

Επαγωγή της οστεογένεσης μέσω μηχανοδιέγερσης του ειδικού οστεοβλαστικού μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1

ΣΚΟΠΟΣ. Ένας από τους σημαντικότερους στόχους της έρευνας σχετικά με την ομοίωση και διαφοροποίηση των οστικών κυττάρων είναι η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι μηχανικές δυνάμεις επηρεάζουν αυτές τις λειτουργίες. Μια σειρά από μελέτες δείχνουν ότι τα οστεοβλαστικά (οστεοσυνθετικά) κύτταρα αποκρίνονται στην άσκηση μηχανικών φορτίων μεταγράφοντας κατάλληλα σήματα, που τροποποιούν την έκφραση γονιδίων σχετικών με την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Θεμελιώδη ρόλο στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία έχει ο μεταγραφικός παράγοντας Cbfa1. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ.** Πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων οστεοβλαστικών κυττάρων υποβλήθηκαν σε μικρού βαθμού συνεχή μηχανική διέγερση, με τη χρήση μιας κατοχυρωμένης διεθνώς πειραματικής διάταξης εφαρμογής ελεγχόμενης μηχανικής τάσης. Τεχνικές ανάθυσης κατά Northern/ανοσοανίχνευσης κατά Western και δοκιμασίες μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, αναστολής της δράσης κινασών, αντίδρασης κινάσης σε pH-κτωμα και συν-ανοσοκαθίζησης χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί ο ρόλος του Cbfa1 στη μηχανο-μεταγωγή. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.** Η άσκηση φυσιολογικών επιπέδων μηχανικής τάσης σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα επάγει άμεσα την έκφραση αλληλά και την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA του Cbfa1. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να "ζυγοσταθμίζεται" από την επαγωγή της δράσης των MAP κινασών (MAPKs), μετά από μηχανική διέγερση. Συγκεκριμένα, η MAP κινάση ERK ενεργοποιείται μετά από μηχανική διέγερση, αλληλεπιδρά με τον Cbfa1 *in vivo* και πυροδοτεί τη δράση του μέσω φωσφορυλίωσης. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνδέουν για πρώτη φορά τη μηχανική διέγερση με τη διαδικασία της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Η ταυτοποίηση των ειδικών τροποποιητών και συμπαραγόντων που λειτουργούν σ' αυτό το κύκλωμα επαγωγής της μεταγραφής μετά από μηχανική διέγερση, αναμένεται να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου της μηχανικής τάσης στη φυσιολογία του οστού και μπορεί να θέσει τις βάσεις για μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις στις παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από απώλεια οστικής μάζας.

Από καιρό είναι γνωστό ότι η μηχανική διέγερση είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της ομοίωσης του οστού και καθοριστικός παράγοντας της μορφολογίας του σκελετού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και στην ενήλικη ζωή.¹ Η εμπλοκή της μηχανικής διέγερσης στις διαδικασίες της οστικής ανάπτυξης (αύξηση, οστεοποίηση και ανάπλαση) καταδεικνύουν τη σπουδαιότητα της κατανόησης της επίδρασης του μηχανικού φόρτου στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία. Μέχρι σήμερα λίγα είναι γνωστά, και αυτά ελλιπή ή αντιφατι-

κά, για τα μοριακά γεγονότα/μηχανισμούς που ενέχονται στη μετατροπή μηχανικών σημάτων σε βιοχημικές αποκρίσεις, οι οποίες απολήγουν σε γενετικό επαναπρογραμματισμό των οστικών κυττάρων.

Το οστό παράγεται από τους οστεοβλάστες, οι οποίοι προέρχονται από τα μεσεγχυματικά πολυδύναμα κύτταρα. Ο κύριος ρυθμιστής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Cbfa1, μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων runt.² Ο Cbfa1 προσδέεται στο cis-ρυθμιστικό στοιχείο OSE2,³

Π.Γ. Ζήρος,¹
Α.Π. Ρόχας Γκιλ,¹
Τ. Γεωργακόπουλος,¹
Ι. Χαμπαίος,¹
Δ. Κλήτσας,²
Ε.Κ. Μπάσδρα,³
Α.Γ. Παπαβασιλείου¹

¹Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

²Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αθήνα

³Τμήμα Ορθοδοντικής, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Χαϊδελβέργη, Γερμανία

Stimulation of osteogenesis
via mechanoinduction
of the osteoblastic transcription
factor Cbfa1

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Οστεοβλαστικό κύτταρο
Μηχανική διέγερση
MAP κινάση
ERK
Cbfa1

Α' Βραβείο
Επαθλο «Σ. Παπασταμάτης» 2002

που εδράζεται στην περιοχική του υποκινητή όλων των κύριων οστεο-ειδικών γονιδίων (οστεοκαλσίνη, κολλαγόνο τύπου I, οστική σιαλοπρωτεΐνη, οστεοποντίνη, αλκαλική φωσφατάση και κολλαγενάση-3), και μ' αυτόν τον τρόπο ελέγχει την έκφρασή τους.^{2,4,5} Είναι λοιπόν προφανές ότι η έκφραση του Cbfa1 αποτελεί γεγονός-κλειδί κατά τη διάρκεια της οστικής διαφοροποίησης και της σκελετογένεσης.⁶⁻⁹ Μέλη της οικογένειας των ομο-/ετεροδιμερών μεταγραφικών παραγόντων AP-1 παίζουν επίσης αποφασιστικό ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων που εκφράζονται νωρίς στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Έτσι, η έκφραση γονιδίων όπως οστεοκαλσίνης, κολλαγόνου τύπου I, οστεοποντίνης, αλκαλικής φωσφατάσης και κολλαγενάσης-3, που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του Cbfa1, εξαρτάται επίσης και από τους παράγοντες AP-1.¹⁰⁻¹²

Μια σειρά από ευρήματα προτείνουν ότι η σηματοδότηση μέσω των MAPKs είναι ουσιαστικής σημασίας για τα πρώιμα στάδια της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.¹³⁻¹⁷ Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η σηματοδότηση μέσω της ERK MAPK πυροδοτεί την έκφραση οστεοειδικών γονιδίων μετά από αλληλεπίδραση της εξωκυττάριας ουσίας με τον υποδοχέα της ιντεγκρίνης, καθώς και μετά από μηχανική πίεση.^{18,19} Πρόσφατα, με τη χρήση ενός κατοχυρωμένου στη διεθνή βιβλιογραφία συστήματος εφαρμογής μηχανικής τάσης (βλ. σχήμα στο Παράρτημα) σε πρωτογενή ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον περιοδοντικό σύνδεσμο (hPDL) [πρόδρομοι οστεοβλάστες-μοντέλα, που είναι ικανοί να διαφοροποιηθούν πλήρως (οστεοκύτταρα) σε απόκριση ποικίλων εξωκυττάριας ερεθισμάτων],²⁰⁻²² δειχθηκε ότι η εφαρμογή μικρής συνεχόμενης μηχανικής τάσης σ' αυτά επάγει ταχύτητα τα κύρια συστατικά στοιχεία του AP-1, τις πρωτεΐνες c-Jun και c-Fos, και αυξάνει την πρόσδεσή του στο DNA-στόχο του σε οστεο-ειδικά γονίδια, μέσω σηματοδότησης από το μονοπάτι των ERK/JNK MAPKs.^{23,24}

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με πρόσφατα στοιχεία που δείχνουν ότι το μονοπάτι των MAPKs μπορεί να ενεργοποιεί τον Cbfa1 *in vitro*,²⁵ μας οδήγησαν να διερευνήσουμε εάν και πώς η άσκηση μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα επηρεάζει την έκφραση και ενεργότητα του Cbfa1, καθώς επίσης και κατά πόσο οι MAPKs συμμετέχουν σ' αυτή τη διαδικασία.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τόσο το γονίδιο όσο και η πρωτεΐνη Cbfa1 είναι άμεσοι στόχοι του μηχανικού ερεθισμού σ' αυτά τα κύτταρα και μάλιστα με τρόπο που εξαρτάται ευθέως από το μονοπάτι των MAPKs.

