., 1996). Αλλά,

αυτές οι τρεις STATs μπορεί να εμπλέκονται στον μεταβολισμό των οστών. Για παράδειγμα, μπορεί ο STAT2 να επηρεάζει τους οστεοβλάστες έμμεσα μέσω του STAT1, εφόσον ετεροδιμερίζεται με το STAT1 και το βασικό επίπεδο του STAT1 εξαρτάται από το STAT2 (Park et al., 2000). Ο STAT4 είναι απαραίτητος για τις IL-12 μεσολαβούμενες αποκρίσεις (Kalpan et al., 1996). Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε την ανασταλτική δράση της IL-12 στην RANKL επαγόμενη οστεοκλαστογένεση (Nagata et al., 2003). Ο STAT6 συνδέεται με την ανασταλτική επίδραση των IL-4 και IL-13 στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και στην παραγωγή οστεοπροτεγερίνης (Yamada et al., 2007). Ωστόσο, οι STAT4 και STAT6 μπορεί να παίζουν πιο κρίσιμο ρόλο στην αρθρίτιδα, σε σχέση με τις άλλες STATs, επειδή οι STAT4 και STAT6 επάγονται από μακροφάγα σε αρθρικούς ιστούς ασθενών με αρθρίτιδα, (Walker et al., 2006) γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην Th1 διαμεσολαβούμενη φλεγμονή στην αρθρίτιδα.

Υπάρχουν λοιπόν αρκετές μελέτες για την σηματοδότηση μέσω JAK/STAT μονοπατιού σε κύτταρα οστεοβλαστών ή σε κύτταρα ομοιάζοντα με οστεοβλάστες αλλά δεν υπάρχουν μελέτες που να μελετούν το συγκεκριμένο μονοπάτι μετά από μηχανοδιέγερση σε οστεοβλάστες ή σε κύτταρα ομοιάζοντα με οστεοβλάστες.

2. ΣΚΟΠΟΣ

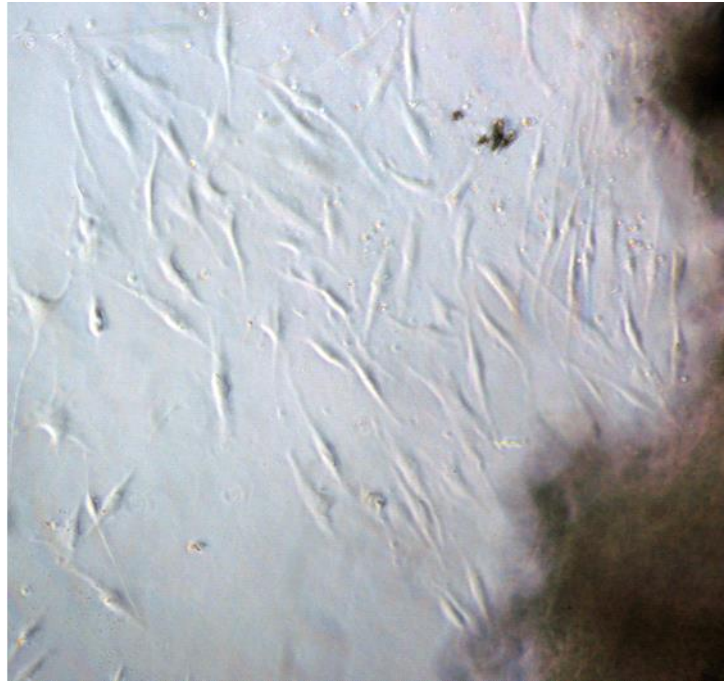
Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βιολογικής σημασίας της μηχανοευαίσθητης πρωτεΐνης, Πολυκυστίνη-1 (Polycystins, PC-1) σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα, συσχετίζοντας τον πιθανό ρόλο της στη μηχανική φόρτιση με τη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/ STAT.

Για το σκοπό αυτό αρχικά μελετήθηκε, με τεχνικές ανοσοφθορισμού και ανοσοσύτωσης Western, ο εντοπισμός της PC-1 αλλά και της PC-2 σε ανθρώπινους οστεοβλάστες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνικών μορίων PC-1, PC-2 και PC-1, pJAK2 με ειδικού τύπου τεχνικές ανοσοφθορισμού. Ακολούθως, μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS) η πιθανή ενεργοποίηση μέσω της PC-1, του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/ STAT μετά από μηχανική διάταση ανθρώπινων οστεοβλαστικών κυττάρων. Παράλληλα, διερευνήθηκε με τη μέθοδο TransAM η πιθανή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 μετά από μηχανική τάση σε hPDL κύτταρα. Τέλος, μελετήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής, η πιθανή ρύθμιση της έκφρασης των οστεοβλαστοειδικών γονιδίων *runx2* και *osteocalcin* μέσω της PC-1 μετά από μηχανική διέγερση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Πειραματικό μοντέλο για την μελέτη της μηχανοδιέγερσης των οστικών κυττάρων αποτελούν τα ανθρώπινα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (Human PerioDontal Ligament cells- hPDL). Τα PDL κύτταρα απομονώνονται από δότες ηλικίας μεταξύ 20 και 30 ετών οι οποίοι υπόκεινται σε ορθοδοντική θεραπεία. Η απομόνωση επιτεύχθηκε με απόξεση των υπολειμμάτων του περιοδοντικού ιστού και τοποθέτηση τους σε τρυβλία με την προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού Dulbecco's Modified Eagle στο οποίο προστέθηκε ορός FBS (fetal bovine serum) (10%), μη βασικά αμινοξέα και αντιβιοτικά (1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Η καλλιέργεια των κυττάρων συνεχίστηκε στο ίδιο θρεπτικό υλικό με την ίδια σύνθεση. Μετά την πάροδο περίπου δυο εβδομάδων και ενδιάμεσες αλλαγές σε θρεπτικό υλικό παρατηρήθηκε ανάπτυξη ινοβλαστών περιοδοντικής μεμβράνης (PDL) στην περιφέρεια των υπολειμμάτων του περιοδοντικού ιστού. Οι ινοβλάστες αφέθησαν να αναπτυχθούν μέχρι πληρότητας των τρυβλίων και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά διάλυμα τρυψίνης/EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ) ώστε να αποκολληθούν, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επανατοποθετήθηκαν σε φλάσκες των 25cm² που περιείχαν το ίδιο θρεπτικό υλικό μέχρι να φτάσουν ξανά σε πληρότητα. Αφού τα κύτταρα έφτασαν σε πληρότητα στις φλάσκες των 25cm², μεταφέρθηκαν σε φλάσκες των 75cm² όπως πριν (τρυψίνη/ EDTA και φυγοκέντρηση). Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε κατάλληλο θάλαμο στείρων συνθηκών (θάλαμος νηματικής ροής) και με βάση τους προβλεπόμενους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας. Τα κύτταρα συντηρούνται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37°C, υγρασίας 95% και 5% CO₂, παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) εμπλουτισμένου με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS, Fetal Bovine Serum), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Μετανάστευση κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου.

3.1.1. Εφαρμογή μηχανικής τάσης στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου

Τα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου αποκολλούνταν από τις επιφάνειες των φλασκών όπου καλλιεργούνταν με χρήση διαλύματος τρυψίνης/EDTA και καλλιεργούνταν ξανά σε ειδικά καλλιεργητικά τρυβλία Petriperm™ (Bachofer Germany), η βάση των οποίων αποτελείται από μια ελαστική, υδρόφιλη και αεροδιαπερατή μεμβράνη πολυτετραφθοροαιθυλενίου, η οποία υπόκειται ομοιόμορφη διάταση όταν τοποθετηθεί επάνω σε ειδική σφαιροειδή κυρτή επιφάνεια. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα μεταξύ του 4ου και του 6ου σταδίου ζωής (passage) αφού είχε πρώτα επιβεβαιωθεί ο οστεοβλαστικός τους χαρακτήρας.

Στα ειδικά τρυβλία Petriperm™ των 50mm διανεμήθηκαν περίπου 4×10^5 κύτταρα και καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε πληρότητα 100%. Ένα εικοσιτετράωρο πριν την εφαρμογή της μηχανικής τάσης το θρεπτικό αλλάχθηκε σε Dulbecco's modified Eagle το οποίο όμως περιείχε 0.1% FBS ώστε τα κύτταρα να παραμείνουν αδρανή. Μετά από 24 ώρες οι καλλιέργειες των hPDL κυττάρων υπέστησαν μια διαρκή τάση (stretching) με τη χρήση ειδικής συσκευής για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

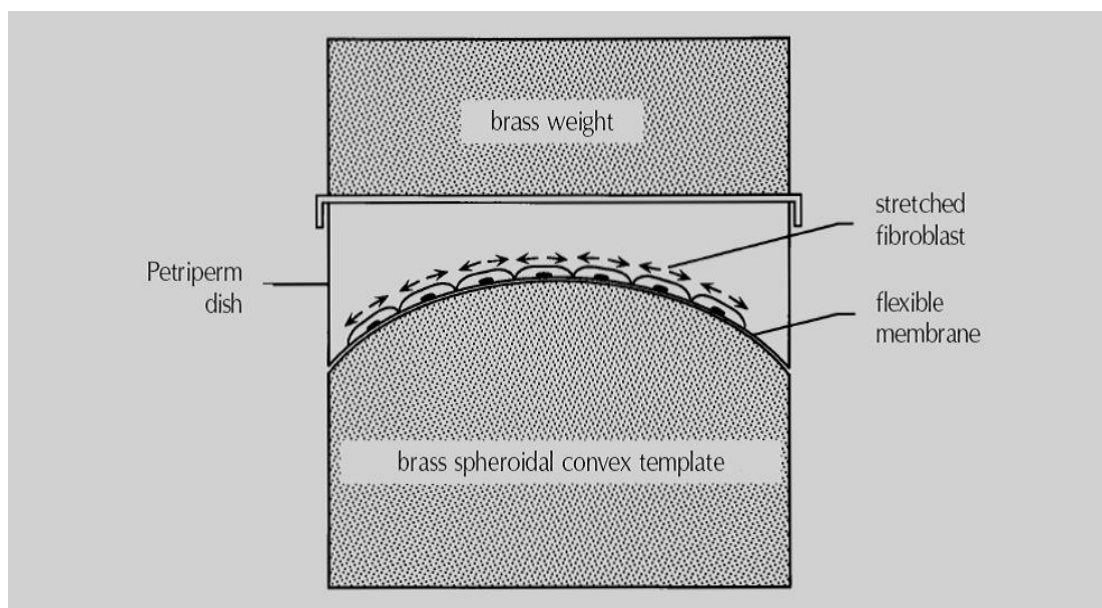
Πιο συγκεκριμένα, η βάση των ειδικών αυτών τρυβλίων αποτελείται από μια ελαστική, υδρόφιλη και διαπερατή από αέρια μεμβράνη πολυτετραφθοροαιθυλενίου, η οποία μπορεί να υποστεί ομοιόμορφη τάση όταν τοποθετείται επάνω σε μια σφαιροειδή κυρτή επιφάνεια. Η τάση στην μεμβράνη και στα κύτταρα που είναι

προσκολλημένα σε αυτήν προκαλείται με την χρήση ενός χαλύβδινου βαριδίου το οποίο τοποθετείται στην κορυφή του τρυβλίου (Εικόνα 3.2).

Το ποσοστό της εφαρμοσμένης τάσης ποικίλει ανάλογα με την κυρτότητα της επιφάνειας και μπορεί να υπολογιστεί σαν ποσοστό τάσης σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο: Αν r είναι η ακτίνα της σφαίρας, d η ακτίνα του σφαιρικού καλύμματος (σταθερή) και h το ύψος του σφαιρικού καλύμματος, τότε $(r - h)^2 + d^2 = r^2$, και τότε $r = h/2 + d^2/2h$ (150).

Ποσοστό της τάσης = [εμβαδό της νέας επιφάνειας – εμβαδό της πρωτότυπης επιφάνειας]/[εμβαδό πρωτότυπης επιφάνειας], ή $(2rh - d^2)/d^2$.

Η φόρμα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας περιλαμβάνει κυρτότητα η οποία μπορεί να παράγει 2.5% αύξηση στο εμβαδό επιφάνειας. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους των 30, 60 λεπτών και 6 ωρών, χρησιμοποιώντας 2 τρυβλία Petriperm για κάθε χρονική περίοδο. Ταυτόχρονα επώαστηκαν hPDL κύτταρα σε κανονικά τρυβλία χωρίς ελαστική μεμβράνη των 50mm τα οποία δεν υπέστησαν τάση (unstretched) σαν μάρτυρες (control) για κάθε μια από τις χρονικές περιόδους. Επίσης, τα κύτταρα επώαστηκαν με αναστολείς, όπως το anti-Ig-PKD1, ένα ανασταλτικό αντίσωμα έναντι της PC-1, τον AG490, έναν γνωστό, ειδικό αναστολέα της JAK2 και το STAT3 Inhibitor VII, έναν γνωστό, ειδικό αναστολέα που αναστέλει την JAK1/JAK2/TYK2/STAT3 ενεργοποίηση,.



Εικόνα 3.2 Μηχανισμός εφαρμογής της μηχανικής τάσης στα κύτταρα PDL.

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (L-γλουταμίνη, 4,5g/L D-γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (εμβρυϊκός βόειος ορός, Gibco)
- Antibiotic (100X) (10000U/ml πενικιλίνη, 10000μg/ml στρεπτομυκίνη, Gibco)
- Trypsin-EDTA (0,5% w/v θρυψίνη και 0,53mM EDTA, Gibco)
- PBS (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ x7H₂O, Gibco)

3.2. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
- Antibiotic (100X) (Gibco)
- PBS (Gibco)
- Trypsin-EDTA (Gibco)
- Αναστολείς πρωτεασών
 - 1mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)
- Διάλυμα RIPA (Cell Signaling TECHNOLOGY)
 - 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA
 - 1mM EGTA
 - 1% NP-40
 - 1% Δεοξυχολικό νάτριο
 - 2.5Mm πυροφωσφορικό νάτριο
 - 1mM β- γλυκεροφωσφορικό
 - 1mM Na₃VO₄
 - 1μg/ml leupeptin

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα hPDL κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται διάλυμα θρυψίνης για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, η θρυψίνη απενεργοποιείται με την προσθήκη ίσης ποσότητας θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS και τα κύτταρα αφού αποκολληθούν φυγοκεντρούνται στις 1000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε 400μl διαλύματος RIPA στο οποίο έχει προστεθεί το μίγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών και αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά. Το κυτταρικό εκχυλίσμα που προκύπτει φυγοκεντρείται στις 14000rpm για 10 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο διατηρείται στους -20°C για άμεση χρήση ή στους -80°C για μακροπρόθεσμη χρήση. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης του κυτταρικού εκχυλίσματος γίνεται με τη βοήθεια της μεθόδου Bradford (Κεφάλαιο 3.3).

3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση (Bradford, 1976) ότι η μέγιστη απορρόφηση του όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει από μήκος κύματος 465nm σε 595nm όταν δεσμεύεται σε πρωτεϊνικά μόρια. Χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ουσία αλβουμίνη από βόειο ορό (Bovine Serum Albumin, BSA) κατασκευάζεται γραμμική καμπύλη αναφοράς αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης σε σχέση με την απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 595nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη και την εξίσωση που προκύπτει από αυτή, μπορούμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του υπό εξέταση δείγματος με βάση την τιμή της απορρόφησης που δίνει στα 595nm, όταν επωαστεί με το διάλυμα της χρωστικής. Για κάθε δείγμα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που υπολογίζεται πολλαπλασιάζεται με την αρχική αραιώση που έγινε σε αυτό.

Υλικά

- Αντιδραστήριο Bradford: Χρωστική G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Quick Start Bradford Dye Reagent 1x, Biorad)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκέντρωση 2mg/ml

Περιγραφή της μεθόδου

Σε σωλήνες τύπου erpendorf όγκου 1,5ml παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης συγκεντρώσεων 0μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 750μg/ml, και 1000μg/ml, 1500μg/ml και 2000μg/ml. Από κάθε ένα από τα διαλύματα αυτά μεταφέρονται 20μl σε νέο erpendorf όπου προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται μέσα σε διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, κατά τη διάρκεια της οποίας το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική παραμένει σταθερό. Αφού πραγματοποιηθεί η πρότυπη καμπύλη, τα πρωτεϊνικά δείγματα αραιώνονται 1:10 (τελικός όγκος 20μl) με δις απιονισμένο νερό και στο διάλυμα αυτό προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford. Ως τυφλό δείγμα για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται διάλυμα RIPA-αναστολέων (Κεφάλαιο 3.3) αραιωμένο (1:10) με δις απιονισμένο νερό τελικού όγκου 20μl και 1ml αντιδραστηρίου Bradford.