Έτσι, θεμελιώνεται ένας σημαντικός κρίκος ανάμεσα στη λειτουργία ενός οστεο-ειδικού μεταγραφικού παράγοντα και τη μηχανική διέγερση/επαγωγή σε πρώιμα (αδιαφοροποίητα) ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα. Αυτό μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα χρήσιμο στο σχεδιασμό θεραπευτικών αγωγών που βασίζονται στην υποβοηθούμενη από μηχανική τάση οστεοσύνθεση, σε περιπτώσεις όπως η αποκατάσταση καταγμάτων ή η παθολογική οστεογένεση. Απ' όσο γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία που ένας φυσικός διεγέρτης, όπως η μηχανική πίεση, συνδέεται απευθείας με την ενεργοποίηση ενός -κλινικά σημαντικού- ιστο-ειδικού μεταγραφικού ρυθμιστή.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Γενικά

Τα υλικά και αντιδραστήρια για τις καλλιέργειες κυττάρων αγοράστηκαν από την Gibco. Τα [³²P]ATP (5.000 Ci/mmol), [³²P]dATP (3.000 Ci/mmol), Protein A-Sepharose (CL-4B) και 14C-μεθυλιωμένοι πρωτεϊνικοί μάρτυρες αγοράστηκαν από την Amersham, ενώ η T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (PNK) από την Boehringer Mannheim Biochemica. Το πλήρες cDNA του Cbfa1 (nt 1-1566) κλωνοποιημένο στο φορέα έκφρασης pGEM-3Zf+ παραχωρήθηκε από τον καθηγητή F. Otto (University of Freiburg Medical Center). Τα πολυκλωνικά αντισώματα εναντίον του Cbfa1 ήταν ευγενική προσφορά του Dr G. Karsenty (Baylor College of Medicine, Houston). Τα μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον της p-ERK (sc-7383: αλληλεπιδρά με τις φωσφορυλιωμένες ERK1 και ERK2) και p-JNK (sc-6254: αλληλεπιδρά με τις φωσφορυλιωμένες JNK1 και JNK2) και τα πολυκλωνικά αντισώματα εναντίον της ERK2 (sc-154: αλληλεπιδρά με τις ERK2p42 και, σε μικρότερο βαθμό, τις ERK1p44) και του Sp1 αγοράστηκαν από τη Santa Cruz Biotechnology. Οι αναστολείς κινασών U0126 και κουρκουμίνη προμηθεύτηκαν από την Calbiochem και Sigma Chemie, αντίστοιχα, και τα ολιγονουκλεοτίδια από το Εργαστήριο Μικροχημείας, FORTH (Κρήτη).

Κυτταροκαλλιέργειες

Τα hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν από πρωτογενείς καλλιέργειες ιστού από τον περιοδοντικό σύνδεσμο, όπως έχει ήδη περιγραφεί.²⁶ Κύτταρα hPDL καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, στο οποίο είχε προστεθεί 10% FBS. Όλα τα πειράματα έγιναν με κύτταρα από το 3ο έως το 6ο «πέρασμα», αφού πρώτα ελέγχθηκαν για τα οστεοβλαστικά χαρακτηριστικά τους.²¹ Τα κύτταρα Saos-2 (ανθρώπινο οστεοσάρκωμα) καλλιεργήθηκαν σε DMEM + 10% FBS και τα κύτταρα Jurkat (ανθρώπινα T-λεμφοβλαστικά) σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640, στο οποίο είχε προστεθεί 10% FBS.

Άσκηση μηχανικής πίεσης σε κύτταρα hPDL και προετοιμασία κυτταρικών εκκυλισμάτων

Περίπου 4×10^5 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ειδικά πιάτα των 50 mm που φέρουν εύκαμπτη επιφάνεια καλλιέργειας (Petriperm™) και καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν περίπου το 90% της πλήρους πυκνότητας στο θρεπτικό μέσο. Κατόπιν, το μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με DMEM + 0,1% FBS, για να διατηρηθούν τα κύτταρα αδρανή. 24 ώρες αργότερα, τα hPDL-κύτταρα υποβλήθηκαν σε φυσιολογικού βαθμού συνεχή μηχανική τάση, με τη χρήση ενός συστήματος εφαρμογής πίεσης που έχει περιγραφεί προηγουμένως^{23,24,26,27} (εικ. 1). Για έλεγχο, κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανική τάση (ακατέργαστα κύτταρα) καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες και για το μέγιστο χρόνο που ασκήθηκε μηχανική πίεση. Τα κύτταρα, μετά την άσκηση μηχανικής πίεσης, ξεπλύθηκαν με κρύο PBS και στη συνέχεια παρασκευάστηκαν συνολικά κυτταρικά ή πυρηνικά εκκυλίσματα. Συνολικά, κυτταρικά εκκυλίσματα παρασκευάστηκαν με τη χρήση διαλύματος SDS, όπως έχει περιγραφεί.²⁸ Πυρηνικά εκκυλίσματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με προηγούμενα,²⁹ με τη διαφορά ότι τα πυρηνικά ιζήματα εκκυλίστηκαν με 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 20% γλυκερόλη, 0,38 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 10 mM [Na₂]-β-γλυκεροφωσφορικό, 10 mM [Na₂]p-νιτροφαινολυφωσφορικό, 0,1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, 5 mg/mL απριτινίνη, 2 mg/mL πεπστατίνη και 2 mM DTT.

Εκχύλιση RNA και ανάλυση κατά Northern

Συνολικό RNA παρασκευάστηκε σύμφωνα με προηγούμενα.³⁰ Τα δείγματα RNA ηλεκτροφορήθηκαν, για να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθος σε πήκτωμα αгарόζης-φορμαλ-

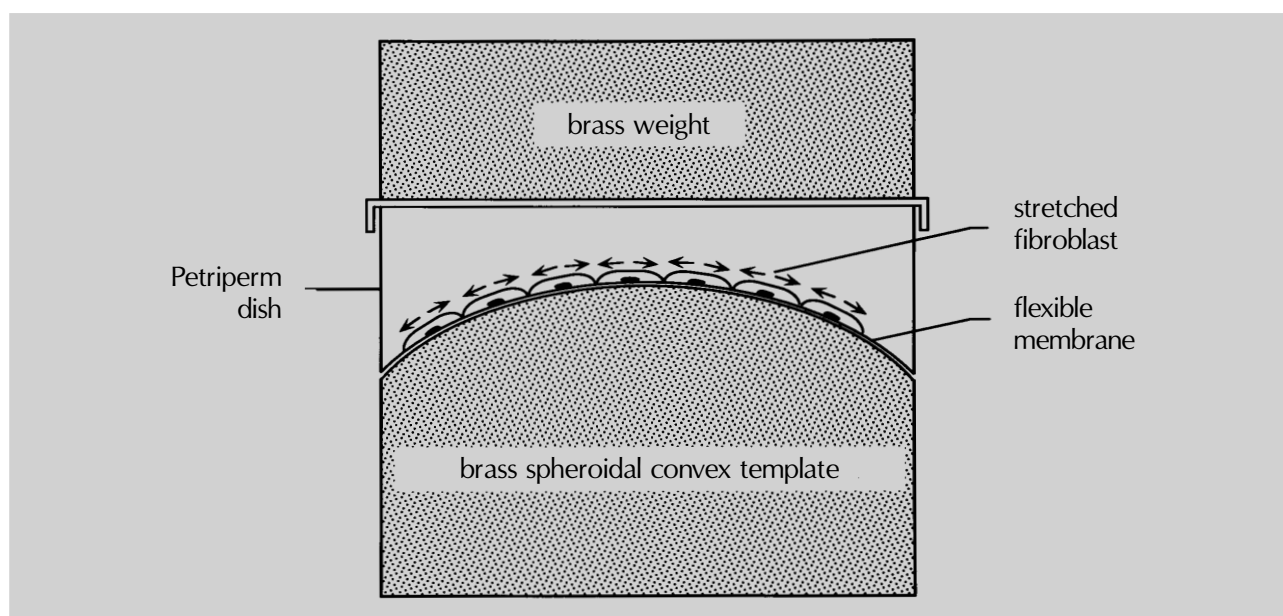
δεΐδης 1%, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πλαστική μεμβράνη Hybond-N. Το cDNA του Cbfa1 αποκόπηκε από τον pGEM-3Zf+, καθαρίστηκε από πήκτωμα αгарόζης και σημάνθηκε με [³²P]dATP με τη μέθοδο της χρήσης τυχαίων εκκινητών (random priming, Promega). Η υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή έγινε όπως έχει περιγραφεί.³¹

Ανοσοανίχνευση κατά Western

Τα πρωτεϊνικά εκκυλίσματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (10%) και ακολούθησε μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες επώαστηκαν σε διάλυμα Tris με την προσθήκη 5% BSA και Tween (TBST, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) και υβριδοποιήθηκαν με το πρώτο αντίσωμα, σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Ακολούθως, επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα που φέρει σε σύζευξη το ένζυμο HRP. Η ανίχνευση των ανοσοαντιδράσεων έγινε με το kit ανοσοφθορισμού (ECL) της Amersham. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης Cbfa1 έγινε σε πυρηνικά εκκυλίσματα με αραιώση του Cbfa1 ειδικού αντισώματος 1:1.000, ενώ η ανίχνευση των p-ERK, p-JNK και ERK2 έγινε σε συνολικά κυτταρικά εκκυλίσματα με αντίστοιχες αραιώσεις των ειδικών αντισωμάτων αντι-p-ERK (1:1.000), αντι-p-JNK (1:100) και αντι-ERK2 (1:2.000).

Δοκιμασίες μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSAs)

Οι ακολουθίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είτε ως ανιχνευτές είτε ως ανταγωνιστές, είναι οι παρακάτω: (α) άγριου τύπου Cbfa1 (wt Cbfa1) 5'-CGCAGCTC CCAACCACATATCCTCT-3', η οποία είναι πανομοιότυπη μ' αυτή που βρίσκεται στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου



Εικόνα 1. Πειραματική διάταξη εφαρμογής συνεχούς μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα.

της οστεοκαλσίνης (nt -141 έως -165) και περιλαμβάνει το μοτίβο OSE2 (AACCACA),³ (β) μεταλλαγμένο Cbfa1 (mut Cbfa1) 5'-CGCAGCTCCCAgaCACATATCCTCT-3'. Η διπλή έλικα του άγριου τύπου Cbfa1 ανιχνευτή σημάνθηκε με [γ -³²P]ATP με τη χρήση T4 PNK, σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα. Πυρηνικά εκκυλίσματα (5–10 mg πρωτεΐνης) αναμείχθηκαν με 3–5 × 10⁴ cpm ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή, σε μια αντίδραση συνολικού όγκου 20 mL, που περιελάμβανε 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 6% γλυκερόλη, 0,1% Nonidet P-40, 2 mM DTT, 50 mg/mL BSA και 1 mg poly[d(I-C)]. Για τα πειράματα ανταγωνισμού, 50 φορές περισσότερα μόρια μη σημασμένου wt ή mut Cbfa1 ολιγονουκλεοτιδίου προστέθηκαν στην αντίδραση ταυτόχρονα με τα προηγούμενα συστατικά. Για τη δοκιμασία υπερ-μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου ("super-shift" EMSA), 1 mL αντισώματος αντι-Cbfa1 ή αντι-Sp1 αναμείχθηκε στην αντίδραση, η οποία επωάστηκε για 30 min σε RT πριν από την προσθήκη του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή. Μετά την προσθήκη και του τελευταίου, ακολούθησε επώαση για 20 min σε RT και τελικά τα συμπλέγματα DNA-πρωτεΐνης αναλύθηκαν σε ένα μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 5%. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα 0,25 × TBE στα 125 V σε RT. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αποξηράνθηκε και εκτέθηκε σε κατάλληλο film στους -80 °C.

Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Cbfa1

Το ανθρώπινο cDNA του Cbfa1 αποκόπηκε από τον pGEM-3Zf+ και υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pQ32. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η σύντηξη του επιτόπου His6 στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Για τον καθαρισμό της υβριδικής πρωτεΐνης, κύτταρα από το στέλεχος M15 (pREP4) της *E. coli* μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pQ32-Cbfa1 και αυξήθηκαν σε μέγεθος στους 37 °C, μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει την οπτική πυκνότητα 0,6 στα 600 nm. Ακολούθησε επαγωγή με 1 mM IPTG (4 ώρες στους 30 °C). Τα κύτταρα, τέλος, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (4.000 g για 20 min) και το ίζημα υπέστη αποδιάταξη με 8 M ουρία, 0,1 M Na-φωσφορικό, pH 8,0, 1% Triton X-100. Η πρωτεΐνη Cbfa1 απομονώθηκε από ειδική στήλη (Ni-NTA) με χρωματογραφία συγγένειας σε συνθήκες που έχουν ήδη περιγραφεί.³²

Αντίδραση κινάσης στο πήκτωμα και δοκιμασίες συν-ανοσοκαθίζησης

Η αντίδραση κινάσης στο πήκτωμα έγινε αφού πρώτα συνολικά πρωτεϊνικά εκκυλίσματα (60 mg) αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου (10%). Σ' αυτό το πήκτωμα είχε συνπολυμεριστεί προηγουμένως η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Cbfa1 (100 mg/mL). Η υπόλοιπη διαδικασία έχει ήδη περιγραφεί.²³ Για τις ανοσοκαθιζήσεις, hPDL-κύτταρα λύθηκαν στο διάλυμα B (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 20 mM [Na₂]-β-

γλυκεροφωσφορικό, 0,1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF και κλασικοί αναστολείς πρωτεασών). Τα κυτταρικά εκκυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν (14.000 g για 20 min στους 4 °C) και 1 mg συνολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο 600 mL (διάλυμα B) αρχικά επωάστηκε με 50 mL σφαιριδίων Protein A-Sepharose. Για τις ανοσοκαθιζήσεις χρησιμοποιήθηκαν 5 mL (10 mg) αντισώματος αντι-Cbfa1 ή 50 mL (10 mg) αντισώματος αντι-p-ERK. Οι επωάσεις με τα τελευταία έγιναν για 12 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια, 50 μL σφαιριδίων Protein A-Sepharose προστέθηκαν και τα δείγματα αναμείχθηκαν με συνεχή περιστροφή σε ειδική πλάτφορμα για 6 ώρες στους 4 °C. Τα ανοσοσυμπλέγματα που απομονώθηκαν ξεπλύθηκαν με το διάλυμα B, δύο φορές με το διάλυμα C (50 mM Tris-HCl, pH 6,8) και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης πηκτώματος 4 × SDS. Οι πρωτεΐνες των ανοσοσυμπλεγμάτων που απομονώθηκαν αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδιου (10%). Στη συνέχεια, έγινε ανοσοανίχνευση κατά Western με αντισώματα εναντίον της p-ERK ή του Cbfa1.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μηχανική τάση αυξάνει την έκφραση του Cbfa1 σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα

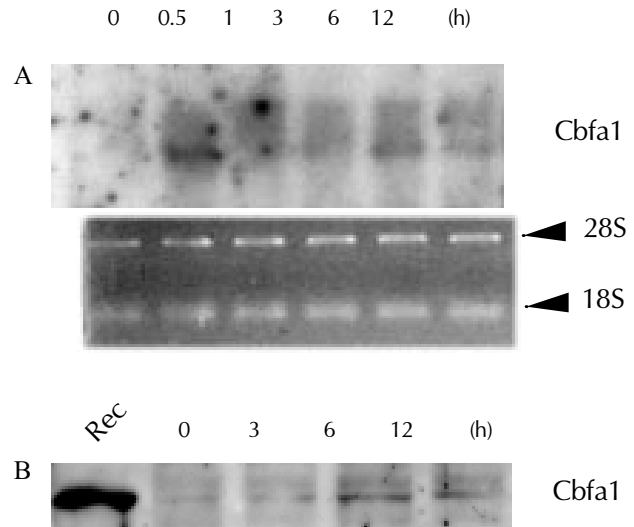
Είναι γνωστό ότι τα -αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά- hPDL-κύτταρα έχουν τη δυνατότητα πλήρους οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και για το λόγο αυτόν αποτελούν κύτταρα-μοντέλα για μελέτες τέτοιου είδους.²⁰⁻²² Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ο ειδικός οστεοβλαστικός μεταγραφικός παράγοντας Cbfa1 εκφράζεται σε PDL-ιστό θηλαστικών.^{33,34} Επιπλέον, τα hPDL-κύτταρα αποκρίνονται στην άσκηση μηχανικής τάσης με την έκφραση γονιδίων που πιστοποιούν δρομολόγηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.^{23,26,27,35} Με βάση τα ανωτέρω, θέσαμε το ερώτημα εάν η άσκηση μηχανικής τάσης στα κύτταρα αυτά επιδρά στην έκφραση του Cbfa1 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και/ή σε επίπεδο πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτόν απομονώθηκε συνολικό RNA από hPDL-κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε μηχανική πίεση για διαφορετικούς χρόνους (0–12 ώρες) και υποβλήθηκε σε ανάλυση κατά Northern. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2A, κύτταρα που δεν είχαν υποστεί μηχανική τάση (γραμμή «0») παρουσίαζαν οριακά ανιχνεύσιμη έκφραση του Cbfa1-mRNA. Τα επίπεδα αυτά αυξάνονταν θεαματικά μετά από 0,5 ώρες συνεχούς εφαρμογής μηχανικής τάσης και παρέμειναν αυξημένα μέχρι τις 12 ώρες. Σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις, ανιχνεύσαμε τουλάχιστον δύο ισομορφές του Cbfa1-mRNA, που έχουν αποδοθεί σε διαφορετική εκκίνηση της μεταγραφής πάνω στον υποκινητή του γονιδίου ή σε εναλλακτικό μάτισμα.^{36,37} Παρόλο που οι λειτουργικές διαφορές ανάμεσα