3.4. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis-PAGE) χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μιας ουσίας που περιέχει ελεύθερες ρίζες, π.χ. υπερθειικό αμμώνιο (απαρχητής) και ενός καταλύτη, π.χ. TEMED που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Τελικά οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂, αφού αυτό δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να σταματάει η δημιουργία πηκτής.

Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης και την πηκτή διαχωρισμού, οι οποίες έχουν διαφορετικό μέγεθος πόρων, pH και ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να

εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός και σύγκριση της κινητικότητας των πρωτεϊνών.

Με την SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Το SDS συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS. Στα σύμπλοκα αυτά ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός, όλα τα σύμπλοκα αποκτούν αρνητικό φορτίο και η κινητικότητά τους στην πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσου των πόρων της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Συνήθως, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, π.χ. 2-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT, για το διαχωρισμό όλων των υπομονάδων. Γενικά, η μετακίνηση των πρωτεϊνών προς την άνοδο κατά την SDS-PAGE είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου της μοριακής τους μάζας. Με τη χρησιμοποίηση έτσι δεικτών μοριακών βαρών και τον υπολογισμό της σχετικής κινητικότητάς τους στην πηκτή είναι δυνατή η εκτίμηση της μοριακής μάζας μιας άγνωστης πρωτεΐνης.

Υλικά

- Διάλυμα ακρυλαμιδίου-δισακρυλαμιδίου 30%w/v (Biorad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl 1,5M pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης Tris-HCl 0,5M pH 6,8
- N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθανο-1,2-διαμίνη (TEMED) (Sigma)
- Υπερθειικό αμμώνιο (AmmoniumPerSulfate-APS) 0,1g/ml
- Διάλυμα θειοδωδεκυλικού νατρίου (SDS) 10%w/v
- Αποδιατακτικό διάλυμα SDS 5x (150mM Tris, 6% SDS, 0.3% μπλε της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη και 15% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Fermentas)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης :
25mM Tris (Sigma)

192mM γλυκίνη (Sigma)

1% SDS (Sigma)

Περιγραφή της μεθόδου

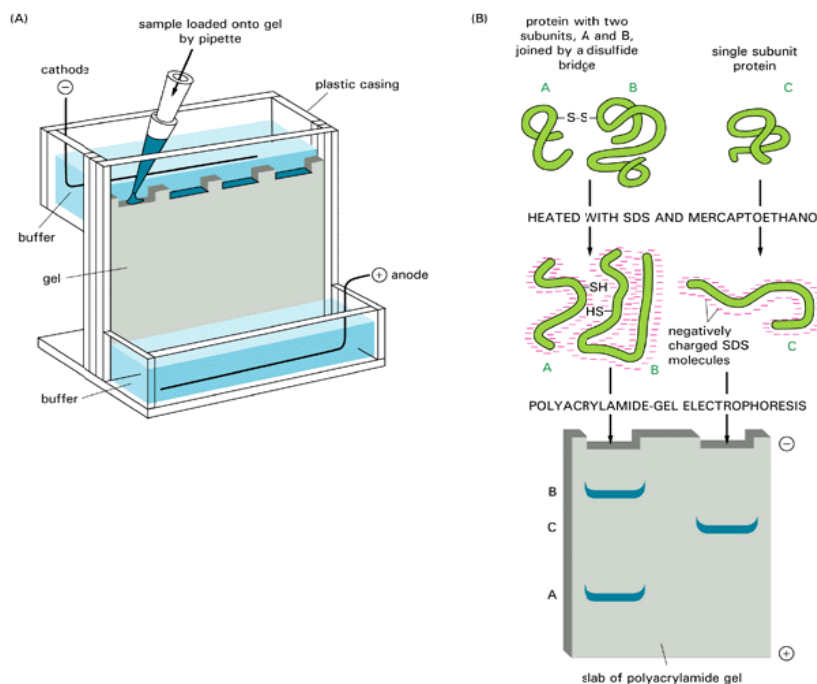
Με βάση τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1) ετοιμάζονται οι πηκτές διαχωρισμού (separating gel, 6% και 10% ακρυλαμίδιο) και επιστοιβαξης (stacking gel, 5% ακρυλαμίδιο) και τοποθετούνται μεταξύ των πλακών σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πάχους 0,75mm. Το πήκτωμα διαχωρισμού ήταν 6% και 10% για την ανίχνευση της PC-1 και της PC-2, αντίστοιχα. Αρχικά προστίθεται η πηκτική διαχωρισμού μέχρι ύψους 0,5cm κάτω από τις εγχοπές της χτένας και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αφού πρώτα καλυφθεί με 1ml ισοπροπανόλη προκειμένου να αποκλειστεί το οξυγόνο που θα εμποδίσει τον πολυμερισμό. Στη συνέχεια αφού πολυμεριστεί η πηκτική διαχωρισμού και απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται η πηκτική επιστοιβαξης και τοποθετείται η πλαστική χτένα που επιτρέπει το σχηματισμό 10 πηγαδιών στην ήδη πολυμερισμένη πηκτική επιστοιβαξης και αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά.

Πίνακας 3.1 Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοιβαξης

	Πηκτική διαχωρισμού 6%	Πηκτική διαχωρισμού 10%	Πηκτική επιστοιβαξης 5%
30% ακρυλαμίδιου- Δισακρυλαμίδιου	2 ml	3,4ml	0,83 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,6ml	2,6ml	-
0,5M Tris pH 6,8	-		2,5ml
ddH ₂ O	5,2ml	3,8ml	1,57ml
10% SDS	100μl	100μl	50μl
TEMED	10μl	10μl	5μl
APS (0,1g/ml)	100μl	100μl	50μl

Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά δείγματα ίσης συγκέντρωσης, όπως έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο Bradford (Κεφάλαιο 3.4), αναμειγνύονται με αναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα SDS σε αναλογία όγκου 5:1 αντίστοιχα. Ακολουθεί θέρμανση

στους 95°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 14000rpm. Τα υπερκείμενα καθώς και ο δείκτης μοριακών βαρών φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που έχει παρασκευασθεί και ηλεκτροφορούνται στα 90-130 Volt.



Εικόνα 3.3 Απεικόνιση της μεθόδου Western Blot.

3.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Αρχή της μεθόδου

Τα μετουσιωμένα πολυπεπίδια, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά με SDS-PAGE μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Στο αποτύπωμα μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των πρωτεϊνών (αντιγόνων) έμμεσα. Αρχικά χρησιμοποιείται ένα μη-σημασμένο αντίσωμα ειδικό έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο, το οποίο είναι συζευγμένο με κατάλληλο ιχνηθέτη συνήθως ένα ένζυμο όπως π.χ. υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horse-Radish Peroxidase, HRP) ή αλκαλική φωσφατάση, ικανό να μετατρέψει το υπόστρωμα σε ανιχνεύσιμο φωτεινό σήμα με φωτογραφικά/απεικονιστικά μέσα.

Υλικά

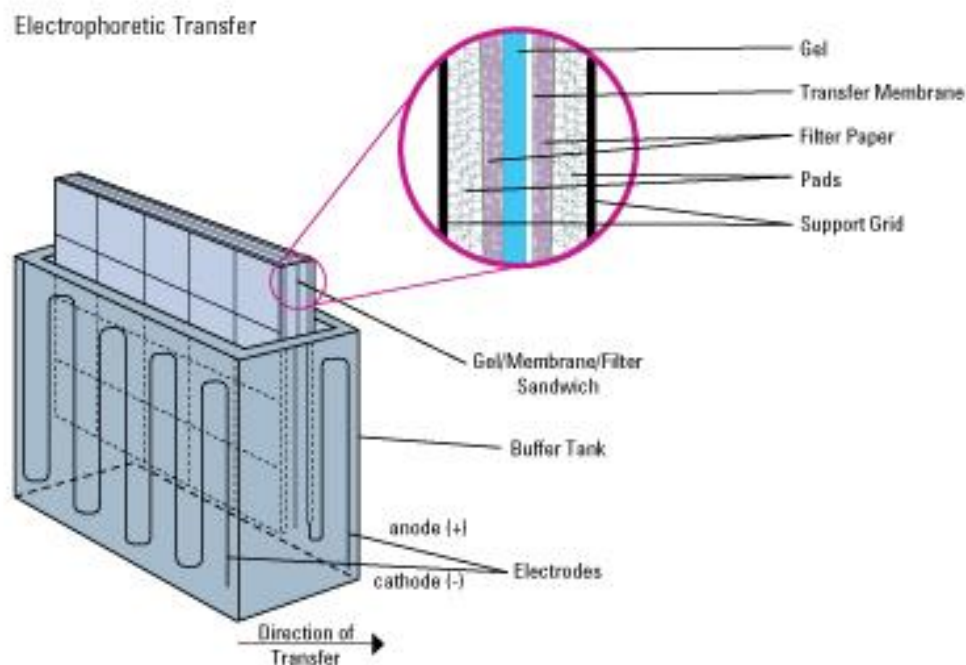
- Πρωτογενή αντισώματα:

- μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι της ακτίνης (MAB-1501) (Millipore)
- πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του καρξυτελικού άκρου της PC-1 (kindly provided by PKD Core facility)
- μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι της PC-2 (Santa Cruz Bt)
- Δευτερογενή αντισώματα:
 - αιγός έναντι μύος συζευγμένου HRP (Thermo Scientific)
 - αιγός έναντι κουνελιού συζευγμένου HRP (Millipore)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBST pH 7,5 :
 - 20mM Tris (Sigma)
 - 150mM NaCl
 - 0,05% Tween-20
- Διάλυμα μεταφοράς :
 - 25mM Tris (Sigma)
 - 192mM γλυκίνη (Sigma)
 - 20% μεθανόλη (Sigma)
- Διάλυμα γάλακτος (0% λιπαρά) 5% σε TBST ρυθμιστικό διάλυμα
- ECL Kit (Pierce): Χημειοφωταυγές υπόστρωμα για την υπεροξειδάση, με το οποίο εμποτίζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε αναλογία 125μl ανά 1cm² μεμβράνης. Παρασκευάζεται με την ανάμιξη ίσων όγκων (1ml) σταθερού διαλύματος υπεροξειδάσης και διαλύματος ενίσχυσης.
- Διαλύματα εμφάνισης (developer) και μονιμοποίησης (fixer) φωτογραφικού φιλμ (Sigma)
- Φωτογραφικό φιλμ (KODAK)

Περιγραφή της μεθόδου

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, τόσο το πήκτωμα όσο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένονται στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται ως εξής: Τοποθετούνται στη σχετική συσκευή μεταφοράς με προσανατολισμό από την κάθοδο (μαύρη επιφάνεια) προς την άνοδο ένα ακρυλικό σφουγγαράκι, δύο κομμάτια χαρτιού Whatman στο μέγεθος της πηκτής, η πηκτή, η μεμβράνη, δύο ακόμη κομμάτια χαρτιού Whatman και ένα ακόμη

ακρυλικό σφουγγαράκι (Εικόνα 3.4). Τέλος, η συσκευή εμβυθίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού 90V για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία 4°C.



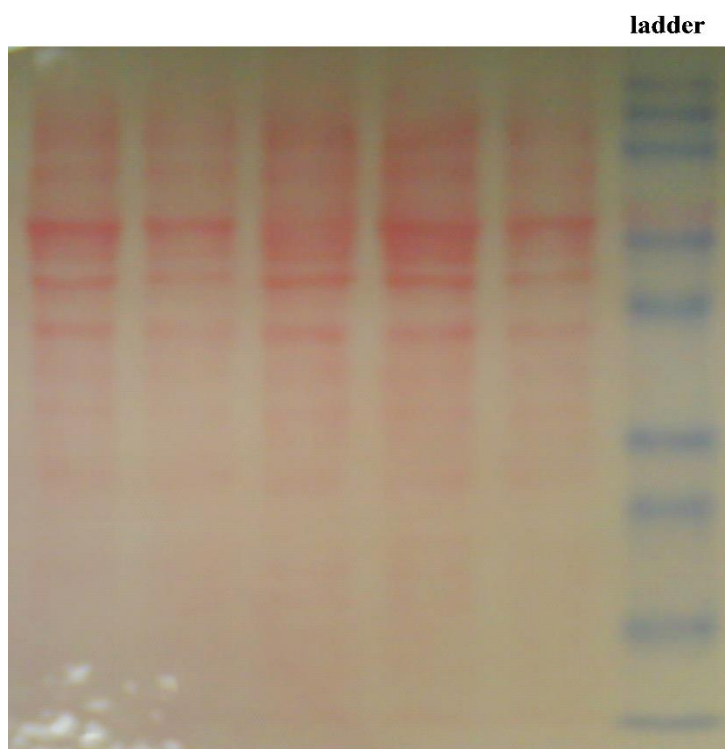
Εικόνα 3.4 Απεικόνιση της ηλεκτρομεταφοράς.

Για να ελέγξουμε αν έγινε επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, βάψαμε την μεμβράνη με διάλυμα Ponceau S [0,2% (β/ο) Ponceau S – 3% (β/ο) τριχλωροοξικό οξύ]. Η χρωστική αυτή βάφει τις πρωτεΐνες οπότε στην επιτυχή μεταφορά παρατηρήσαμε ζώνες πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Εικόνα 3.5). Στη συνέχεια, το διάλυμα Ponceau S απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλένεται με νερό.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος σε TBST για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να παρεμποδιστούν όλες οι μη-ειδικές αντιγονικές θέσεις. Ακολουθούν η επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση που προτείνει ο κατασκευαστής σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST υπό ανακίνηση για 16 περίπου ώρες στους 4°C. Ακολουθούν πλύσεις με TBST (4 φορές από 10 λεπτά) και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση που προτείνει ο κατασκευαστής σε

διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά από πλύσεις με διάλυμα TBST (3 φορές από 10 λεπτά), η μεμβράνη επωάζεται για 2 λεπτά με (βασισμένο στην λουμινόλη) χημειοφωταυγές υπόστρωμα του ενζύμου HRP, καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με επώαση πρώτα στο διάλυμα εμφάνισης και έπειτα στο διάλυμα μονιμοποίησης και τέλος έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για την ημι-ποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώνονται και κατόπιν αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Image-J).



Εικόνα 3.5 Απεικόνιση της μεμβράνης με χρώση Ponceau S

3.6. Απομόνωση RNA- RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Τα hPDL κύτταρα επωάσθηκαν με θρεπτικό μέσο που περιείχε 0,1% FBS για 24 ώρες και μηχανική διάταξη εφαρμόστηκε για ½, 1 και 6 ώρες, επίσης επωάσθηκαν με τους επιθυμητούς αναστολείς (anti-Ig-PKD1, AG490, STAT3 Inhibitor VII). Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη βοήθεια του RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Το RNA, στη συνέχεια, υποβάλλεται σε σύνθεση ενός κλώνου cDNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης AMV (Avian Myeloblastosis Virus, AMV), η οποία είναι μία RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία συνθέτει τον ένα cDNA κλώνο από το υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, στο οποίο πρώτα έχουν υβριδοποιηθεί τα τυχαία συνθετικά μόρια εκκινητών. Το παραγόμενο cDNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί περαιτέρω μέσω PCR (Κεφάλαιο 3.7).

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X (Takara)
- PrimeScript™ RT Enzyme (Takara)
- Διάλυμα dT εκκινητών σε συγκέντρωση 50μM (Takara)
- Διάλυμα τυχαίων εξαμερών σε συγκέντρωση 100μM (Takara)
- Δείγματα ολικού RNA με συγκέντρωση 50ng/μl
- dH₂O ελεύθερο ριβονουκλεάσης

Περιγραφή της μεθόδου

1. Σε ένα μικροσωλήνα τύπου erpendorf όγκου 0,5ml προστίθενται τα αντιδραστήρια του μίγματος που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2). Ο συνολικός όγκος του δείγματος πρέπει να ανέρχεται σε 10μl.

Πίνακας 3.2 Σύσταση μίγματος

Μίγμα	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα 5X	2μl
PrimeScript™ RT Enzyme	0,5μl
Διάλυμα dT εκκινητών	0,5μl

Διάλυμα τυχαίων εξαμερών	0,5μl
Ολικό RNA	500ng
dH ₂ O	

2. Στη συνέχεια το δείγμα θερμαίνεται στους 37°C για 15 λεπτά ώστε να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση και στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται με επώαση στους 85°C για 5 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί ενίσχυση του cDNA μέσω PCR (Κεφάλαιο 2.10) χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές.

3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική PCR συνίσταται στην επιλεκτική ενίσχυση τμήματος DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας με τη χρήση ειδικών συνθετικών ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδίων που ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι απόλυτα συμπληρωματικοί με τις δύο μονόκλωνες αλυσίδες εκμαγείου DNA. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση εισαγωγής θέσης περιορισμού στα προϊόντα της αντίδρασης PCR οπότε και η συμπληρωματικότητα των εκκινητών με τις δύο αλυσίδες του υποστρώματος δεν είναι 100%. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης PCR είναι δίκλωνο DNA, του οποίου τα άκρα καθορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και θα περιλαμβάνει και την μεταξύ τους απόσταση. Επιπλέον, προϊόντα λίγο μεγαλύτερου μεγέθους παράγονται σε αμελητέα, όμως, ποσότητα καθώς δεν πολλαπλασιάζονται εκθετικά όπως συμβαίνει με την αλληλουχία στόχο. Η αντίδραση PCR συνίσταται σε επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τα παρακάτω τρία (3) στάδια:

1. Θερμική αποδιάταξη των αλυσίδων του υποστρώματος DNA σε θερμοκρασία 95°C για 30 έως 60 δευτερόλεπτα.

2. Υβριδισμός των μορίων εκκινητών στους συμπληρωματικούς κλώνους του υποστρώματος DNA, που πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών 52°C -64°C.

3. Επιμήκυνση των εκκινητών και αντιγραφή του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί, που λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία 72°C.

Τα παραπάνω στάδια θέρμανσης-ψύξης επαναλαμβάνονται πολλές φορές (28-40 κύκλοι) με σκοπό τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA. Πριν από τους θερμικούς κύκλους υπάρχει ένα κοινό στάδιο αποδιάταξης του DNA

στους 95°C για 3 λεπτά και μετά την ολοκλήρωσή τους υπάρχει ένα επίσης κοινό στάδιο επιμήκυνσης των παραγόμενων προϊόντων στους 72°C για 10 λεπτά. Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται σε θερμικό κυκλοποιητή και το ευρέως χρησιμοποιούμενο ένζυμο είναι η Taq πολυμεράση η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση έχει μέγιστη απόδοση στους 72°C και ο χρόνος ημιζωής της είναι 40 λεπτά στους 95°C. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η KAPA2G Fast HotStart DNA πολυμεράση, ένα ένζυμο δεύτερης γενιάς σχεδιασμένο μέσω μοριακής εξέλιξης, με σημαντικά ταχύτερους ρυθμούς επιμήκυνσης από τη Taq DNA πολυμεράση.

Το ένζυμο αντιγράφει το DNA με ταχύτητα περίπου 1000 βάσεις ανά λεπτό. Το διάλυμα της αντίδρασης εκτός από το υπόστρωμα DNA περιέχει το ζεύγος εκκινητών, το μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα για διατήρηση σταθερού pH, ιόντα Mg^{+2} και την πολυμεράση.

Τα ακόλουθα σημεία είναι κρίσιμα για την επιτυχία της τεχνικής PCR:

A) Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα DNA, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των εκκινητών και την περιεκτικότητά τους σε ζεύγη γουανίνης και κυτοσίνης. Είναι σημαντικό να μην είναι πολύ χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών διότι σε αυτή την περίπτωση ευνοείται η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων πολυμερισμού. Αντίθετα μια θερμοκρασία πολύ υψηλότερη βέλτιστης για ένα δεδομένο ζεύγος εκκινητών είναι πιθανό να μην οδηγήσει σε παραγωγή προϊόντος πολυμερισμού.

B) Η επιλογή του χρόνου επιμήκυνσης των εκκινητών κατά το τρίτο στάδιο να κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 30-60 δευτερολέπτων ανάλογα με την απόσταση μεταξύ των εκκινητών και επομένως με το μέγεθος του προϊόντος πολυμερισμού.

Γ) Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης να περιορίζεται στους ελάχιστους απαραίτητους, με σκοπό την αποφυγή λαθών κατά την αντιγραφή και παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

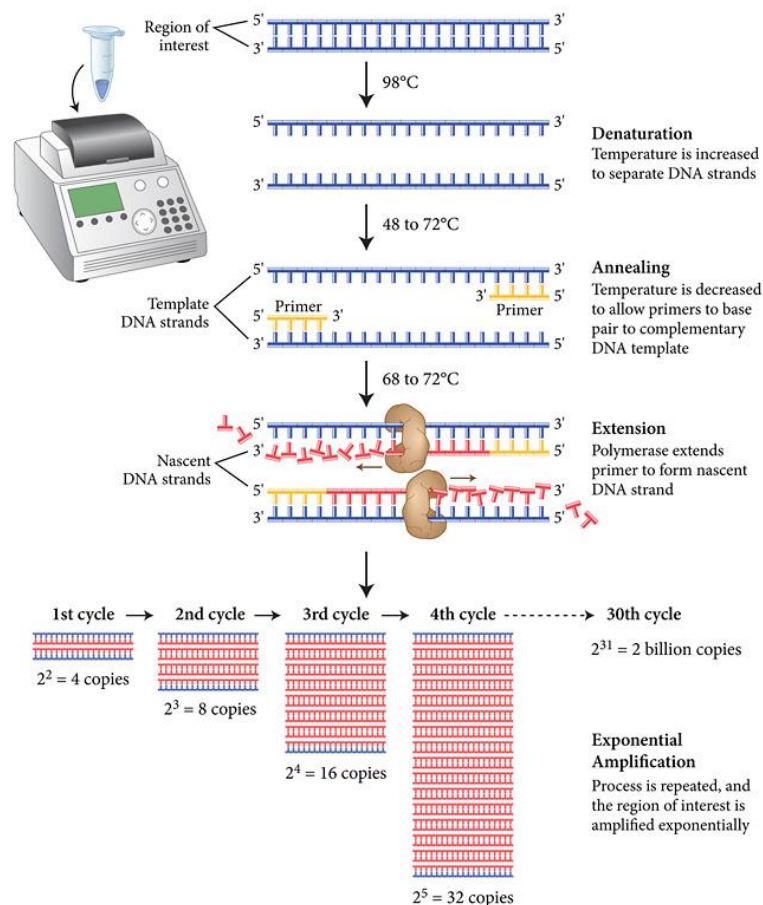
Δ) Η αρχική ποσότητα του DNA να κυμαίνεται μεταξύ 10-500ng ανάλογα με την καθαρότητά του και τον αριθμό των αντιγράφων του τμήματος προς ενίσχυση.

E) Η τελική συγκέντρωση του $MgCl_2$ να κυμαίνεται μεταξύ 1mM και 8mM. Τα ιόντα Mg^{2+} είναι σημαντικά για την ειδικότητα της υβριδοποίησης των εκκινητών με το υπόστρωμα DNA και την απόδοση του ενζύμου.

Στ) Οι εκκινητές να έχουν μήκος 17-30 βάσεις (σε ειδικές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιούνται εκκινητές μήκους μέχρι και 60 βάσεων) και η τελική τους συγκέντρωση να κυμαίνεται από 0,1μM έως 1μM. Είναι απαραίτητο να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα ζευγών γουανίνης-κυτοσίνης 50-60%, να μην έχουν συμπληρωματικότητα κυρίως στα 3' άκρα τους προς αποφυγή σχηματισμού ολιγομερών και τέλος να μην εμφανίζουν δευτεροταγείς δομές.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής PCR συνίστανται στο ότι είναι δυνατή η αναγνώριση της αλληλουχίας-στόχου ακόμα και όταν το αρχικό εκμαγείο DNA βρίσκεται σε μικρή ποσότητα ή περιορισμένη καθαρότητα (π.χ. ιστοί εγκλεισμένοι σε παραφίνη), στην ευαισθησία, στην ακρίβεια, στο μικρό κόστος, στην ευκολία και στην ταχύτητά της συγκριτικά με άλλες τεχνικές κλωνοποίησης.

Οι ιδανικές συνθήκες της αντίδρασης π.χ. θερμοκρασίες και χρόνοι επώασης, συγκεντρώσεις της Taq πολυμεράσης, του μίγματος των εκκινητών, των ιόντων Mg^{2+} και του υποστρώματος DNA) ποικίλλουν και χρειάζονται βελτιστοποίηση για κάθε ξεχωριστή αντίδραση.



Εικόνα 3.6 Αρχή μεθόδου PCR.

Υλικά

- Εκκινητές (primers), αρχικής συγκέντρωσης 5μM (Invitrogen)
- KAPA2G Fast Multiplex Mix (2X)
- DNA
- dH₂O

Περιγραφή της μεθόδου

Σε φιαλίδιο τύπου erpendorf 0,5ml προσθέτονται τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Πίνακας 3.3 Σύσταση μίγματος PCR

Μίγμα PCR	
dH ₂ O	Up to 25.0 μl
KAPA2G Fast Multiplex Mix (2X)	12.5 μl
Primers (5μM)	0.50 μl
DNA	10-250ng
Σύνολο	25μl

Τα αντιδραστήρια αναδεύονται με τη βοήθεια μικροπιπέτας για να εξασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου ενώ όλη η διαδικασία διεξάγεται σε θερμοκρασία 4°C για να αποφύγουμε πρόωμη έναρξη της αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται στους -20°C. Οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου καθώς και ο αριθμός των κυκλικών επαναλήψεων) διαφοροποιούνται ανάλογα με την νουκλεοτιδική αλληλουχία που ενισχύεται, όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 3.4

Πίνακας.3.4 Εκκινητές και βέλτιστες συνθήκες PCR

Γονίδιο	Εκκινητές		Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Αριθμός κύκλων
<i>RUNX2</i>	Forward	5'- CCCCACGACAACCGCACCAT-3'	292	59	32

	Reverse	5'-GTCCACTCCGGCCCCACAAATC-3'			
<i>OC</i>	Forward	5'-GGTGCAGTCTTTGTGTCCAAGC-3'	283	59	30
	Reverse	5'-GGCAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG-3'			
<i>actin</i>	Forward	5'-GTGGGGCGCCCAGGCACCA-3'	539	59	30
	Reverse	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'			

3.8. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθοδολογίας

Τα πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA καθώς και προϊόντα της τεχνικής PCR διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Η επιλογή της συγκέντρωσης της αγαρόζης καθορίζεται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν και συγκεκριμένα, η συγκέντρωσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους των τμημάτων DNA.

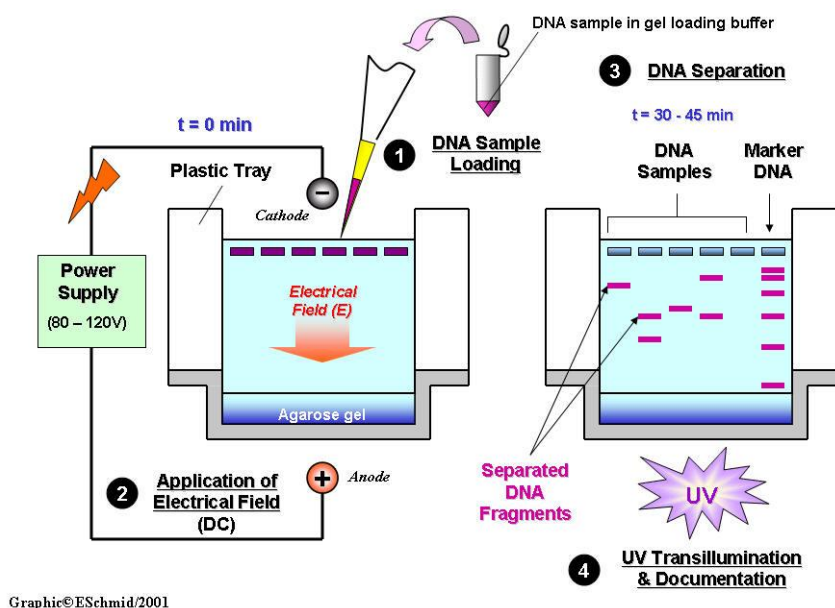
Υλικά

- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Διάλυμα TAE 10X (Tris, κρυσταλλικό οξικό οξύ και δινάτριο EDTA) pH 8
- 10 mg/ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma)
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, Promega)
- Δείκτης μοριακών βαρών του DNA (DNA ladder, NIPPON Genetics): 100bp ή 1kb

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 2% διαλύονται 2g αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TAE και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι τη θερμοκρασία βρασμού ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Το διάλυμα τοποθετείται σε εκμαγείο οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφού τοποθετηθούν τα ειδικά χτενάκια που δημιουργούν τις θέσεις προσθήκης του δείγματος, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα του DNA (προϊόντα PCR,

πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA) μαζί με διάλυμα φόρτωσης αν χρειάζεται. Παράλληλα με τα δείγματα DNA φορτώνεται και δείκτης μοριακών βαρών. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό ηλεκτρικού ρεύματος. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι θερμοκρασία δωματίου, 100 Volts, 30 mA, 30 λεπτά. Οι ζώνες του DNA είναι ορατές χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβαλλόμενο ανάμεσα στους κλώνους του DNA γίνεται ορατό με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Περιγραφή μεθοδολογίας Ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.9. Ανοσοφθορισμός

Υλικά

- PBS (Gibco)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma)
- Διάλυμα 3,7% (v/v) παραφορμαλδεύδης (Sigma) σε PBS
- Διάλυμα 0,05% (v/v) Tween-20 (Sigma) σε PBS (PBST)
- Διάλυμα 0,1% (w/v) BSA σε PBS
- Διάλυμα γλυκίνης (Sigma) 0,01M PBS (Gibco)
- Πρωτογενή αντίσωματα
 - μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του καρξυτελικού άκρου της PC-1 (kindly provided by PKD Core facility)
 - μονοκλωνικό αντίσωμα μύδς έναντι της PC-2 (Santa Cruz Bt)

- πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της JAK2 (p- JAK2) (Santa Cruz Bt)
- Δεύτερογενη αντίσωματα
 - αιγός έναντι μυός συζευγμένου με τη φθορίζουσα χρωστική FITC (Santa Cruz Bt)
 - αιγός έναντι κουνελιού συζευγμένου με φθοριόχρωμα Texas Red (Santa Cruz Bt)
- Μέσο στερέωσης Mowiol (Calbiochem)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα επιστρώνονται πάνω σε καλυπτρίδες των 13mm μέσα σε μικροπλάκα καλλιέργειας 12-θέσεων, ξεπλένονται δύο φορές με PBS και μονιμοποιούνται με την επίδραση διαλύματος 3,7% παραφορμαλδεύδης σε PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις με PBST για 10 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών ή επώαση με διάλυμα γλυκίνης 0,01M και με διάλυμα διαπερατοποίησης 0,2 % Triton X-100 (για την ανίχνευση του p-p70S6K). Ακολουθεί νέα πλύση με PBS και δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με διάλυμα 5% BSA σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα 0,1% BSA σε PBS για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις με PBS και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένου με φθοριόχρωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα 0,1% BSA σε PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με PBS, εξαγωγή των καλυπτρίδων από τη μικροπλάκα καλλιέργειας και προσθήκη του μέσου στερέωσης Mowiol. Μετά την έγκληση των καλυπτρίδων τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Leica TCS SP 170258, Leica Software) (λείζερ Αργού, Ηλίου).