στις δύο ισομορφές δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί, έχει προταθεί ότι και οι δύο συμμετέχουν στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση με ξεχωριστές λειτουργίες.^{4,38} Κατά συνέπεια, η άσκηση μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα προκαλεί άμεση επαγωγή του Cbfa1-mRNA και η έκφραση αυτή παραμένει υψηλή για όσο χρόνο τα κύτταρα υπόκεινται σε μηχανική πίεση.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν αυτή η επαγωγή σε επίπεδο Cbfa1-mRNA ακολουθείται από αντίστοιχη αύξηση της Cbfa1-πρωτεΐνης. Έτσι, αδρανή hPDL-κύτταρα υποβλήθηκαν σε μηχανική πίεση για διαφορετικούς χρόνους (0–12 ώρες). Απ' αυτά, παρασκευάστηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα και ισοδύναμα ποσά συνολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν κατά Western. Αν και δεν βρέθηκε αύξηση της Cbfa1-πρωτεΐνης μέσα σε 1 ώρα μετά την εφαρμογή της τάσης (δεν δείχνονται τα σχετικά αποτελέσματα), μια μικρή αύξηση των επιπέδων της Cbfa1-πρωτεΐνης παρατηρήθηκε μετά από 3 ώρες συνεχούς εφαρμογής της. Η αύξηση αυτή έγινε μέγιστη στις 6 ώρες και έκτοτε παρέμεινε ανεπηρέαστη (εικ. 2B). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η εφαρμογή μηχανικής τάσης σε hPDL-κύτταρα έχει ως συνέπεια την επαγωγή της έκφρασης του οστεο-ειδικού μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Η μηχανική τάση διεγείρει το δυναμικό πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA-στόχο του

Ο Cbfa1 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον οστεοβλαστικό φαινότυπο, μέσω της πρόσδεσής του στις ειδικές αλληλουχίες DNA-στόχους, που εδράζονται στην περιοχή του υποκινητή των εν λόγω γονιδίων.^{9,39} Έτσι, το ερώτημα που θέσαμε ήταν εάν η μηχανική τάση επάγει την ικανότητα πρόσδεσης του Cbfa1 στους DNA-στόχους του. Για το λόγο αυτόν, κατασκευάστηκε ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο 25 βάσεων, που περιλαμβάνει το μοτίβο πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA (OSE2), όπως αυτό απαντάται στον υποκινητή της οστεοκαλσίνης, ενός γονιδίου που επάγεται από τον Cbfa1.^{3,40} Το ολιγονουκλεοτίδιο αυτό ραδιοσημάνθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής σε πειράματα μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA), που έγιναν με πυρηνικά εκχυλίσματα από hPDL-κύτταρα, τα οποία είχαν υποβληθεί σε μηχανική πίεση για 0–12 ώρες (εικ. 3A). Ένα σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε σε μικρή ποσότητα σε κύτταρα που δεν είχαν υποβληθεί σε μηχανική πίεση. Η ποσότητα του συμπλόκου αυξήθηκε θεαματικά ανάμεσα στις 0,5 και 6 ώρες συνεχούς εφαρμογής μηχανικής τάσης. Η μέγιστη ικανότητα πρόσδε-



Εικόνα 2. Η άσκηση μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα επάγει την έκφραση του Cbfa 1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης. Αδρανή κύτταρα hPDL υποβλήθηκαν σε μηχανική τάση, όπως έχει περιγραφεί στις πειραματικές διαδικασίες. (A) Στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές, συνολικό RNA απομονώθηκε, διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση (20 μg/δείγμα) και μεταφέρθηκε σε νύλιν μεμβράνη, που επωάστηκε με ραδιοσημασμένο ανθρώπινο Cbfa 1 cDNA ανιχνευτή. Η αγκύλη υποδεικνύει τις ισομορφές του Cbfa1. Γέλη αгарόζης βαμμένη με βρωμιούχο αιθίδιο συμπεριλαμβάνεται, για να επιβεβαιώσει ότι φορτώθηκαν ίσα ποσά RNA. (B) Πυρηνικά εκχυλίσματα από αρχικά αδρανή κύτταρα hPDL, που εκτέθηκαν σε μηχανική τάση για τους αναγραφόμενους χρόνους, υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (20 μg πρωτεΐνης/δείγμα) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF, η οποία τελικά επωάστηκε με αντίσωμα κατά του Cbfa1. Ανασυνδυασμένη Cbfa1-πρωτεΐνη (Rec) συμπεριλαμβάνεται για επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντισώματος, αλλά και του μεγέθους της ανθρώπινης Cbfa1. Η γραμμή "0" παντού αναφέρεται σε ακατέργαστα κύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά που υπέστησαν μηχανική τάση, για το μέγιστο χρόνο εφαρμογής της τελευταίας (12 ώρες).

σης παρατηρήθηκε στις 6 ώρες, που αντιστοιχεί στο χρονικό σημείο στο οποίο παρατηρήσαμε και τη μέγιστη επαγωγή της Cbfa1-πρωτεΐνης (εικ. 2B). Η προσθήκη περίσσειας μη ραδιενεργού (ψυχρού), άγριου τύπου και μεταλλαγμένου, OSE2 ολιγονουκλεοτιδίου στην αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου επιβεβαίωσε την ειδικότητά του (εικ. 3B, γραμμές 2–4).

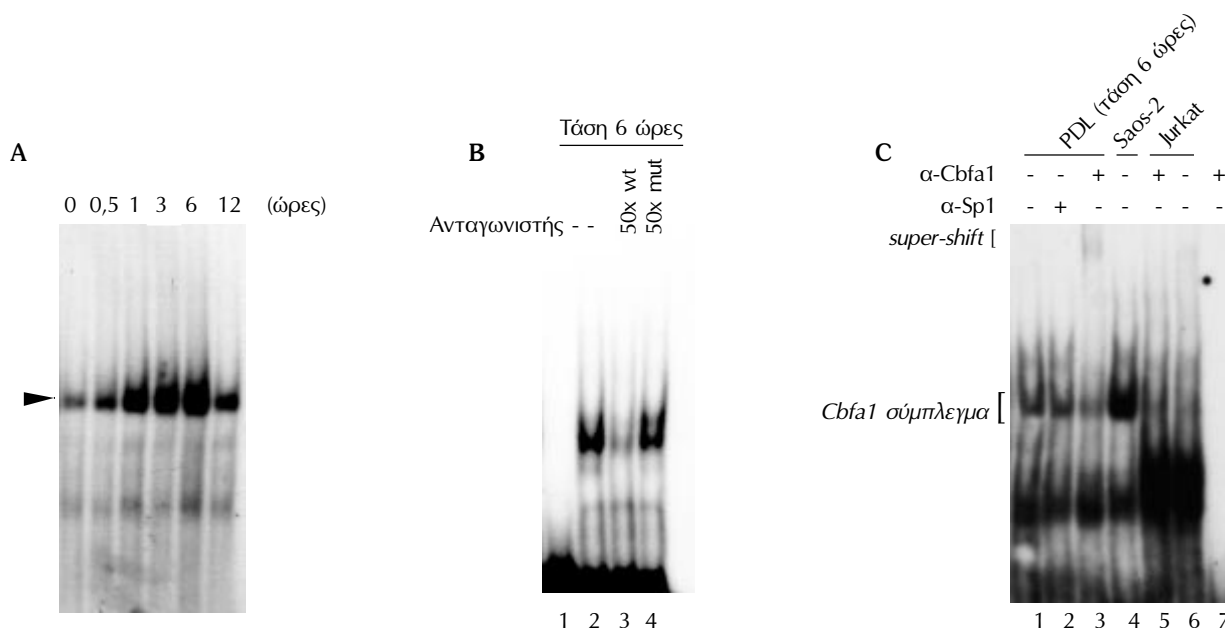
Για να ταυτοποιήσουμε την παρουσία του Cbfa1 σ' αυτό το ειδικό σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης, προχωρήσαμε σ' ένα πείραμα υπερ-μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου («super-shift» EMSA) (εικ. 3C). Η προσθήκη αντισώματος αντι-Cbfa1 στην αντίδραση σχηματισμού συμπλόκου DNA-πρωτεΐνης, που έγινε σε πυρηνικά εκχυλίσματα από hPDL-κύτταρα τα οποία είχαν υποβληθεί σε μηχανική τάση για 6 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα την «καθυστέρωση» της κινητικότητας ενός μέ-