3.10. Duolink OLINK

Υλικά

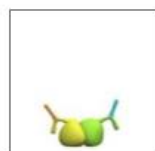
- PBS (Gibco)
- Διάλυμα 4% (v/v) παραφορμαλδεύδης (Sigma) σε PBS

- Διάλυμα γλυκίνης (Sigma) 0,01M
- Blocking buffer (OLINK BIOSIENCE)
- Antibody diluent (OLINK BIOSIENCE)
- Πρωτογενή αντίσωματα
 - μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του καρξυτελικού άκρου της PC-1 (kindly provided by PKD Core facility)
 - μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι της PC-2 (Santa Cruz Bt)
 - πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της JAK2 (p- JAK2) (Santa Cruz Bt)
- PLA probes MINUS/ PLUS (OLINK BIOSIENCE)
- Ligation buffer (5x), Ligase (1 U/μl) (OLINK BIOSIENCE)
- Ampification buffer (5x), Polymerase (10 U/μl) (OLINK BIOSIENCE)
- Μέσο στερέωσης Mowiol (Calbiochem)
- TOPRO

Περιγραφή μεθοδολογίας

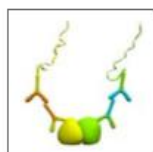
Τα hPDL κύτταρα επιστρώνονται πάνω σε καλυπτρίδες των 10mm μέσα σε μικροπλάκα καλλιέργειας 24-θέσεων, καλλιεργούνται παρουσία DMEM, 10% FBS μέχρι να φθάσουν σε 100% πληρότητα και στη συνέχεια επωάζονται σε θρεπτικό με 0,1% FBS για 24 ώρες. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με PBS και μονιμοποιούνται με την επίδραση διαλύματος 4% παραφορμαλδεύδης σε PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 2 πλύσεις με PBS και επώαση με διάλυμα γλυκίνης 0,01M για 20 λεπτά, προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Ακολουθούν δύο νέες πλύσεις με PBS και δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με blocking buffer για 30 λεπτά στους 37°C, σε επωαστικό κλίβανο. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C με τα πρωτογενή αντισώματα τα οποία αραιώνονται σε διάλυμα (antibody diluent). Ακολουθούν 2 πλύσεις με PBS και επώαση για 1 ώρα στους 37°C με τους PLA probes MINUS/PLUS, συζευγμένοι με PLA ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι αραιώνονται σε διάλυμα (antibody diluent). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS, προστίθεται στο δείγμα το διάλυμα της λιγάσης και του ρυθμιστικού της διαλύματος και επωάζεται για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά την πλύση με PBS, προστίθεται στο δείγμα το διάλυμα της πολυμεράσης και του ρυθμιστικού της διαλύματος και

επώάζεται για 100 λεπτά στους 37°C. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, χρησιμοποιώντας μέσο στερέωσης Mowiol. Μετά την έγκληση των καλυπτρίδων τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Leica TCS SP 170258, Leica Software) (λείζερ Αργού, Ηλίου).



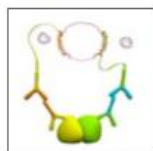
A.

Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα



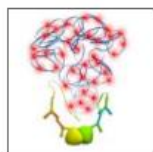
B.

Επώαση με δευτερογενή αντισώματα, συζευγμένα με ολιγονουκλεοτίδια



C.

Σύνδεση των δυο ιχνηθετών



D.

Αντίδραση ενίσχυσης κυλιόμενου κύκλου

Εικόνα 3.8 Αρχή μεθόδου Duolink.

3.11. Κυτταρομετρία ροής

Υλικά

- Διάλυμα PBS
- Διάλυμα 1% (w/v) παραφορμαλδεύδης σε PBS
- Διάλυμα 1% (w/v) Triton-X100 σε PBS
- Διάλυμα 5% (v/v) FBS σε PBS
- Πρωτογενή αντίσωματα:
 - μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι της PC-1 (Santa Cruz Biotechnology)

- πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της JAK2 (p- JAK2) (Santa Cruz Bt)
- μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι της STAT3 (Thermo Scientific)
- μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της pSTAT3 (Thermo Scientific)
- Δεύτερογενη αντίσωματα:
 - έναντι κουνελιού συζευγμένου με φθοριόχρωμα Texas Red (Santa Cruz Bt)
 - έναντι μύος συζευγμένου με φθοριόχρωμα FITC (Santa Cruz Bt)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα hPDL κύτταρα επώασθηκαν με τους επιθυμητούς αναστολείς (anti-Ig-PKD1, AG490, STAT3 Inhibitor VII) και εφαρμόστηκε μηχανική διάταση για ½, 1 και 6 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μονιμοποιήθηκαν σε παραφορμαλδεΐδη 1% (20 λεπτά, 20°C), επώαστηκαν με διάλυμα 5% FBS (20 λεπτά, 20°C) και ακολούθως με διάλυμα διαπερατότητας 1% Triton-X100 (20 λεπτά, 20°C). Έγινε επώαση για μία ώρα με τα πρωτογενή αντισώματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με τα δευτερογενή, συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα, αντισώματα. Η απόκτηση και ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο τύπου FACSCalibur μέσω του λογισμικού CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.12. TransAM

Περιγραφή της μεθόδου

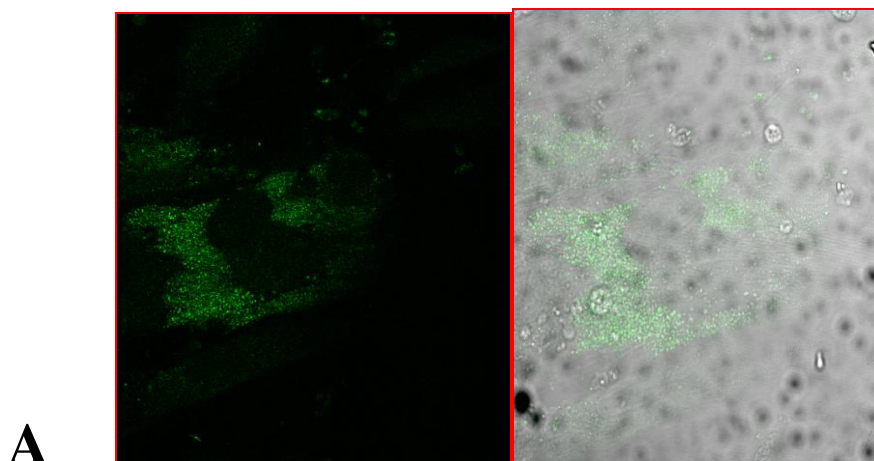
Πέντε μικρογραμμάρια πυρηνικού εκχυλίσματος ελέγχθηκαν για δραστικότητα δέσμευσης DNA του pSTAT3 με τη χρήση του TransAM Kit, χρησιμοποιώντας μια αλληλουχία φυσικού τύπου (50-T/ AGGAAA-30) και ένα ειδικό αντίσωμα pSTAT3, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Τα αποτελέσματα (οπτική πυκνότητα που μετρήθηκε στα 450 nm) εκφράστηκαν ως ποσοστιαία αύξηση σε σχέση με τα βασικά (μη επεξεργασμένα κύτταρα).

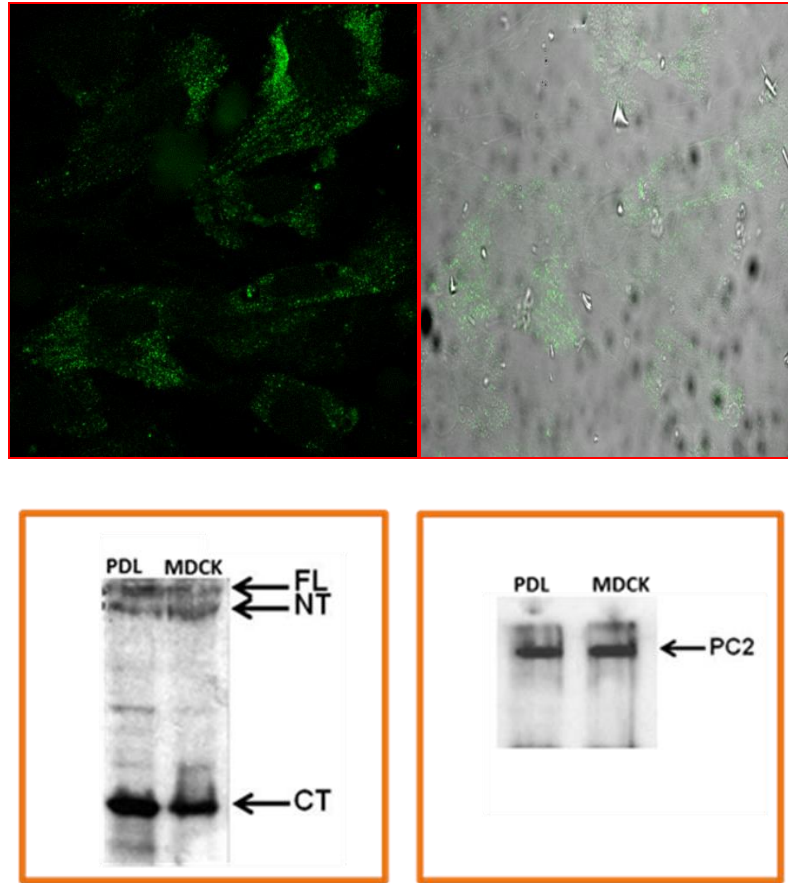
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Εντοπισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα

Με σκοπό τον εντοπισμό των PC-1 και PC-2 σε οστεοβλαστικά κύτταρα, χρησιμοποιήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών που απομονώθηκαν από ανθρώπινο περιοδόντιο με εδραιωμένες τις οστεοβλαστικού τύπου ιδιότητες, όπως επαληθεύεται από την έντονη ανοσοϊστοχημική χρώση για αλκαλική φωσφατάση και βιμεντίνη, ένας ιδιαίτερα αξιόπιστος δείκτης των κυττάρων που προέρχονται από το μεσέγγυμα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Οι ενδείξεις που αφορούν την παρουσία των πολυκυστινών στους οστεοβλάστες είναι μάλλον περιορισμένες, με μόνο δύο πρόσφατες μελέτες να αποδεικνύουν την παρουσία συμπλόκου PC-1,PC-2 σε οστεοβλάστες μύος και οστεοκύτταρα, υποδηλώνοντας περαιτέρω ένα πιθανό λειτουργικό ρόλο της PC-1 στην αναβολική σηματοδότηση αυτών των κυττάρων (Xiao et al., 2006, 2008). Στηριζόμενοι σε αυτή την παρατήρηση, προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε αν οι πολυκυστίνες εντοπίζονται σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα (κύτταρα hPDL). Με πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας, αποδείξαμε ότι οι κυτταρικές καλλιέργειες των hPDL εκφράζουν τις PC-1 και PC-2 πρωτεΐνες (Εικόνα 4.1.A). Επιπλέον, μέσω πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης Western ανιχνεύσαμε την πρωτεϊνική έκφραση των PC-1 και PC-2 σε κύτταρα hPDL (Εικόνα 4.1.B). Στα προαναφερθέντα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας μια σταθερά διαμολυσμένη για PC-1 MDCK κυτταρική σειρά (MDCK-PKD1), που έχει χαρακτηριστεί από τους Qian et al (Qian et al., 2002), πιο συγκεκριμένα είναι νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα σκύλου που είναι γνωστό ότι εκφράζουν των πολυκυστινών-1 και 2.





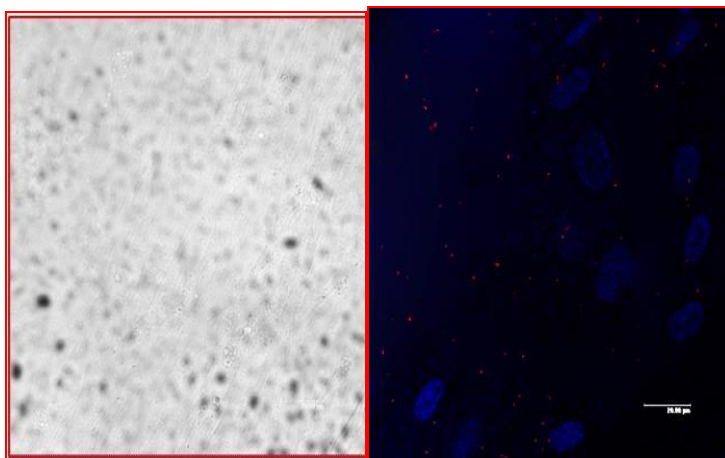
B

Εικόνα 4.1. (Α) Εικόνες ανοσοφθορισμού που δείχνουν τα επίπεδα έκφρασης των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα PDL κύτταρα (scale bar 20 μm). (Β) Ανοσοαποτύπωση Western που δείχνει τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα PDL κύτταρα και σε MDCK-PKD1 (θετικός μάρτυρας) κύτταρα (στήλη 1: hPDL, στήλη 2: MDCK-PKD1 κύτταρα).

4.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει το σχηματισμό ετεροδιμερούς μεταξύ της PC-1 και PC-2 στους πρωτογενείς κροσσούς σε πολλούς τύπους κύτταρων όπως τα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα (Nauli et al., 2003, Nauli and Zhou, 2004), τους οστεοβλάστες μυών (Xiao et al., 2006, 2008) και τα πρόδρομα κρανιακά οστεοχονδροκύτταρα (Kolpakova-Hart et al., 2008). Στηριζόμενοι σε αυτά τα πειραματικά δεδομένα, προσπαθήσαμε να αποδείξουμε την αλληλεπίδραση αυτή στο πειραματικό μας μοντέλο, ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα. Με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε για την οπτικοποίηση των διμερών, Proximity Ligation Assay

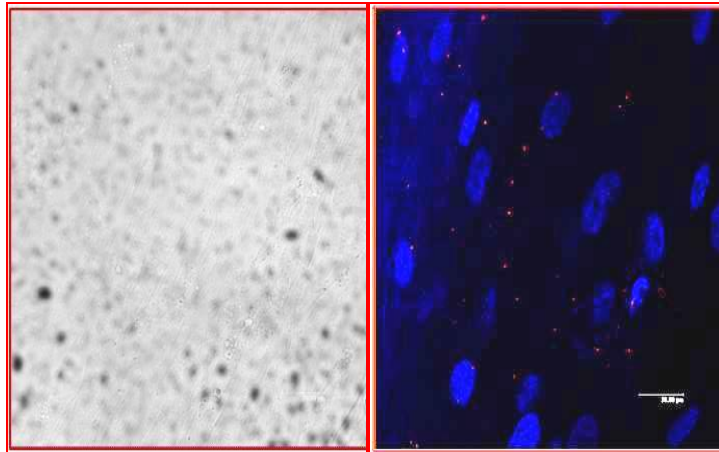
(PLA), αποδείξαμε τον σχηματισμό ετεροδιμερών των εξεταζόμενων πρωτεϊνικών μορίων (Εικόνα 4.2.).



Εικόνα 4.2. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που δείχνουν το σχηματισμό ετεροδιμερών (κόκκινες κουκίδες) μεταξύ της PC-1 και PC-2 σε ανθρώπινα PDL κύτταρα (scale bar 20 μm). Οι πυρήνες αντιπροσωπεύονται με χρώμα μπλε (χρώση DAPI).

4.3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των PC-1 και pJAK σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα

In vivo πειράματα των Bhunia et al., απέδειξαν για πρώτη φορά ότι η PC-1 αλληλεπιδρά με τη JAK2, αλλά η JAK2 ενεργοποιείται μόνο όταν η PC-1 συνεκφράζεται με την PC-2 (Bhunia et al., 2002). Κάποια χρόνια αργότερα αποδείχθηκε ότι η περιοχή της ουράς της PC-1 που βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη αλληλεπιδρά με την JAK2 και ενεργοποιεί το μονοπάτι JAK2/ STAT3 (Talbot et al., 2011). Επίσης υπάρχουν πρόσφατα πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν τον έλεγχο του JAK/ STAT μονοπατιού από την PC-1 σε απόκριση των αλλαγών των επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου (Kim et al., 2013). Βασιζόμενοι σε αυτά τα πειραματικά δεδομένα, προσπαθήσαμε να αποδείξουμε την αλληλεπίδραση αυτή σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα. Η αλληλεπίδραση αυτή των πρωτεϊνικών μορίων PC-1 και pJAK2 αποδείχθηκε με τη μέθοδο Proximity Ligation Assay (PLA) (Εικόνα 4.3.).



Εικόνα 4.3. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που δείχνουν την αλληλεπίδραση (κόκκινες κουκίδες) των PC-1, pJAK2 σε ανθρώπινα PDL κύτταρα (scale bar 20 μm). Οι πυρήνες αντιπροσωπεύονται με χρώμα μπλε (χρώση DAPI).

4.4. Διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων κλειδιών του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/ STAT μετά από μηχανική διέγερση και χειρισμό των κυττάρων

Μελέτες παρουσιάζουν αποδείξεις για την ικανότητα της αγκυροβολημένης στη μεμβράνη PC-1 να ενεργοποιεί τον STAT3 με έναν τρόπο που εξαρτάται από τον JAK2, οδηγώντας σε φωσφορύλιωση και μεταγραφική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, όπως είπαμε η PC-1 αλληλεπιδρά με τη JAK2 και μεταδίδει τα ανασταλτικά αναπτυξιακά σηινάλα στον πυρήνα μέσω της άμεσης ενεργοποίησης του JAK/ STAT μονοπατιού (Brunia et al., 2002). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η PC-1 ρυθμίζει την ενεργότητα του STAT με ένα διττό μηχανισμό, ενεργοποιώντας άμεσα ή έμμεσα τον STAT3 ανάλογα με το αν η κυτταροπλασματική ουρά της PC-1 έχει υποστεί πρωτεολυτική διάσπαση (Talbot et al., 2011). Βάση των παραπάνω μελετών και έχοντας αποδείξει την αλληλεπίδραση των PC-1, pJAK2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα, εμβαθύνουμε τη μελέτη μας με σκοπό τον καθορισμό της πιθανής συσχέτισης της PC-1 και του μονοπατιού JAK/ STAT στη μηχανοδιέγερση, εξετάζοντας την έκφραση των μορίων JAK2, pJAK2, STAT3 και pSTAT3 μετά από μηχανική διέγερση.

Κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των JAK2 και pJAK2

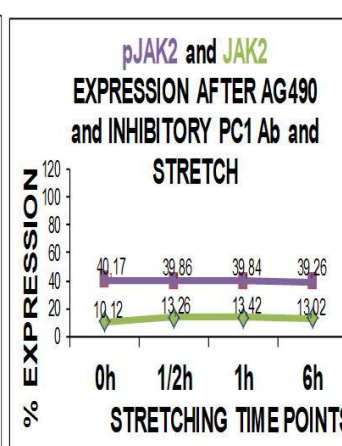
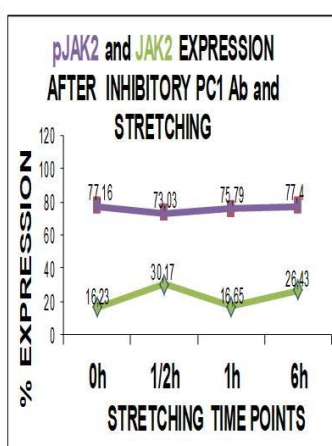
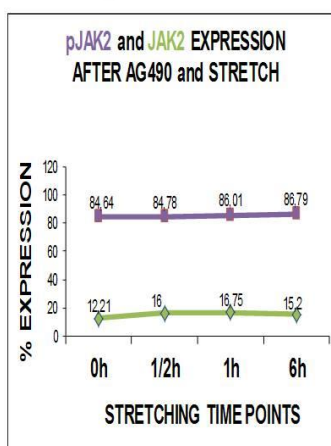
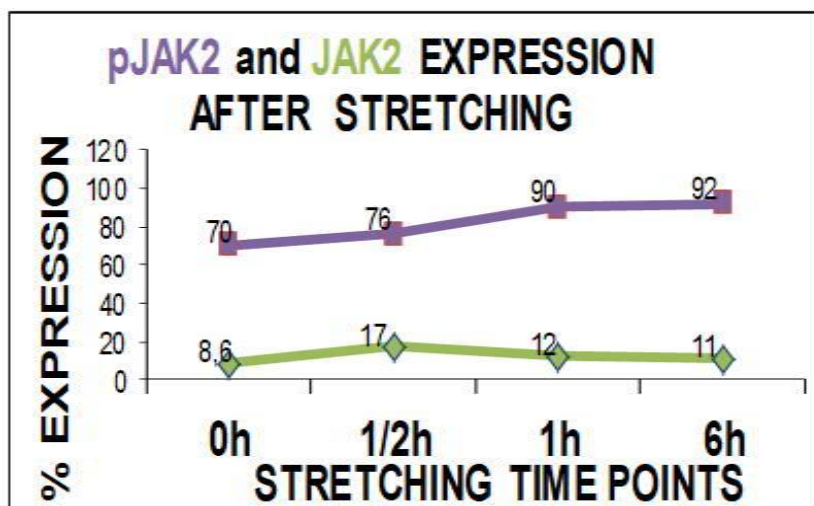
Η Εικόνα 4.4. παρουσιάζει αποτελέσματα από hPDL κύτταρα μετά από μηχανική διέγερση για συγκεκριμένους χρόνους και μελέτη με FACS των επιπέδων των pJAK2 και JAK2. Τα επίπεδα της PC-1 παρέμειναν σταθερά κατά την διάρκεια

της μηχανοδιέγερσης, τα επίπεδα του JAK2 αυξήθηκαν στην 1/2 ώρα, άρχισαν να μειώνονται στη 1 ώρα και να επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα στις 6 ώρες (Εικόνα 4.4.A). Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα του pJAK2 αυξάνονταν συνεχώς στην 1/2, 1 και 6 ώρες (Εικόνα 4.4.A). Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω ευρήματά μας, χρησιμοποιήσαμε έναν γνωστό, ειδικό αναστολέα της JAK2, τον AG490, στα κύτταρα που είχαν δεχθεί μηχανική διέγερση με την μορφή μηχανικής διάτασης. Σύμφωνα με το μηχανισμό ενεργοποίησης της pJAK2, η μηχανική διάταση 1/2 ώρας και η επώαση των οστεοβλαστικών κυττάρων με τον εν λόγω αναστολέα κατήργησε την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της pJAK2 (Εικόνα 4.4.B). Η επώαση με τον AG490, πράγματι, ανάστρεψε το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της JAK2.

Στη συνέχεια, επώασαμε τα οστεοβλαστικά κύτταρα, τα οποία υπέστησαν μηχανική διάταση, με έναν αναστολέα της PC-1 (anti-Ig-PKD αντίσωμα). Αποτέλεσμα, για ακόμα μια φορά, ήταν η κατάργηση της αύξησης των επιπέδων έκφρασης της ενεργοποιημένης μορφής της JAK (Εικόνα 4.4.C). Τέλος, το αποτέλεσμα αυτό επαναλήφθηκε μετά την επώαση των hPDL κυττάρων και με τους δύο προαναφερθείς αναστολείς (Εικόνα 4.4.D).

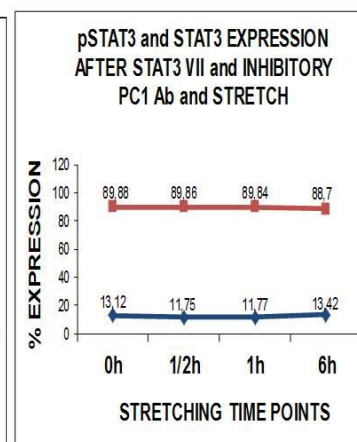
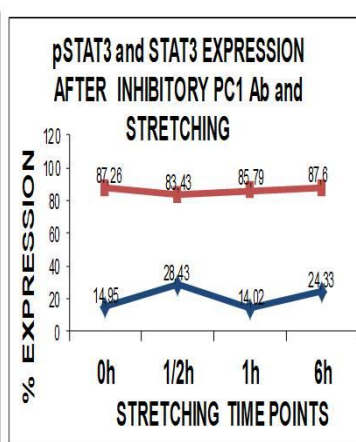
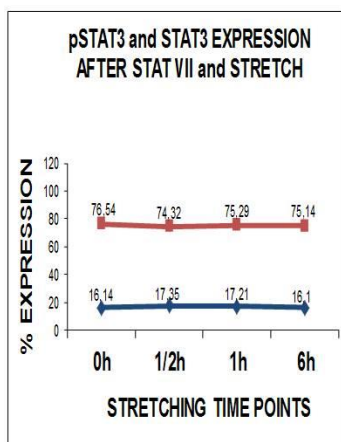
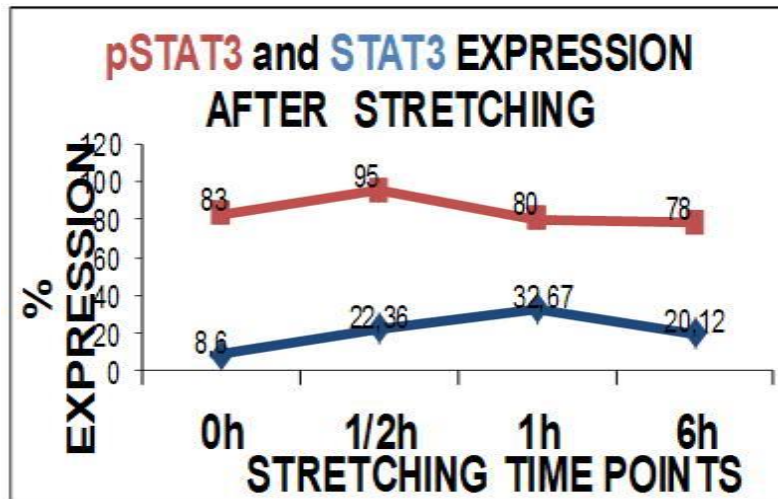
Κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των STAT3 και pSTAT3

Η Εικόνα 4.5. παρουσιάζει αποτελέσματα από hPDL κύτταρα μετά από μηχανική διέγερση για συγκεκριμένους χρόνους και μελέτη με FACS των επιπέδων των STAT3 και pSTAT3. Τα επίπεδα της PC-1 παρέμειναν σταθερά κατά την διάρκεια της μηχανοδιέγερσης, τα επίπεδα του STAT3 αυξήθηκαν στην 1/2 ώρα και 1 ώρα και μειώθηκαν στις 6 ώρες (Εικόνα 4.5.A). Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα του pSTAT3 αυξήθηκαν στην 1/2 ώρα και μειώθηκαν στη 1 ώρα και στις 6 ώρες επιστρέφοντας στα φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα 4.5.A). Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω ευρήματά μας, χρησιμοποιήσαμε έναν γνωστό, ειδικό αναστολέα που αναστέλει την JAK1/JAK2/TYK2/STAT3 ενεργοποίηση, τον STAT3 Inhibitor VII, στα κύτταρα που είχαν δεχθεί μηχανική διέγερση με την μορφή μηχανικής διάτασης. Σύμφωνα με το μηχανισμό ενεργοποίησης της pSTAT3, η μηχανική διάταση 1/2 ώρας και η επώαση των οστεοβλαστικών κυττάρων με τον εν λόγω αναστολέα κατήργησε την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της pSTAT3 (Εικόνα 4.5.B). Η επώαση με τον STAT3 Inhibitor VII, πράγματι, ανάστρεψε το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της STAT3.



Εικόνα 4.4. Ποσοτικά διαγράμματα των επιπέδων έκφρασης των JAK2, pJAK2 σε οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα, μετά από μηχανική διάταση (A), από μηχανική διάταση και επώση με τον AG490 (B), από μηχανική διάταση και επώση με το anti-Ig-PKD1 (C) και από μηχανική διάταση και επώση με τον AG490 και το anti-Ig-PKD1 (D).

Στη συνέχεια, επώσαμε τα οστεοβλαστικά κύτταρα, τα οποία υπέστησαν μηχανική διάταση, με έναν αναστολέα της PC-1 (anti-Ig-PKD αντίσωμα). Αποτέλεσμα, για ακόμα μια φορά, ήταν η κατάργηση της αύξησης των επιπέδων έκφρασης της ενεργοποιημένης μορφής της STAT3 (Εικόνα 4.5.C). Τέλος, το αποτέλεσμα αυτό επαναλήφθηκε, μετά την επώση των hPDL κυττάρων και με τους δύο προαναφερθείς αναστολείς (Εικόνα 4.5.D).

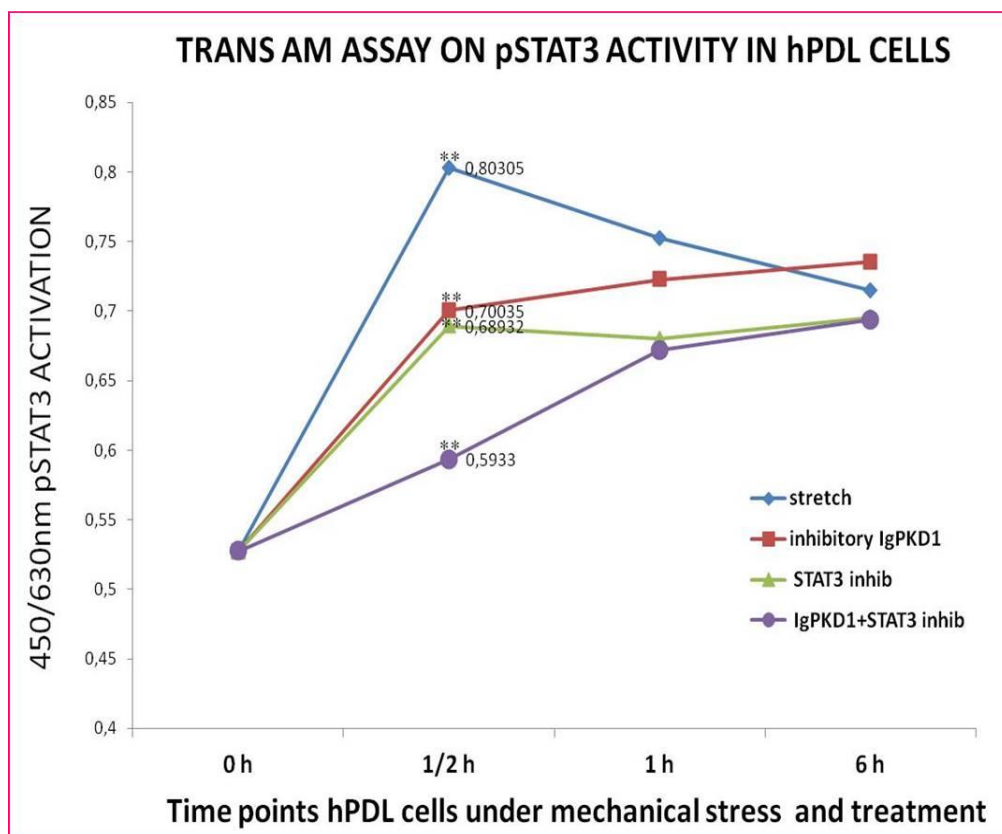


Εικόνα 4.5. Ποσοτικά διαγράμματα των επιπέδων έκφρασης των STAT3, pSTAT3 σε οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα, μετά από μηχανική διάταση (A), από μηχανική διάταση και επώση με τον STAT3 Inhibitor VII (B), από μηχανική διάταση και επώση με το anti-Ig-PKD1 (C) και από μηχανική διάταση και επώση με τον STAT3 Inhibitor VII και το anti-Ig-PKD1 (D).

4.5. Μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα hPDL κυττάρων

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η ειδική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 υπό συνθήκες μηχανικής επιφόρτωσης σε οστεοβλαστικά κύτταρα, εφαρμόστηκε η δοκιμασία TransAM. Η μέθοδος TransAM επιτρέπει τον ευαίσθητο, μη ραδιενεργό προσδιορισμό της ειδικής ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα σε εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων θηλαστικών. Ακολουθώντας τις ίδιες πειραματικές συνθήκες μηχανικής διάτασης με αυτές που εφαρμόστηκαν στην κυτταρομετρία ροής, κύτταρα που είχαν επωαστεί ή όχι με τον STAT3 Inhibitor VII ή το anti-Ig-PKD1 υποβλήθηκαν σε μηχανική διάταση για

καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και τα πυρηνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν για τον προσδιορισμό της δράσης του pSTAT3 μετά από μηχανοδιέγερση. Πράγματι, τα δεδομένα μας έδειξαν μια στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση ($p < 0,05$) του pSTAT3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα οστεοβλαστικών κυττάρων μετά από 1/2 ώρα μηχανικής διάτασης (Εικόνα 4.6.). Αυτή η ενεργοποίηση μειώθηκε βαθμιαία μετά από 1 και 6 ώρες. Επιπλέον, η επώαση των κυττάρων με έναν από τους δύο ανασταλτικούς παραγόντες (STAT3 Inhibitor VII και αντι-Ig-PKD1) ανέστειλε μερικώς αυτή την ενεργοποίηση (Εικόνα 4.6.). Τέλος, η ανασταλτική επίδραση στην ενεργοποίηση του pSTAT3 παρατηρείται και μετά την επώαση των οστεοβλαστών με τους δυο προαναφερθέντες παράγοντες ταυτοχρόνως.