ρους του εν λόγω συμπλόκου στο πίκτωμα και την ταυτόχρονη σημαντική μείωση της ποσότητάς του στην προηγούμενη θέση του (εικ. 3C, γραμμές 1 και 3). Αντίθετα, η προσθήκη αντισώματος για τον απαντώμενο σε όλους τους κυτταρικούς τύπους μεταγραφικό παράγοντα Sp1 δεν είχε καμία επίδραση στο σχηματισμό/κινητικότητα του συμπλόκου (εικ. 3C, γραμμές 1-2). Είναι αξιοσημείωτο ότι το σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης, που παρατηρήσαμε σε εκχυλίσματα από κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε μηχανική πίεση και το οποίο περιέχει τον Cbfa1, εμφανίζει την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα μ' αυτό που σχηματίζεται σε εκχυλίσματα από καλλιεργημένα κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (ώριμοι οστεοβλάστες) Saos-2 (εικ. 3C, γραμμές 1 και 4). Σε αντιδιαστολή, αντιδράσεις πρόσδεσης με εκχυλίσματα από κύτταρα Jurkat (ανθρώπινα T-λεμφοβλαστικά), που είναι γνωστό ότι δεν εκφράζουν τον Cbfa1,⁴¹ δεν οδηγούν στο σχηματισμό του ειδικού Cbfa1-DNA συμπλόκου. Αντ' αυτού εμφανί-

ζεται ένα άλλο σύμπλοκο, που παρουσιάζει μια διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα (τρέχει πιο γρήγορα στο πίκτωμα), η οποία δεν αλλάζει με την προσθήκη του αντι-Cbfa1 αντισώματος (εικ. 3C, γραμμές 1 και 5-6).

Επαγωγή του μονοπατιού των MAPKs σε hPDL-κύτταρα μετά από μηχανική διέγερση

Πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η εφαρμογή μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα επάγει τη δράση ορισμένων MAPKs που έχουν ως στόχο το μεταγραφικό παράγοντα AP-1.²³ Με βάση αυτή την παρατήρηση, διερευνήσαμε εάν η παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης του Cbfa1 σε hPDL-κύτταρα που έχουν υποστεί μηχανική πίεση συμβαδίζει με τη συσσώρευση των ενεργών μορφών συγκεκριμένων MAPKs. Συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από αρχικώς αδρανή hPDL-κύτταρα, που υποβλήθηκαν σε μηχανική τάση

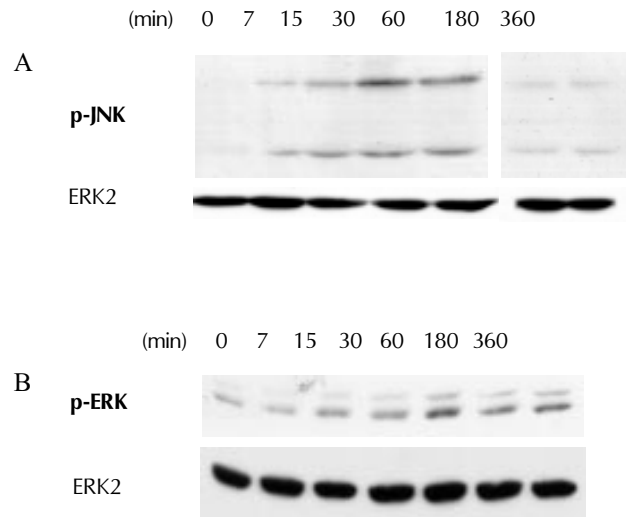


Εικόνα 3. Η άσκηση μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα επάγει δυναμικό πρόσδεσης του Cbfa1 στον DNA-στόχο του. (A) Μηχανική τάση εφαρμόστηκε σε αδρανή κύτταρα hPDL για τους χρόνους που αναγράφονται. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα και ίσα ποσά συνολικής πρωτεΐνης (10 μg) αναλύθηκαν ως προς την ικανότητα του Cbfa1 για πρόσδεση στον DNA-στόχο του με τη δοκιμασία EMSA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής ένα ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, που περιλαμβάνει την ανθρώπινη αλληλουχία OSE2. Στη συνέχεια, το πίκτωμα αποξηράνθηκε και εκτέθηκε για αυτοραδιογραφία. Η γραμμή “0” αναφέρεται σε ακατέργαστα κύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά που υπέστησαν μηχανική τάση, για το μέγιστο χρόνο εφαρμογής της τελευταίας (12 ώρες). (B) Τα πειράματα ανταγωνισμού πρόσδεσης έγιναν παρουσία περίσσειας (50 φορές) μορίων μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου OSE2, άγριου (wt) ή μεταλλαγμένου (mut) τύπου (γραμμές 2-4) και με πυρηνικά εκχυλίσματα από hPDL-κύτταρα που υπέστησαν μηχανική τάση για 6 ώρες. Η γραμμή “1” αναφέρεται στο ελεύθερο DNA. (C) Η δοκιμασία υπερ-μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (“super-shift” EMSA) έγινε με πυρηνικά εκχυλίσματα από hPDL-κύτταρα που υπέστησαν μηχανική τάση για 6 ώρες και τα οποία επώαστηκαν με αντίσωμα εναντίον του Cbfa1 ή εναντίον του Sp1 (α-Cbfa1 και α-Sp1, αντίστοιχα: γραμμές 1-3). Πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα Saos-2, που εκφράζουν έντονα τον Cbfa, συμπεριελήφθησαν, για να επιβεβαιώσουν τη θέση του ειδικού συμπλέγματος DNA-πρωτεΐνης (γραμμή 4). Πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα Jurkat (που δεν εκφράζουν τον Cbfa1) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (γραμμές 5-6). Το σύμπλεγμα που υπέστη υπερ-μεταβολή ηλεκτροφορητικής κινητικότητας εμφανίστηκε εκεί όπου υπήρχε αντι-Cbfa1 αντίσωμα (γραμμή 3: η θέση του υποδεικνύεται με την αγκύλη), ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε ο σχηματισμός του συμπλέγματος DNA-πρωτεΐνης. Η γραμμή “7” αναφέρεται στο ελεύθερο DNA.

για 0–360 min και η παρουσία των ενεργών (φωσφορυλιωμένων: p-) μορφών των JNK και ERK (p-JNK και p-ERK, αντίστοιχα) ελέγχθηκε με ανάλυση κατά Western. Μια άμεση επαγωγή και των δύο JNK ισομορφών (JNK1 και JNK2: 46 και 54/55 kDa, αντίστοιχα) παρατηρήθηκε μέσα στα πρώτα 7 min, η οποία έφτασε στο μέγιστο 30 min μετά την εφαρμογή της μηχανικής τάσης. Τα επίπεδα αυτά μειώθηκαν στα 60 min και έκτοτε παρέμειναν χαμηλά, αλλά σε ποσά που ήταν ανιχνεύσιμα ακόμα και 360 min μετά την εφαρμογή της τάσης (εικ. 4A). Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα υπήρξε όταν παρατηρήσαμε τις p-ERK ισομορφές [42 (ERK2) και 44 (ERK1) kDa, αντίστοιχα] κάτω από τις ίδιες συνθήκες, με διαφορετική όμως κινητική ενεργοποίησης: και οι δύο ενεργοποιημένες ERK ανιχνεύτηκαν σε υψηλά επίπεδα, ακόμα και μετά από 360 min εφαρμογής της μηχανικής τάσης (εικ. 4B). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενα ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία η διέγερση των hPDL-κυττάρων μέσω άσκησης μηχανικής τάσης οδηγεί σε σημαντική και γρήγορη αύξηση της ενεργότητας των JNK2 και ERK2, που στοχεύει στο μεταγραφικό παράγοντα AP-1.²³ Σημαντικότερα, αποκαλύπτουν μια διαφορετική κινητική στην ενεργοποίηση των MAPKs μετά από μηχανική διέγερση. Έτσι, η ενεργοποίηση των ERKs φαίνεται να διαρκεί περισσότερο χρόνο, ενώ αυτή των JNKs εμφανίζεται να είναι σχετικά παροδική. Δεδομένου ότι οι MAPKs ενέχονται –άμεσα ή έμμεσα– στη μετάδοση σημάτων που δρομολογούν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση,^{13–17} τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την άποψή μας ότι η εφαρμογή μηχανικής τάσης προάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση σε hPDL-κύτταρα μέσα από τη διαφορετική κινητική ενεργοποίησης (και, συνεπώς, status των μορίων-στόχων) συγκεκριμένων MAPKs.²³