Εικόνα 4.6. Ποσοτικοποίηση της προσδεσιμότητας του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 χρησιμοποιώντας το TransAM kit σε πυρηνικά εκχυλίσματα από μηχανικά διατεταμένα οστεοβλαστικά κύτταρα για διάφορα χρονικά διαστήματα και διαφορετικές επώσεις (μπλε: διατεταμένα, μη επωασμένα, κόκκινο: διατεταμένα, επωασμένα με anti-Ig-PKD1 κύτταρα, πράσινο: διατεταμένα, επωασμένα με STAT3 Inhibitor VII κύτταρα, μοβ: διατεταμένα, επωασμένα με STAT3 Inhibitor VII και

anti-Ig-PKD1 κύτταρα). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0,05$).

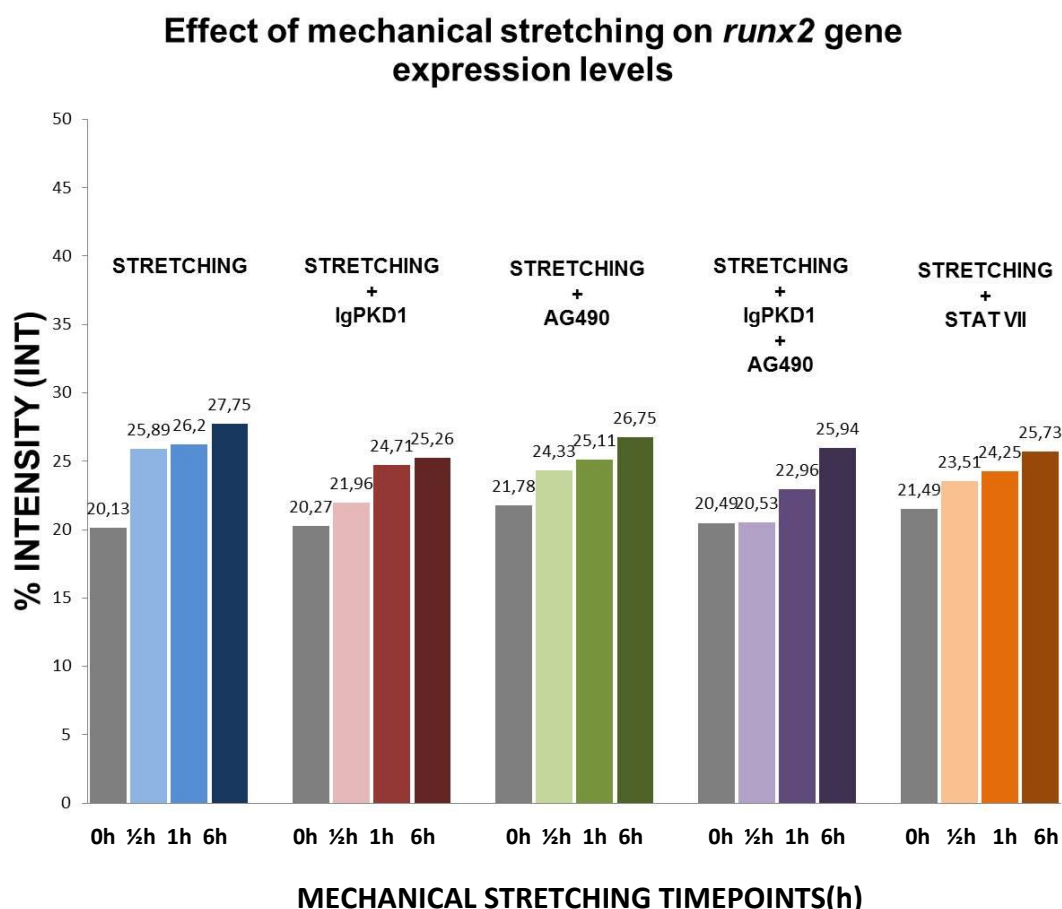
4.6. Διερεύνηση της ρύθμισης της έκφρασης των οστεοβλαστοειδικών γονιδίων *runx2* και *osteocalcin* μέσω της PC-1 μετά από μηχανική διέγερση

Προηγούμενα αποτελέσματα από το εργαστήριό μας έδειξαν ότι η βραχυπρόθεσμη υποβολή των οστεοβλαστικών κυττάρων σε μηχανική διάταση επηρεάζει την έκφραση οστεοβλαστοειδικών γονιδίων και συγκεκριμένα τα επίπεδα mRNA και τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του *runx2* (Ziros et al., 2002, 2008). Κατά συνέπεια, αναρωτηθήκαμε αν η PC-1-μεσολαβούμενη μηχανική διέγερση μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των *runx2* και *osteocalcin* σε επίπεδο mRNA. Βιοπληροφορικές αναλύσεις (Genomatix, TFSEARCH) υποδεικνύουν την ύπαρξη υποθετικών θέσεων σύνδεσης του pSTAT3 στην περιοχή που αντιστοιχεί στον υποκινητή του γονιδίου *runx2*. Για το σκοπό αυτό, απονώθηκε το ολικό RNA μη επωασμένων οστεοβλάστων και κυττάρων που είχαν επωαστεί με anti-Ig-PKD1, AG490 και STAT3 Inhibitor VII, και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε μηχανική διάταση για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0-6 h).

Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του οστεοβλαστοειδικού γονιδίου *runx2*

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα, τα μη μηχανικώς διεγερμένα κύτταρα (0 h) εμφανίζουν σχετικά χαμηλά επίπεδα mRNA για το *runx2*. Αυτά τα επίπεδα αυξάνονται μετά από 1/2 ώρα συνεχούς μηχανικής διέγερσης και παραμένουν αυξημένα μέχρι και μετά από 6 ώρες (Εικόνα 4.7.). Οι διεγερμένοι μηχανικά οστεοβλάστες που επώαστηκαν με τον AG490 αναστολέα εμφανίζουν ελαφρώς μικρότερο ποσοστό αύξησης των επιπέδων mRNA του *runx2* στη 1/2 ώρα, ενώ στη συνέχεια τα ποσοστά αυτά τείνουν προς τα φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα 4.7.). Τα επίπεδα mRNA του *runx2* των διεγερμένων κυττάρων που επώαστηκαν με το ανασταλτικό αντίσωμα έναντι της PC-1 εμφανίζουν στη 1/2 ώρα μικρότερο ποσοστό αύξησης σε σχέση με τα διεγερμένα, μη επωασμένα κύτταρα, ενώ ο συνδυασμός των προαναφερθέντων αναστολέων έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια αύξησης στο ντίστοιχο χρονικό διάστημα. Τέλος, οι διεγερμένοι μηχανικά οστεοβλάστες που επώαστηκαν με τον STAT3 VII αναστολέα εμφανίζουν παρομοίως, μικρό ποσοστό αύξησης των επιπέδων mRNA του *runx2* στη 1/2 ώρα (Εικόνα 4.7.). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η έκφραση του *runx2* γονιδίου ρυθμίζεται από το

JAK2/ STAT3 μονοπάτι μετά από PC-1-μεσολαβούμενη μηχανική διέγερση των οστεοβλαστών.

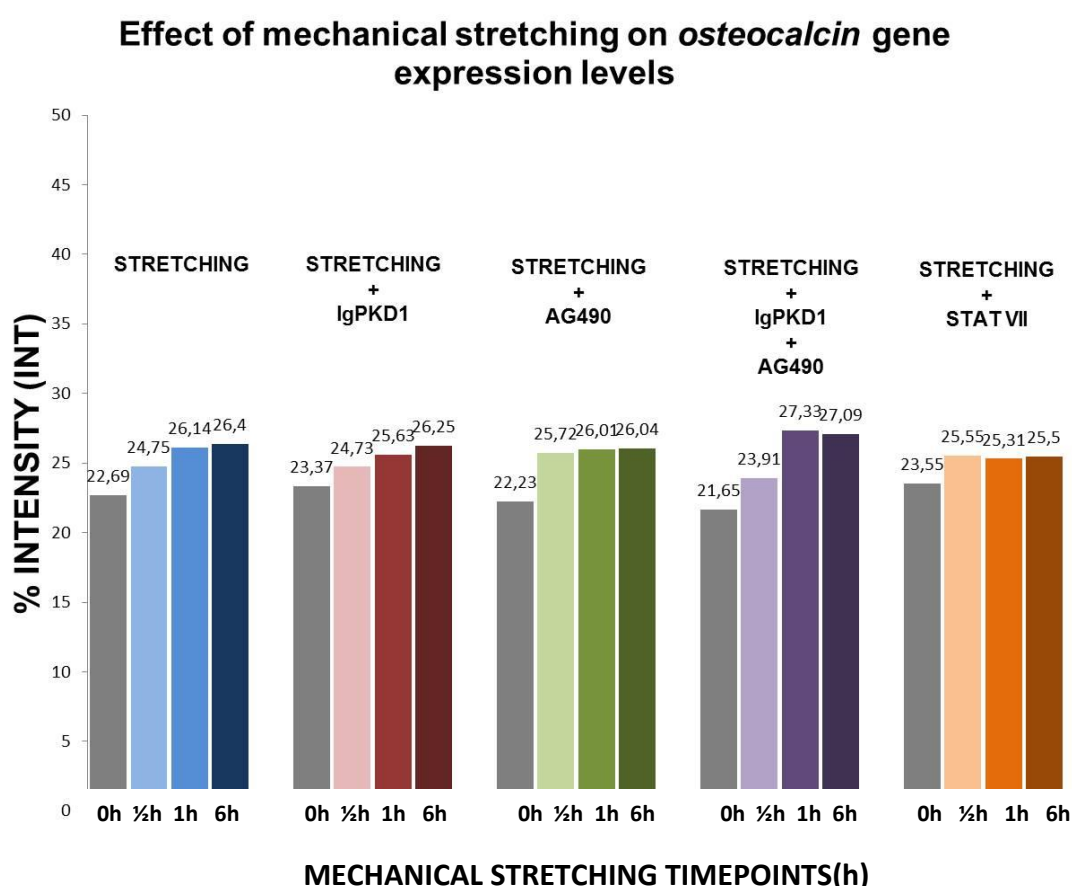


Εικόνα 4.7. Ανάλυση σε επίπεδο mRNA του οστεοβλαστοειδικού γονιδίου *runx2* μηχανικά διεγερμένων hPDL κυττάρων παρουσία του anti-Ig-PKD1 ανασταλτικού αντισώματος (κόκκινο διάγραμμα), του AG490 αναστολέα (πράσινο διάγραμμα), συνδυασμού των anti-Ig-PKD1, AG490 (μόβ διάγραμμα), του STAT3 VII αναστολέα (πορτοκαλί διάγραμμα) και απουσία των παραπάνω (μπλέ διάγραμμα)

Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του οστεοβλαστοειδικού γονιδίου *osteocalcin*

Όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα, τα κύτταρα εμφανίζουν αύξηση στα επίπεδα mRNA της *osteocalcin* μετά από 1/2 ώρα συνεχούς μηχανικής διέγερσης και παραμένουν ελαφρώς αυξημένα μέχρι και μετά από 6 ώρες (Εικόνα 4.8.). Οι διεγερμένοι μηχανικά οστεοβλάστες που επώαστηκαν με τον AG490 αναστολέα εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης των επιπέδων mRNA της *osteocalcin* στη 1/2 ώρα, ενώ στη συνέχεια τα επίπεδα mRNA παραμένουν σταθερά (Εικόνα 4.8.). Τα επίπεδα mRNA της *osteocalcin* διεγερμένων κυττάρων που

επώαστηκαν με το ανασταλτικό αντίσωμα έναντι της PC-1 εμφανίζουν παρόμοια εικόνα με τα αντίστοιχα επίπεδα των διεγερμένων, μη επωασμένων κυττάρων. Ο συνδυασμός των προαναφερθέντων αναστολέων έχουν σαν αποτέλεσμα μια πιο απότομη αύξηση των επιπέδων έκφρασης στην 1 ώρα μηχανικής διάτασης. Τέλος, οι διεγερμένοι μηχανικά οστεοβλάστες που επώαστηκαν με τον STAT3 VII αναστολέα εμφανίζουν παρόμοια εικόνα με τους διεγερμένους μηχανικά οστεοβλάστες που επώαστηκαν με τον AG490 αναστολέα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν φαίνεται ξεκάθαρα αν η έκφραση γονιδίου της *osteocalcin* ρυθμίζεται από PC-1 μονοπάτι μετά από μηχανική διέγερση των οστεοβλαστών.



Εικόνα 4.8. Ανάλυση σε επίπεδο mRNA του οστεοβλαστοειδικού γονιδίου *osteocalcin* μηχανικά διεγερμένων hPDL κυττάρων παρουσία του anti-Ig-PKD1 ανασταλτικού αντισώματος (κόκκινο διάγραμμα), του AG490 αναστολέα (πράσινο διάγραμμα), συνδυασμού των anti-Ig-PKD1, AG490 (μόβ διάγραμμα), του STAT3 VII αναστολέα (πορτοκαλί διάγραμμα) και απουσία των παραπάνω (μπλέ διάγραμμα)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι οστεοβλάστες αποτελούν βασικά μέλη της οστικής μονάδας και παίζουν καταλυτικό ρόλο στην οστική ανακατασκευή, την ουσιαστική λειτουργία του σκελετού για την διατήρηση της δομικής του ακεραιότητας και μεταβολικής ικανότητας. Η συγχρονισμένη λειτουργία των παραπάνω κυττάρων ρυθμίζεται από μια ποικιλία ορμονών, αναπτυξιακών παραγόντων και μηχανικών σημάτων που δρουν μέσω διασυνδεδεμένων σηματοδοτικών δικτύων. Μηχανικά σήματα, με την μορφή στρες που προκαλείται από ροή ρευστών (fluid flow stress) και από δυνάμεις συμπίεσης (compressive force), επάγουν αναβολική απόκριση στα κύτταρα των οστών, γεγονός ζωτικής σημασίας στο πεδίο της βιομηχανικής για την θεραπεία οστεο-εκφυλιστικών ασθενειών. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε και παρουσιάσαμε τον σημαντικό ρόλο της PC-1 σαν ένα μηχανο-ευαίσθητο μόριο σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα, ικανό να ρυθμίσει ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας τελικά σε ρύθμιση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και οστικής σύνθεσης.

Στις πολυκυστίνες (PCs) έχει αποδοθεί και παλαιότερα ο ρόλος μηχανο-ευαίσθητου μορίου. Πιο συγκεκριμένα, σε νεφρικά κύτταρα πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει την λήψη σημάτων μηχανικής φύσης από την PC-1 μέσω του αμινοτελικού της άκρου καθώς και την επακόλουθη μετατροπή τους σε κυτταρικές αποκρίσεις που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση, την διαφοροποίηση και την κυτταρική μορφολογία (Zhou, 2009, Hanaoka et al., 2000). Μελέτες σε νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα παρέχουν πειστικές αποδείξεις για την αναγκαιότητα της παρουσίας της PC-2 και του σχηματισμού συμπλέγματος με την PC-1 που βρίσκεται στους πρωτογενείς κροσσούς του κυττάρου, έχοντας ιδιότητες μηχανοαίσθησης (Nauli et al., 2003).

Η παρουσία των PCs σε ανθρώπινους οστεοβλάστες καταγράφεται στην παρούσα μελέτη και είναι σύμφωνη με τα περιορισμένα στοιχεία που ήδη υπάρχουν για χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα και οστεοβλάστες μυών, όπου έχει προταθεί μια σύνδεση μεταξύ της PC-1 και της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης καθώς και της οστικής ανάπτυξης (Xiao et al, 2006, 2008, Hou et al., 2009). Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν την έκφραση και των δύο πολυκυστινών (PC-1 και PC-2) σε επίπεδο πρωτεΐνης σε καλλιέργεια πρωτογενών οστεοβλαστικού τύπου κυττάρων (primary osteoblast-like cells).

Επιπλέον, παρέχουμε στοιχεία για τον σχηματισμό ετεροδιμερών μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων των PC-1 και PC-2 στο πειραματικό μας μοντέλο, ανθρώπινα

οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει το σχηματισμό ετεροδιμερούς μεταξύ της PC-1 και PC-2 στους προτογενείς κροσσούς σε πολλούς τύπους κύτταρων όπως τα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα (Nauli et al., 2003, Nauli and Zhou, 2004), τους οστεοβλάστες (Xiao et al., 2006, 2008) και τα πρόδρομα κρανιακά οστεοχονδροκύτταρα (Kolpakova-Hart et al., 2008).