Η ενεργοποίηση των MAPK συμπίπτει με την αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA-στόχο του σε μηχανοδιεγερμένα hPDL-κύτταρα

Για να αποσαφηνίσουμε το ρόλο των MAPKs στη μετά από άσκηση μηχανικής τάσης επαγωγή της ικανότητας πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA-στόχο του σε hPDL-κύτταρα, προχωρήσαμε σε πειράματα αναστολής της ενεργότητας αυτών των κινασών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο ευρύτατα γνωστοί ειδικοί αναστολείς των MAPKs, ο U0126, ένας πολύ ισχυρός και ειδικός αναστολέας της MEK (κινάσης που δρα πριν από τις ERK1/2 στο μονοπάτι των MAPKs) και συνεπώς των ERKs,^{42,43} και η κουρκουμίνη, η οποία παρεμποδίζει, αν και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, την ενεργοποίηση



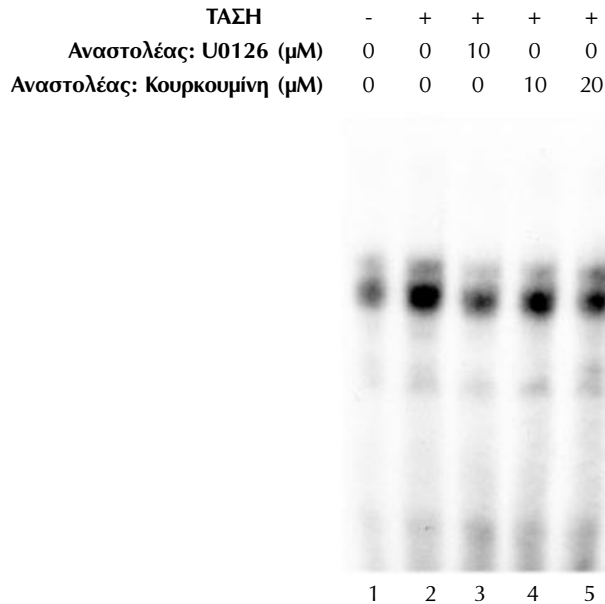
Εικόνα 4. Κινητική της ενεργοποίησης των JNK και MAPK σε κύτταρα hPDL που έχουν υποστεί μηχανική τάση. Αδρανή κύτταρα hPDL σε μηχανική τάση και συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. Ίσα ποσά συνολικής πρωτεΐνης (50 μg) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE/ανάλυση κατά Western με τη χρήση αντι-p-JNK αντισώματος (A: Οι κεφαλές βελών υποδεικνύουν τις δύο JNK ισομορφές (46 και 55 kDa) ή αντι-p-ERK αντισώματος (B: Οι κεφαλές βελών υποδεικνύουν τις δύο ERK ισομορφές (42 και 44 kDa). Ως εσωτερικός μάρτυρας, και οι δύο μεμβράνες απο-υβριδοποιήθηκαν και στη συνέχεια επωάστηκαν με αντι-ERK2 αντίσωμα (βέλος στα A και B). Η γραμμή “0” αναφέρεται σε ακατέργαστα κύτταρα, τα οποία καλλιιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά που υπέστησαν μηχανική τάση, για το μέγιστο χρόνο εφαρμογής της τελευταίας (6 ώρες).

τόσο των JNKs όσο και των ERKs.⁴⁴ Αδρανή hPDL-κύτταρα επωάστηκαν με τους προαναφερθέντες αναστολείς –σε δόσεις που δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα– επί 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε μηχανική πίεση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά υποβλήθηκαν σε μηχανική τάση για 6 ώρες, χρονικό σημείο όπου καταγράφηκε το μέγιστο της ικανότητας του Cbfa1 για πρόσδεση στο DNA-στόχο του (εικ. 3), και απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα, τα οποία αναλύθηκαν με τη δοκιμασία EMSA όπως προηγούμενως. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην εικόνα 3, ο σχηματισμός Cbfa1-DNA συμπλόκου αυξάνεται σημαντικά σε εκχυλίσματα από hPDL-κύτταρα που έχουν υποστεί μηχανική τάση (εικ. 5, γραμμές 1–2). Προηγούμενη επεξεργασία των κυττάρων με U0126 οδηγεί σε καθαρή μείωση της ικανότητας σχηματισμού του Cbfa1-DNA συμπλόκου μετά την εφαρμογή μηχανικής τάσης (εικ. 5, γραμμές 2–3), σχεδόν στα επίπεδα των μη διεγερμένων μηχανικά κυττάρων (εικ. 5, γραμμή 1). Από την άλλη πλευρά, επεξεργασία των κυττάρων με μικρή δόση κουρκουμίνης (10 μM) οδηγεί σε μικρή μείωση της ικανότη-

τας σχηματισμού του συμπλόκου, η οποία είναι ελαφρώς προφανέστερη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (20 mM) (εικ. 5, γραμμές 2 και 4–5). Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες η κουρκουμίνη αναστέλλει τη δράση των μεν JNKs με IC_{50} 5–10 μ M, των δε ERKs σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (IC_{50} 20 μ M),⁴⁴ καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ελάττωση που παρατηρήθηκε στην ικανότητα σχηματισμού του Cbfa1-DNA συμπλόκου οφείλεται μάλλον στην αναχαίτιση της δράσης των ERKs παρά σ' αυτή των JNKs. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την κινητική της επαγωγής των JNKs/ERKs (εικ. 4), υποδηλώνουν ότι το μεταγωγικό μονοπάτι των ERK –και σε σαφώς μικρότερο βαθμό αυτό των JNK– MAPKs ενέχεται στην αυξημένη ικανότητα του Cbfa1 να προσδέεται στο DNA-στόχο του μετά από μηχανική διέγερση.

Φωσφορυλίωση του Cbfa1 από μηχανο-επαγόμενες MAPKs σε hPDL-κύτταρα

Οι συνέπειες της αναστολής της δράσης των ERKs/JNKs στην ικανότητα πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA-στόχο του μας ώθησαν να εξετάσουμε εάν αυτές οι κινήσεις είναι υπεύθυνες για πιθανή φωσφορυλίωση του Cbfa1 μετά από μηχανική διέγερση. Έτσι, προχωρήσαμε σε μια αντίδραση κινάσης στο πίκτωμα (in-gel kinase assay), στην οποία Cbfa1-πρωτεΐνη που εκφράστηκε και καθαρίστηκε από βακτήρια χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα. Στο σχετικό πίκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, όπου είχε συν-πολυμεριστεί η ανασυνδυασμένη Cbfa1-πρωτεΐνη, αναλύθηκαν ισόποσα κυτταρικά εκχυλίσματα από hPDL-κύτταρα που είχαν υποστεί μηχανική τάση για 0–360 min. Για την αντίδραση, μετά από ένα βήμα επαναδιάταξης των πρωτεϊνών, το πίκτωμα επώαστηκε κατάλληλα με [γ -³²P]ATP και τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από αυτορραδιογραφία (εικ. 6). Ανεπαίσθητη ενεργότητα κινάσης παρατηρήθηκε σε κύτταρα που δεν είχαν υποστεί μηχανική διέγερση (γραμμή «0»). Σε αντίθεση, τρεις διαφορετικές ζώνες (bands) εμφανίστηκαν στα εκχυλίσματα από κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε μηχανική τάση. Αυτές αντιστοιχούν περίπου στα μοριακά μεγέθη 60, 55 και 44/42 kDa (εικ. 6). Η ζώνη που αντιστοιχεί στα 60 kDa αντιπροσωπεύει μια άγνωστη κινάση, που μπορεί να φωσφορυλιώσει τον Cbfa1, και έτσι δεν μας απασχόλησε περαιτέρω. Τα μοριακά μεγέθη των άλλων δύο ζωνών αντιστοιχούν στις μοριακές μάζες των πολύ καλά χαρακτηρισμένων MAPKs, JNK2 και ERK1/2, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον δε το γεγονός ότι η κινητική ενεργοποίησης της κινάσης που αντιστοιχεί στα 44/



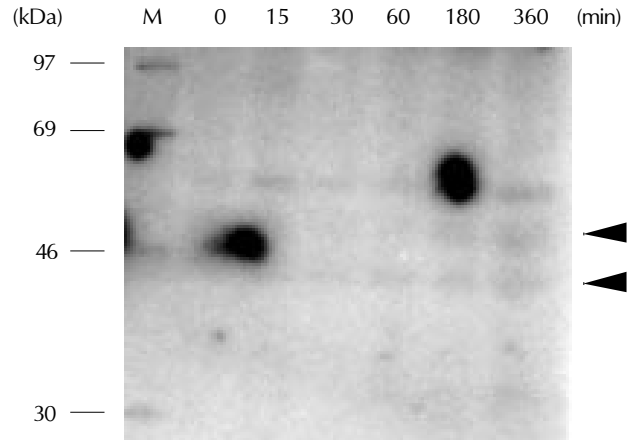
Εικόνα 5. Αποτελέσματα της δράσης των αναστολέων των MAPKs στο μηχανο-επαγόμενο δυναμικό του Cbfa1 για πρόσδεση στον DNA-στόχο του σε κύτταρα hPDL. Αδρανή κύτταρα hPDL επώαστηκαν με τους αναστολείς των MAPKs U0126 (γραμμή 3) ή κουρκουμίνη (γραμμές 4 και 5), στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (σε μ M). Μία ώρα μετά, στα κύτταρα αυτά ασκήθηκε μηχανική τάση για 6 ώρες (+). Πυρηνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και ίσα ποσά πρωτεΐνης (8 μ g) αναλύθηκαν ως προς την ικανότητα του Cbfa1 να προσδέεται στον DNA-στόχο του με τη δοκιμασία EMSA. Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής ήταν ο ίδιος μ' αυτόν της εικόνας 3 (OSE2). Στις γραμμές "1" και "2": Αντιδράσεις πρόσδεσης στο DNA, που έγιναν με πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα που δεν υπέστησαν μηχανική τάση (-) και από κύτταρα που υπέστησαν μηχανική τάση για 6 ώρες, αντίστοιχα, χωρίς την προηγούμενη προσθήκη αναστολέων MAPK. Κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανική τάση καλλιιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά που υπέστησαν μηχανική τάση, για το μέγιστο χρόνο εφαρμογής της τελευταίας (6 ώρες).

42 kDa φαίνεται να ακολουθεί την κινητική της επαγωγής που έχουμε ήδη παρατηρήσει για τις ERK1/2 (εικ. 4B). Από την άλλη πλευρά, μια παρόμοια συσχέτιση δεν ήταν εμφανής ανάμεσα στη φωσφορυλίωση του Cbfa1 από την (ενεργοποιημένη) κινάση των 55 kDa και το αντίστοιχο προφίλ επαγωγής των JNKs στην ίδια ανάλυση (εικ. 4A). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει άμεση λειτουργική σύνδεση ανάμεσα στην ενεργοποίηση των ERKs –και σ' ένα μικρότερο βαθμό των JNKs– και στην πυροδοτούμενη από τη μηχανική διέγερση φωσφορυλίωση του Cbfa1.

Για να αποδείξουμε ότι η κινάση που φωσφορυλιώνει τον Cbfa1 και αντιστοιχεί στα 44/42 kDa είναι πράγματι η p-ERK1/2, προχωρήσαμε σε πειράματα συν-ανοσοκαθίζησης. Για το σκοπό αυτόν, ισοδύναμες ποσότητες συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από hPDL-κύτταρα,

που είχαν υποβληθεί ή όχι σε μηχανική τάση για 6 ώρες, επωάστηκαν με αντίσωμα είτε εναντίον του Cbfa1 είτε εναντίον της p-ERK1/2. Οι πρωτεΐνες που προέκυψαν από τη συν-ανοσοκαθίζηση ελέγχθηκαν για την παρουσία των ενεργοποιημένων ERKs ή του Cbfa1, αντίστοιχα, με ανάλυση κατά Western, χρησιμοποιώντας αντι-p-ERK1/2 ή αντι-Cbfa1 αντισώματα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, η p-ERK και ο Cbfa1 συν-ανοσοκαθίζαν σε κύτταρα που έχουν υποστεί μηχανική τάση (+), ενώ οριακά ανιχνεύσιμα επίπεδα της ενεργοποιημένης κινάσης (αριστερό στύπωμα στην εικόνα) και σχεδόν ασήμαντα ποσά του μεταγραφικού παράγοντα (επάνω μεσαίο στύπωμα στην εικόνα) παρατηρούνται σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε μηχανική διέγερση (-). Το τελευταίο είναι σύμφωνο με την υπολειμματική ενεργότητα της p-ERK και την αυτόχθονη ικανότητα πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA-στόχο του σε κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μηχανική τάση, όπως έχουμε ήδη περιγράψει (εικόνες 3B και 2A, αντίστοιχα). Η πιστότητα των παρατηρηθεισών αλληλεπιδράσεων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με έκπλυση του στυπώματος στο οποίο είχε διαγνωστεί η παρουσία του Cbfa1 και επαναϊβριδοποίησή του με αντίσωμα εναντίον της ERK2 [εικ. 7, κάτω μεσαίο στύπωμα (μικρό ένθετο)]. Πέρα από την ποσοτική επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης, η ειδικότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε σ' αυτό το Western (βλ. πειραματικές διαδικασίες) υπέδειξε ότι η ενεργοποιημένη ERK2 (p-ERK2) είναι η κυρίαρχη υποψήφια κινάση που συμμετέχει στο Cbfa1-p-ERK πρωτεϊνικό σύμπλοκο *in vivo*. Αντίθετα, δεν μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε την παρουσία της p-JNK στις ίδιες ανοσοκαθιζήσεις (δεν δείχνονται τα σχετικά αποτελέσματα). Φυσικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να αλληλεπιδρά η p-JNK2 (που αντιστοιχεί στα 55 kDa στην εικόνα 6) με τον Cbfa1, μια και το μοριακό της μέγεθος σ' αυτά τα εκχυλίσματα βρίσκεται μέσα στο εύρος του ηλεκτροφορητικού μετώπου των IgGs.

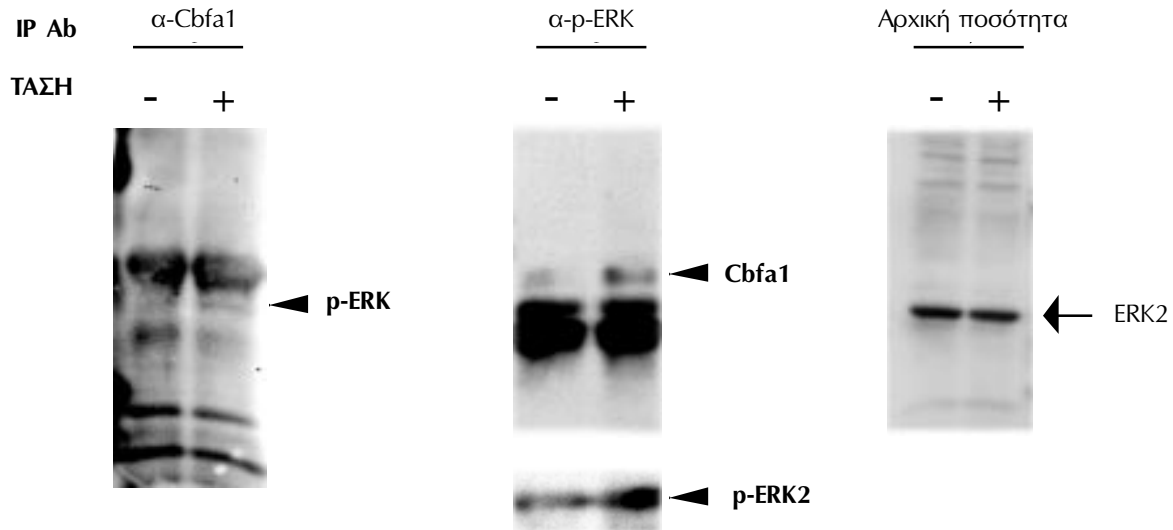
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν, για πρώτη φορά, ότι ο ενδογενής Cbfa1 αλληλεπιδρά φυσικά με την ενεργοποιημένη ERK και ότι η αλληλεπίδραση αυτή, που οδηγεί, σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις, στην τροποποίηση και τη συνεπακόλουθη ενεργοποίησή του, υποκινείται σε μεγάλο βαθμό από την άσκηση μηχανικής διέγερσης σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα. Αυτό είναι σε συμφωνία με πρόσφατες ενδείξεις ότι ο Cbfa1 μπορεί να φωσφορυλωθεί και να ενεργοποιηθεί *in vitro* από τις MAPKs.²⁵