In vivo πειράματα των Bhunia et al., απέδειξαν για πρώτη φορά ότι ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς των PC-1, PC-2 είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδραση και ενεργοποίηση της JAK2 μέσω της PC-1 (Bhunia et al., 2002). Κάποια χρόνια αργότερα, η προαναφερθήσα πρωτεϊνική αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε και αποδείχθηκε ότι η JAK2 αλληλεπιδρά με την περιοχή της ουράς της PC-1 που βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη (Talbot et al., 2011). Βασιζόμενοι σε αυτά τα πειραματικά δεδομένα, καθώς, επίσης γνωρίζοντας ότι η ενεργοποίηση του JAK/ STAT μονοπατίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κύστεων στην APKD, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η διερεύνηση της σχέσης του JAK/ STAT μονοπατιού με την PC-1-μεσολαβούμενη μηχανική διέγερση. Το συγκεκριμένο μονοπάτι αποτελεί έναν σημαντικό σηματοδοτικό καταρράκτη μεταγωγής σήματος που εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση, απόπτωση, έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και ανάπτυξη σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων και ιστών.

Αρχικά, με πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας αποδείξαμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνικών μορίων PC-1 και pJAK2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα. Η απόδειξη του συσχετισμού των δύο μελετώμενων πρωτεϊνών αποτέλεσε τη βάση για την εμβάθυνση της μελέτης μας. Στη συνέχεια, λοιπόν, εξετάστηκε η έκφραση των μορίων κλειδιών JAK2, pJAK2, STAT3 και pSTAT3 μετά από μηχανική διέγερση. Τα δεδομένα μας έδειξαν πως αν και τα επίπεδα της PC-1 παραμένουν σταθερά κατά την διάρκεια της μηχανοδιέγερσης, τα επίπεδα του pJAK2 αυξάνονταν συνεχώς στην 1/2, 1 και 6 ώρες. Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω ευρήματά μας, χρησιμοποιήσαμε τον γνωστό, ειδικό αναστολέα της JAK2, τον AG490 ή αυτόν της PC-1, anti-Ig-PKD1, στα κύτταρα που είχαν δεχθεί μηχανική διέγερση με την μορφή μηχανικής διάτασης. Η μηχανική διάταση 1/2 ώρας και η επώαση των οστεοβλαστικών κυττάρων με τους εν λόγω αναστολείς κατήργησε την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της pJAK2. Επίσης, τα επίπεδα του pSTAT3 αυξήθηκαν στην 1/2 ώρα και μειώθηκαν στη 1 ώρα και στις 6 ώρες επιστρέφοντας στα φυσιολογικά επίπεδα. Επώαση των κυττάρων, με έναν γνωστό, ειδικό αναστολέα που αναστέλει την

JAK1/JAK2/TYK2/STAT3 ενεργοποίηση, τον STAT3 Inhibitor VII ή αυτόν της PC-1, anti-Ig-PKD1, και η επιβολή μηχανικής διέγερσης για 1/2 ώρα κατήργησε την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της pSTAT3. Συμπερασματικά, η μελέτη μας είναι η πρώτη που δείχνει την μέσω PC-1 ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα και περαιτέρω συνδέει αυτήν την ενεργοποίηση με την μηχανική διέγερση. Τα πειραματικά μας ευρήματα υποστηρίζονται από μελέτες σε μοντέλα ADPKD, που παρουσιάζουν αποδείξεις για την ικανότητα της αγκυροβολημένης στη μεμβράνη PC-1 να ενεργοποιεί τον STAT3 με έναν τρόπο που εξαρτάται από τον JAK2, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση και μεταγραφική δραστηριότητα (Brunia et al., 2002, Talbot et al., 2011).

Η συνέχεια του πειραματικού σχεδιασμού στηρίχθηκε, για ακόμα μια φορά, στην παρατήρηση των Brunia, Talbot και των συνεργατών τους, ότι η PC-1-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του STAT3 οδηγεί σε μεταγραφική δραστηριότητα. Επομένως, διερευνήθηκε περαιτέρω η ειδική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα pSTAT3 υπό συνθήκες μηχανικής επιφόρτωσης σε οστεοβλαστικά κύτταρα. Πράγματι, τα ακόλουθα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν το συλλογισμό μας. Τα δεδομένα έδειξαν μια στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση ($p < 0,05$) του pSTAT3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα οστεοβλαστικών κυττάρων μετά από 1/2 ώρα μηχανικής διάτασης. Αυτή η ενεργοποίηση μειώθηκε βαθμιαία μετά από 1 και 6 ώρες. Επιπλέον, η επώαση των κυττάρων με τους δύο ανασταλτικούς παραγόντες (STAT3 Inhibitor VII και αντι-Ig-PKD1) ανέστειλε μερικώς αυτή την ενεργοποίηση.

Προηγούμενα αποτελέσματα από το εργαστήριό μας έδειξαν ότι η βραχυπρόθεσμη υποβολή των οστεοβλαστικών κυττάρων σε μηχανική διάταση επηρεάζει την έκφραση οστεοβλαστοειδικών γονιδίων και συγκεκριμένα τα επίπεδα mRNA και τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του runx2 (Ziros et al., 2002, 2008). Κατά συνέπεια, αναρωτηθήκαμε αν η PC-1-μεσολαβούμενη μηχανική διέγερση μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των runx2 και osteocalcin σε επίπεδο mRNA. Η έρευνά μας αποκάλυψε ρύθμιση της έκφρασης του οστεοβλαστοειδικού γονιδίου runx2 από το JAK2/ STAT3 μονοπάτι μέσω PC-1-μεσολαβούμενης μηχανικής διέγερσης. Ανάλυση του mRNA μηχανικώς διεγερμένων hPDL κυττάρων απουσία και παρουσία ειδικών αναστολέων, anti-Ig-PKD1, AG490, STAT3 Inhibitor II, αποκάλυψε την παραπάνω σύνδεση. Παρομοίως εκτελέστηκαν τα πειράματα για το γονίδιο της osteocalcin, από τα αποτελέσματα των οποίων δεν φαίνεται ξεκάθαρα αν η

έκφραση γονιδίου της *osteocalcin* ρυθμίζεται από PC-1 μονοπάτι μετά από μηχανική διέγερση των οστεοβλαστών.

Επομένως, τα αποτελέσματα της έρευνάς μας μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα μοντέλο όπου το αμινοτελικό άκρο της PC-1 δρα σαν μηχανο-ευαίσθητος αισθητήρας που αποκρίνεται σε εξωκυττάρια μηχανικά σήματα που ασκούνται στα κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK/ STAT μέσω φωσφορυλίωσης του STAT3. Η ενεργή μορφή του STAT3 τότε μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου μπορεί να ρυθμίσει την γονιδιακή έκφραση του *runx2* γονιδίου.

Εν κατακλείδι, η μελέτη μας αποκαλύπτει τον σημαντικό ρόλο της PC-1 σαν μόριο-κλειδί με την δυνατότητα να «αντιληφθεί» περιβαλλοντικά σήματα όπως οι μηχανικές δυνάμεις και να ρυθμίσει σηματοδοτικά μονοπάτια ελέγχοντας έτσι την έκφραση οστεοβλαστικών γονιδίων καθώς και την κυτταρική διαφοροποίηση και οστική ανακατασκευή.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1994) The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell*, 77, 881-894.
- Agarwal S, Long P, Seyedain A, Piesco N, Shree A, Gassner R (2003) A central role for nuclear factor- κ B pathway in the anti-inflammatory and pro-inflammatory actions of mechanical strain, *The FASEB Journal*
- Aubin JE, (1998) Advances in the Osteoblast Lineage, *Biochem Cell Biol*, 76 (6), 899-910.
- Bai, C. X., Giamarchi, A., Rodat-Despoix, L., Padilla, F., Downs, T., Tsiokas, L., et al. (2008) Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits. *EMBO Rep*, 9, 472-479.
- Basavanna, U., Weber, K. M., Hu, Q., Ziegelstein, R. C., Germino, G. G., & Sutters, M. (2007) The isolated polycystin-1 COOH-terminal can activate or block polycystin-1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 359, 367-372.
- Bastos, A. P., & Onuchic, L. F. (2011) Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res*, 44, 606-617.
- Bertuccio, C. A., Chapin, H. C., Cai, Y., Mistry, K., Chauvet, V., Somlo, S., et al. (2009) Polycystin-1 C-terminal cleavage is modulated by polycystin-2 expression. *J Biol Chem*, 284, 21011-21026.
- Bhunja A.K., Piontek K., Boletta A., Liu L., Qian F., Xu P.N., et al. (2002) PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell*, 109:157-68
- Bikle DD, (2008) Integrins, insulin like growth factors, and the skeletal response to load. *Osteoporos. Int.* 19, 1237-1246.
- Boucher, C. A., Ward, H. H., Case, R. L., Thurston, K. S., Li, X., Needham, A., et al. (2011) Receptor protein tyrosine phosphatases are novel components of a polycystin complex. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 1225-1238.
- 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.
- Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V. E., Wu, G., Hayashi, T., et al. (1999) Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem*, 274, 28557-28565.
- Cantiello, H. F. (2004) Regulation of calcium signaling by polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286, F1012-1029.
- Celic, A., Petri, E. T., Demeler, B., Ehrlich, B. E., & Boggon, T. J. (2008) Domain mapping of the polycystin-2 C-terminal tail using de novo molecular modeling and biophysical analysis. *J Biol Chem*, 283, 28305-28312.
- Chae, S. W., Cho, E. Y., Park, M. S., Lee, K. B., Kim, H., & Kim, U. (2006) Polycystin-1 expression in fetal, adult and autosomal dominant polycystic kidney. *J Korean Med Sci*, 21, 425-429.
- Chapin, H. C., & Caplan, M. J. (2010) The cell biology of polycystic kidney disease. *J Cell Biol*, 191, 701-710.
- Chapin, H. C., Rajendran, V., & Caplan, M. J. (2010) Polycystin-1 surface localization is stimulated by polycystin-2 and cleavage at the G protein-coupled receptor proteolytic site. *Mol Biol Cell*, 21, 4338-4348.
- Chauvet, V., Qian, F., Boute, N., Cai, Y., Phakdeekitacharoen, B., Onuchic, L. F., et al. (2002) Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. *Am J Pathol*, 160, 973-983.
- Chauvet, V., Tian, X., Husson, H., Grimm, D. H., Wang, T., Hiesberger, T., et al. (2004) Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest*, 114, 1433-1443.

Cheng M, Zaman G, Rawlinson SC, Mohan S, Baylink DJ, Lanyon LE (1999) Mechanical strain stimulates ROS cell proliferation through IGF-II and estrogen through IGF-I, *J Bone Miner Res* 14:1742-50

Chiba M and Komatsu K (1993) Mechanical responses of the periodontal ligament in the transverse section of the rat mandibular incisor at various velocities of loading in vitro, *J Biomech* 26, 561–570.

Cillo JE, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ (2000) Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: Implications for distraction osteogenesis, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90: 147-54

Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-524.

Crump, C. M., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S. A., et al. (2001) PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J*, 20, 2191-2201.

Dalagiorgou, G., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2010) Polycystin-1: function as a mechanosensor. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1610-1613.

Dalagiorgou, G., Piperi, C., Georgopoulou, U., Adamopoulos, C., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2013) Mechanical stimulation of polycystin-1 induces human osteoblastic gene expression via potentiation of the calcineurin/NFAT signaling axis. *Cell Mol Life Sci*, 70, 167-180.

Delmas, P., Nauli, S. M., Li, X., Coste, B., Osorio, N., Crest, M., et al. (2004) Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J*, 18, 740-742.

Delmas, P., Nomura, H., Li, X., Lakkis, M., Luo, Y., Segal, Y., et al. (2002) Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem*, 277, 11276-11283.

Ducy P, Karsenty G, (1998) Genetic Control of Cell Differentiation in the Skeleton, *Curr Opin Cell Biol*, 10, 614-619.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G, (2000) The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance, *Science*, 289, 1501-1504.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell* 89:747–754.

Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. (1996) Targeted disruption of the mouse *Stat1* gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84:443-50.

Ehrlich PJ, Lanyon LE (2002) Mechanical Strain and Bone Cell Function: A Review, *Osteoporos Int* 13:688–700.

Felekkis K.N., Koupepidou P., Kastanos E., Witzgall R., Bai C.X., Li L., et al. (2008) Mutant polycystin-2 induces proliferation in primary rat tubular epithelial cells in a

Feng, S., Okenka, G. M., Bai, C. X., Streets, A. J., Newby, L. J., DeChant, B. T., et al. (2008) Identification and functional characterization of an N-terminal oligomerization domain for polycystin-2. *J Biol Chem*, 283, 28471-28479.

Ferreira, F. M., Oliveira, L. C., Germino, G. G., Onuchic, J. N., & Onuchic, L. F. (2011) Macromolecular assembly of polycystin-2 intracytosolic C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9833-9838.

Foggensteiner, L., Bevan, A. P., Thomas, R., Coleman, N., Boulter, C., Bradley, J., et al. (2000) Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the *PKD2* gene. *J Am Soc Nephrol*, 11, 814-827.

Forwood MR, Owan I, Takano Y, Turner CH (1996) Increased bone formation in rat tibiae after a single short period of dynamic loading in vivo, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270, 419–423.

Gao J., Zhou H., Lei T., Zhou L., Li W., Li X., et al. (2011) Curcumin inhibits renal cyst formation and enlargement in vitro by regulating intracellular signaling pathways. *Eur J Pharmacol*, 654:92-9

Geng, L., Burrow, C. R., Li, H. P., & Wilson, P. D. (2000) Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1535, 21-35.

Geng, L., Segal, Y., Peissel, B., Deng, N., Pei, Y., Carone, F., et al. (1996) Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest*, 98, 2674-2682.

Giamarchi, A., Feng, S., Rodat-Despoix, L., Xu, Y., Bubenshchikova, E., Newby, L. J., et al. (2010) A polycystin-2 (TRPP2) dimerization domain essential for the function of heteromeric polycystin complexes. *EMBO J*, 29, 1176-1191.

Goltzman D, (2002) Discoveries, Drugs and Skeletal Disorders, *Nature*, 1, 784-796.

Gosain AK, Song LS, Santoro T, Weihrauch D, Bosi BO, Corrao MA, Chilian WM (2000) Effects of Transforming Growth Factor-[beta] and Mechanical Strain on Osteoblast Cell Counts: An in Vitro Model for Distraction Osteogenesis, *Plastic & Reconstructive Surgery* 105:130-136

Gupta,S.,Yan,H.,Wong,L.H.,Ralph,S.,Krolewski,J.,Schindler,C., (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *EMBOJ*.15,1075-1084

Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Piontek, K., Tsiokas, L., et al. (2000) Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*, 408, 990-994.

Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M (1999) Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation, *J. Biol. Chem.* 274: 6972-6978.

Harter LV, Hruska KA, Duncan RL (1995) Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation, *Endocrinol* 136: 528-35

Hatton JP, Pooran M, Li C, Luzzio C, Hughes-Fulford M (2003) A Short Pulse of Mechanical Force Induces Gene Expression and Growth in MC3T3-E1 Osteoblasts via an ERK 1/2 Pathway, *Journal of Bone and Mineral Research* 18: 58-66.

Hidaka, S., Konecke, V., Osten, L., & Witzgall, R. (2004) PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J Biol Chem*, 279, 35009-35016.

Hoffmeister, H., Gallagher, A. R., Rasclé, A., & Witzgall, R. (2011) The human polycystin-2 protein represents an integral membrane protein with six membrane-spanning domains and intracellular N- and C-termini. *Biochem J*, 433, 285-294.

Hou B, Kolpakova-Hart E, Fukai N, Wu K, Olsen BR (2009) The polycystic kidney disease 1 (Pkd1) gene is required for the responses of osteochondrogenitor cells to midpalatal suture expansion in mice. *Bone* 44:1121-1133

Hou T., Ray S., Lee C., Brasier A.R. (2008) The STAT3 NH2-terminal domain stabilizes enhanceosome assembly by interacting with the p300 bromodomain. *J Biol Chem*.

Hughes, J., Ward, C. J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millan, J. L., et al. (1995) The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*, 10, 151-160.

Ibraghimov-Beskrovnya, O., Dackowski, W. R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L. R., et al. (1997) Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6397-6402.

Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C (1999) Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation, *Mol. Cell. Biol.* 19: 4431-4442.

Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, Turner E, Veltel D (1991) Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12:101-10

Jurczyk, A., Gromley, A., Redick, S., San Agustin, J., Witman, G., Pazour, G. J., et al. (2004) Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J Cell Biol*, 166, 637-643.

Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4:3139.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382:174-7.

Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, et al. (2000) Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 13:549-60.

Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Bitzer, E., Horie, S., Witzgall, R., et al. (2005) Lack of a laterality phenotype in Pkd1 knock-out embryos correlates with absence of polycystin-1 in nodal cilia. *Differentiation*, 73, 425-432.

Kim S, Koga T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, et al. (2003) Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes Dev* 17:197991.

Kim SJ, et al. (2007) Differential effect of FGF and PDGF on cell proliferation and migration in osteoblastic cells. *Growth Factors* 25, 77–86.

Kim, H., Kang, A.Y., Ko, A.R., Park, H.C., So, I., Park, J.H., Cheong, H.I., Hwang, Y.H., Ahn, C. (2013) Calpain-mediated Proteolysis of Polycystin-1 C-terminus Induces JAK2 and ERK signal Alterations. *Exp Cell Res.* 13, 452-7.

Kletsas D., Basdra E., Papavasileiou A., (2002) Effect of protein kinase inhibitors on the stretch -elicited c-Fos and c-Jun upregulation in human PDL osteoblast -like cells, *Journal of cellular physiology* 190: 313-321.

Klymenova, E., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Kugoh, H., Everitt, J., Xu, H., Kiguchi, K., et al. (2001) Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. *Mol Cell*, 7, 823-832.

Kolpakova-Hart E, McBratney-Owen B, Hou B, Fukai N, Nicolae C, Zhou J, et al. Growth of cranial synchondroses and sutures requires polycystin-1. *Dev Biol*, 321:407–19.

Kottgen, M., & Walz, G. (2005) Subcellular localization and trafficking of polycystins. *Pflugers Arch*, 451, 286-293.

Kottgen, M., Benzing, T., Simmen, T., Tauber, R., Buchholz, B., Feliciangeli, S., et al. (2005) Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J*, 24, 705-716.

Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., et al. (2002) Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol*, 4, 191-197.

Krane SM, (2005) Identifying genes that regulate bone remodelling as potential therapeutic targets, *JEM* 201, 841-3.

Kronenberg H, Kobayashi T, (2005) Transcriptional regulation in development of bone, *Endocrinology* 146, 1012-7.

Kunnumakkara A.B., Anand P., Aggarwal B.B. (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*, 269:199-225

Lantinga-van Leeuwen, I. S., Leonhard, W. N., Dauwerse, H., Baelde, H. J., van Oost, B. A., Breuning, M. H., et al. (2005) Common regulatory elements in the polycystic kidney disease 1 and 2 promoter regions. *Eur J Hum Genet*, 13, 649-659.

Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JW (1995) Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation, *Am J Physiol* 268, 318-27

Leonhard W.N., van der Wal A., Novalic Z., Kunnen S.J., Gansevoort R.T., Breuning M.H., et al. (2011) Curcumin inhibits cystogenesis by simultaneous interference of multiple signaling pathways: in vivo evidence from a Pkd1-deletion model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 300:F1193-202

Levy DE, Darnell JE, Jr.: Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002, 3:651-662.

Levy JB, Schindler C, Raz R, Levy DE, Baron R, Horowitz MC. (1996) Activation of the JAK-STAT signal transduction pathway by oncostatin-M cultured human and mouse osteoblastic cells. *Endocrinology* 137:1159-65.

Li, Q., Dai, Y., Guo, L., Liu, Y., Hao, C., Wu, G., et al. (2003) Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component. *J Mol Biol*, 325, 949-962.

Li, X., Luo, Y., Starremans, P. G., McNamara, C. A., Pei, Y., & Zhou, J. (2005) Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nat Cell Biol*, 7, 1202-1212.

Li, Y., Wright, J. M., Qian, F., Germino, G. G., & Guggino, W. B. (2005) Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem*, 280, 41298-41306.

Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*; 11:179-86.

Low S.H., Vasanth S., Larson C.H., Mukherjee S., Sharma N., Kinter M.T., et al. (2006) Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell*, 10:57-69

Lund T.C., Coleman C., Horvath E., Sefton B.M., Jove R., Medveczky M.M., Medveczky P.G. (1999) The Src-family kinase Lck can induce STAT3 phosphorylation and DNA binding activity. *Cell Signal*. 11:789-96

Luo, Y., Vassilev, P. M., Li, X., Kawanabe, Y., & Zhou, J. (2003) Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol*, 23, 2600-2607.

Ma, R., Li, W. P., Rundle, D., Kong, J., Akbarali, H. I., & Tsiokas, L. (2005) PKD2 functions as an epidermal growth factor-activated plasma membrane channel. *Mol Cell Biol*, 25, 8285-8298.

Markowitz, G. S., Cai, Y., Li, L., Wu, G., Ward, L. C., Somlo, S., et al. (1999) Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol*, 277, F17-25.

Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-42.

Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S. L., Veldhuisen, B., Saris, J. J., et al. (1996) PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 272, 1339-1342.

Murray DW, Rushton N (1990) The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: a new experimental method, *Calcif Tissue Int* 47: 35-9.

Nagata N, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. (2003) Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN-gamma possibly induced from non-T cell population. *Bone* 33:721-32.

Nauli S.M., Zhou J. (2004) Polycystins and mechanosensation in renal and nodal cilia. *Bioessays*, 26:844-56.

Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., et al. (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*, 33, 129-137.

Nauli, S. M., Kawanabe, Y., Kaminski, J. J., Pearce, W. J., Ingber, D. E., & Zhou, J. (2008) Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation*, 117, 1161-1171.

Newby, L. J., Streets, A. J., Zhao, Y., Harris, P. C., Ward, C. J., & Ong, A. C. (2002) Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J Biol Chem*, 277, 20763-20773.

Nims, N. M., Vassmer, D., & Maser, R. L. (2011) Effect of PKD1 gene missense mutations on polycystin-1 membrane topogenesis. *Biochemistry*, 50, 349-355.

Nims, N., Vassmer, D., & Maser, R. L. (2003) Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains. *Biochemistry*, 42, 13035-13048.

Oatley, P., Stewart, A. P., Sandford, R., & Edwardson, J. M. (2012) Atomic force microscopy imaging reveals the domain structure of polycystin-1. *Biochemistry*, 51, 2879-2888.

Olsan E.E., Mukherjee S., Wulkersdorfer B., Shillingford J.M., Giovannone A.J., Todorov G., et al. (2011) Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) inhibition suppresses renal cyst growth in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:18067-72

Ong, A. C. (2000) Polycystin expression in the kidney and other tissues: complexity, consensus and controversy. *Exp Nephrol*, 8, 208-214.

Ong, A. C., & Harris, P. C. (2005) Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex. *Kidney Int*, 67, 1234-1247.

Ong, A. C., Ward, C. J., Butler, R. J., Biddolph, S., Bowker, C., Torra, R., et al. (1999) Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol*, 154, 1721-1729.

O'Shea J.J., Gadina M., Schreiber R.D. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 109 Suppl:S121-S131.

Papachroni K.K., D.N. Karatzas, K.A. Papavassiliou, E.K. Basdra, A.G. Papavassiliou, Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease, *Trends in Molecular Medicine* 15 No.5

Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93:385-95. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. (1998) Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93:397-409.

Park C, Li S, Cha E, Schindler C. (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13:795-804.

Parnell, S. C., Magenheimer, B. S., Maser, R. L., & Calvet, J. P. (1999) Identification of the major site of in vitro PKA phosphorylation in the polycystin-1 C-terminal cytosolic domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 259, 539-543.

Parnell, S. C., Magenheimer, B. S., Maser, R. L., Rankin, C. A., Smine, A., Okamoto, T., et al. (1998) The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 625-631.

Parnell, S. C., Puri, S., Wallace, D. P., & Calvet, J. P. (2012) Protein phosphatase-1alpha interacts with and dephosphorylates polycystin-1. *PLoS One*, 7, e36798.

Patel, A., & Honore, E. (2010) Polycystins and renovascular mechanosensory transduction. *Nat Rev Nephrol*, 6, 530-538.

Pelletier S., Duhamel F., Coulombe P., Popoff M.R., Meloche S. (2003) Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Cell Biol*. 23:1316-33.

Petri, E. T., Celic, A., Kennedy, S. D., Ehrlich, B. E., Boggon, T. J., & Hodsdon, M. E. (2010) Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca²⁺-dependent regulation of polycystin-2 channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9176-9181.

Peverali F., Basdra E., Papavassiliou A., (2001) Stretch-mediated Activation of Selective MAPK Subtypes and Potentiation of AP-1 Binding in Human Osteoblastic Cells, *Molecular Medicine*, Volume 7(1): 68–78.

Priel-Halachmi S., Ben-Dor I., Shpungin S., Tennenbaum T., Molavani H., Bachrach M., Salzberg S., Nir U. (2000) FER kinase activation of Stat3 is determined by the N-terminal sequence. *J Biol Chem*. 275:28902-10.

Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, WatnickTJ, Zhou F, Germino GG (2002) Cleavage of polycystin requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16981–16986

Qian, F., Wei, W., Germino, G., & Oberhauser, A. (2005) The nanomechanics of polycystin-1 extracellular region. *J Biol Chem*, 280, 40723-40730.

Raisz GL (1999) Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling, *Clinical Chemistry* 45:8(B), 1353–1358.

Ramasubbu, K., Gretz, N., & Bachmann, S. (1998) Increased epithelial cell proliferation and abnormal extracellular matrix in rat polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 9, 937-945.

Robling AG, Hinant FM, Burr DB, Turner CH (2002) Improved Bone Structure and Strength After Long-Term Mechanical Loading Is Greatest if Loading Is Separated Into Short Bouts, *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 1545-1554.

Rodrig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, et al. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93:373-83.

Rundle, D. R., Gorbsky, G., & Tsiokas, L. (2004) PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: role of mDia1 IN PKD2 localization to mitotic spindles. *J Biol Chem*, 279, 29728-29739.

Scheffers, M. S., Le, H., van der Bent, P., Leonhard, W., Prins, F., Spruit, L., et al. (2002) Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells. *Hum Mol Genet*, 11, 59-67.

Scheffers, M. S., van der Bent, P., Prins, F., Spruit, L., Breuning, M. H., Litvinov, S. V., et al. (2000) Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum Mol Genet*, 9, 2743-2750.

Schindler C, Levy DE, Decker T. (2007) JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 282:20059-63.

Schneider, M. C., Rodriguez, A. M., Nomura, H., Zhou, J., Morton, C. C., Reeders, S. T., et al. (1996) A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2. *Genomics*, 38, 1-4.

Schroder, S., Fraternali, F., Quan, X., Scott, D., Qian, F., & Pfuhl, M. (2011) When a module is not a domain: the case of the REJ module and the redefinition of the architecture of polycystin-1. *Biochem J*, 435, 651-660.

Seo B., M. Miura, S. Gronthos, P. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P. G. Robey, C. Wang, S. Shi, (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet* 2004; 364: 149–55.

Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, et al. (2000) Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12 mediated T cell function. *Immunity*; 13:561-71.

Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, et al. (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-3.

STAT-1/p21-independent fashion accompanied instead by alterations in expression of p57KIP2 and Cdk2. *BMC Nephrol*, 9:10

Streets, A. J., Moon, D. J., Kane, M. E., Obara, T., & Ong, A. C. (2006) Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet*, 15, 1465-1473.

Tajima K, Takaishi H, Takito J, Tohmonda T, Yoda M, Ota N, et al. (2010) Inhibition of STAT1 accelerates bone fracture healing. *J Orthop Res* 28:937-41.

Takakura A., Nelson E.A., Haque N., Humphreys B.D., Zandi-Nejad K., Frank D.A., et al. (2011) Pyrimethamine inhibits adult polycystic kidney disease by modulating STAT signaling pathways. *Hum Mol Genet*. 20:4143-54

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, et al. (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-4.

Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, et al. (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-30.

Takenori K, Asako H, Junichiro I, Shigemitsu Y (2007) RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force, *Arch Oral Biol* 52: 244-50

Talbot, J. J., Shillingford, J. M., Vasanth, S., Doerr, N., Mukherjee, S., Kinter, M. T., et al. (2011) Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 7985-7990.

Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, et al. (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93:841-50.

Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, et al. (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382:171-4.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269, 230-234.

Torres, V. E., & Harris, P. C. (2009) Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int*, 76, 149-168.

Torres, V. E., Harris, P. C., & Pirson, Y. (2007) Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*, 369, 1287-1301.

Tsiokas, L., Kim, S., & Ong, E. C. (2007) Cell biology of polycystin-2. *Cell Signal*, 19, 444-453.

Tsuji K, Uno K, Xia Zhang G, Tamura M (2004) Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 and -2, *J Bone Miner Metab* 22: 94–103

Turner CH (1998) Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli, *Bone* 23:399–407.

Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, et al. (1997) Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:723944.

Varela, A., Piperi, C., Sigala, F., Agrogiannis, G., Davos, C.H., Andri, M.A., Manopoulos, C., Tsangaris, S., Basdra, E.K., Papavassiliou, A.G. (2015) Elevated expression of mechanosensory polycystins in human carotid atherosclerotic plaques: association with p53 activation and disease severity. *Sci Rep*, 5, 13461.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2006) RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease, *TRENDS* 12:17-25.

Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, Weedon H, Papangelis V, Beroukas D, et al. (2006) Expression of Jak3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:149-56.

Ward, C. J., Turley, H., Ong, A. C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., et al. (1996) Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1524-1528.

Wen X., Lin H.H., Shih H.M., Kung H.J., Ann D.K. (1999) Kinase activation of the non-receptor tyrosine kinase Etk/BMX alone is sufficient to transactivate STAT-mediated gene expression in salivary and lung epithelial cells. *J Biol Chem*. 274:38204-10

Xiao Z, et al. (2005) Selective Runx2-II deficiency leads to low-turnover osteopenia in adult mice. *Dev Biol*, 283, 345–356.

Xiao Z., Zhang S., Mahlios J., Zhou G., Magenheimer B.S., Guo D., Dallas S.L., Maser R., Calvet J.P., Bonewald L., Quarles L.D. (2006) Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* 281:30884–3089522.

Xiao, Z., Zhang, S., Magenheimer, B. S., Luo, J., & Quarles, L. D. (2008) Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II. *J Biol Chem*, 283, 12624-12634.

Xu, G. M., Gonzalez-Perrett, S., Essafi, M., Timpanaro, G. A., Montalbetti, N., Arnaout, M. A., et al. (2003) Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem*, 278, 1457-1462.

Yamada A, Takami M, Kawawa T, Yasuhara R, Zhao B, Mochizuki A, et al. (2007) Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. *Immunology* 120:573-9.

Yamamoto T, Kita M, Kimura I, Oseko F, Terauchi R, Takahashi K, Kubo T, Kanamura N (2006) Mechanical stress induces expression of cytokines in human PDL cells, *Oral Diseases* 12: 171-175.

Yu, Y., Ulbrich, M. H., Li, M. H., Buraei, Z., Chen, X. Z., Ong, A. C., et al. (2009) Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 11558-11563.

- Zelzer E, et al. (2005) Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr. Top. Dev. Biol.* 65, 169–187.
- Zhao, J., Hui, K. K., & Cao, H. X. (2011) [Inspiration of whole systems research and comparative effectiveness research to the clinical studies of Chinese medicine]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 31, 1157-1160.
- Zhou, J. (2009) Polycystins and primary cilia: primers for cell cycle progression. *Annu Rev Physiol*, 71, 83-113.
- Zhu, J., Yu, Y., Ulbrich, M. H., Li, M. H., Isacoff, E. Y., Honig, B., et al. (2011) Structural model of the TRPP2/PKD1 C-terminal coiled-coil complex produced by a combined computational and experimental approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10133-10138.
- Ziros P.G., Gil A.P., Georgakopoulos T., Habeos I., Kletsas D., Basdra E.K., Papavassiliou A.G. (2002) The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 277:23934–23941
- Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG, (2008) Runx2: of bone and stretch, *The Int J of Biochem & Cell Biol* 40: 1659–1663
- Ziros PG, Georgakopoulos T., Habeos I., Basdra EK, Papavassiliou AG, (2004) Growth Hormone Attenuates the Transcriptional Activity of Runx2 by Facilitating Its Physical Association With Stat3b, *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* Volume 19, Number 11, 2004