Εικόνα 6. Η ενεργοποίηση ERK (p-ERK) αλληλεπιδρά με τον Cbfa1 σε κύτταρα hPDL που έχουν υποστεί μηχανική τάση. Αδρανή κύτταρα hPDL υποβλήθηκαν (+) σε μηχανική τάση για 6 ώρες ή, απλά, καλλιεργήθηκαν στο ίδιο μέσο χωρίς να υποβληθούν σε αυτήν, για την ίδια χρονική περίοδο (-). Τα κύτταρα, στη συνέχεια, λύθηκαν και ίσα ποσά συνολικής πρωτεΐνης (όπως φαίνεται από την ανάλυση κατά Western με αντι-ERK2 αντίσωμα: δεξίο στύπωμα στην εικόνα), που είχαν υποστεί έναν πρώτο καθαρισμό, χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα συν-ανοσοκαθίζησης (IP) με αντισώματα εναντίον του Cbfa1 (α-Cbfa1) ή της p-ERK1/2 (α-p-ERK). Τα σχηματισμένα ανοσοσυμπλέγματα αναλύθηκαν στη συνέχεια κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων α-p-ERK (αριστερό στύπωμα) ή α-Cbfa1 (επάνω μεσαίο στύπωμα). Οι κεφαλές βελών υποδεικνύουν τις p-ERK και Cbfa1, που συν-ανοσοκατακρημνίστηκαν, αντίστοιχα. Το κάτω μεσαίο στύπωμα (μικρό ένθετο) είναι αυτό του α-Cbfa1 (επάνω μεσαίο στύπωμα), που μετά από απο-υβριδοποίηση επωάστηκε με αντι-ERK2 αντίσωμα. Η κεφαλή βέλους υποδεικνύει την p-ERK2 που αλληλεπιδρά με τον Cbfa1 (σύγκρισε με τις γραμμές 0 και 360 της εικόνας 4B).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο οστίτης ιστός εξελίχθηκε για να υπηρετήσει πρωτίστως μηχανικές ανάγκες. Στη διάρκεια της εξέλιξης, τα οστά βελτιστοποίησαν το ρόλο τους στην αντοχή φορτίων με το να προσαρμόσουν την αρχιτεκτονική τους και τη λειτουργία τους στη δράση των μηχανικών δυνάμεων. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία ο βασικός ρυθμιστής, στο επίπεδο της μεταγραφής, της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης/οστεογένεσης, ο Cbfa1, αποτελεί στόχο-κλειδί της μηχανικής διέγερσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι διαρκώς εκτεθειμένα σε μηχανικές πιέσεις στο φυσικό τους περίγυρο και μπορούν να διαφοροποιηθούν, με σκοπό να συμμετάσχουν ενεργά στην αποκατάσταση του περιοδοντικού συνδέσμου (PDL) και στην ανάπλαση του περιβάλλοντος οστού.⁴⁵ Δείξαμε ότι μετά από ένα φυσικό σήμα, όπως η άσκηση μηχανικής τάσης, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του Cbfa1 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης,



Εικόνα 7. Η άσκηση μηχανικής τάσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα επάγει τη φωσφορυλίωση του Cbfa1 από τις MAPKs. Κύτταρα hPDL παρέμειναν αδρανή για 24 ώρες. Ίσα ποσά από συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών (60 μg), που απομονώθηκαν από κύτταρα που δεν υπέστησαν (γραμμή «0») ή υπέστησαν μηχανική τάση για τους αναγραφόμενους χρόνους, υποβλήθηκαν σε ανάλυση φωσφορυλίωσης με χρήση [γ-³²P]ATP. Οι κινάσες που υπάρχουν σ' αυτά τα εκχυλίσματα και μπορούν να φωσφορυλιώσουν τον Cbfa1 εντοπίστηκαν μετά από αυτοραδιογραφία. Το μοριακό βάρος ¹⁴C-μεθυλιωμένων πρωτεϊνών (σε kDa) που χρησιμοποιούνται ως πρότυπο (M) δίνεται στα αριστερά της εικόνας. Οι κεφαλές βελών υποδεικνύουν τις p-ERK1 (κάτω) και p-JNK2 (επάνω). Η γραμμή "0" αναφέρεται σε ακατέργαστα κύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά που υπέστησαν μηχανική τάση, για το μέγιστο χρόνο εφαρμογής της τελευταίας (6 ώρες).

με συνοδό αύξηση της ικανότητας πρόσδεσής του στο DNA-στόχο του. Καταδείχθηκε επίσης ότι αυτή η μηχανικά σηματοδοτούμενη επαγωγή του Cbfa1 δρομολογείται μέσω του μονοπατιού των MAPKs. Το εύρημά μας ότι ο Cbfa1 και η ενεργοποιημένη ERK (πιθανότατα η ισομορφή ERK2) αλληλεπιδρούν *in vivo*, τεκμηριώνει τον αποφασιστικό ρόλο που έχει ήδη αποδοθεί στο μονοπάτι των MAPKs σε ό,τι αφορά τη διαδικασία της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης γενικά.¹³⁻¹⁷

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τη θεμελιώδη σημασία του Cbfa1 στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία.^{39,46} Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η μηχανική διέγερση μπορεί να πυροδοτήσει τη διαφοροποίηση πρόδρομων οστεοβλαστών με απευθείας στόχευση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα. Οι οστεοβλάστες εύστοχα αποκαλούνται εκλεπτυσμένοι ινοβλάστες,⁴⁷ από τη σκοπιά του περιορισμένου αριθμού των αποκλειστικά υπεύθυνων για την οστεοβλαστική διαφοροποίηση γονιδίων. Ο Cbfa1 επάγει τη μεταγραφή τέτοιων οστεο-ειδικών γονιδίων με την πρόσδεσή του σε σύστοιχες θέσεις-αλληλουχίες που εδράζονται στους υποκινητές των εν λόγω γονιδίων.^{2,5,48} Εφόσον η άσκηση μηχανικής τάσης οδηγεί σε αύξηση τόσο των επιπέδων του Cbfa1 όσο και της δυνατότητάς του να προσδένεται στο DNA-στόχο του, είναι ευλογοφανές ότι τα προαναφερθέντα γονίδια αποτελούν τους φυσικούς τελικούς

αποδέκτες της μηχανικής διέγερσης. Αυτό υποστηρίζεται και από προηγούμενες μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι όντως αυτά τα γονίδια επάγονται μετά από ποικίλου τύπου μηχανικές διεγέρσεις.^{35,49-51}

Επαγωγή της έκφρασης του Cbfa1 σε οστεοβλαστικά κύτταρα έχει αναφερθεί μετά από διέγερσή τους με διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως οι TGF-β1, BMP-2, BMP-7, ή το ετεροδιμερές BMP4/7.^{2,52-54} Όλα αυτά τα εκκρινόμενα μόρια δρουν ως μεταφορείς σημάτων, τα οποία μεταγόνται διαμέσου μεμβρανικών υποδοχέων που είναι κινάσες Ser/Thr (RS/TKs). Οι τελευταίες φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες SMAD, που έτσι μετακομίζουν στον πυρήνα και μπορούν πλέον να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες στα γονίδια-στόχους τους.⁵⁵ Σε ό,τι αφορά όμως τη μηχανική διέγερση, η κινητική της έκφρασης του Cbfa1-mRNA μετά την άσκηση μηχανικής τάσης αποκαλύπτει ότι αυτό αυξάνεται απότομα στις 0,5 ώρες και έκτοτε παραμένει σε υψηλά επίπεδα. Αυτή η άμεση απόκριση της έκφρασης του Cbfa1 είναι απίθανο να οφείλεται σε κάποιον έμμεσο αυτοκρινή μηχανισμό, καθώς ο χρόνος που απαιτείται για τη σύνθεση, έκκριση και τελικά δράση των αυξητικών παραγόντων που προαναφέρθηκαν, είναι κατά πολύ μεγαλύτερος του χρονικού πλαισίου μέσα στο οποίο παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση του Cbfa1-mRNA στο σύστημά μας. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του Cbfa1-mRNA

φτάνουν στο μέγιστο 2 ώρες μετά τη διέγερση με TGF- β 1 ή BMP-2 και έκτοτε βαθμιαία μειώνονται.⁵³ Οι παραπάνω διαπιστώσεις συμπλέουν με προηγούμενες αναφορές, που δείχνουν ότι η εφαρμογή μηχανικής τάσης σε hPDL-κύτταρα επάγει τη σύνθεση DNA, μέσω ενός μηχανισμού που φαίνεται να είναι άμεσος και όχι αυτοκρινής.²⁷ Φυσικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την παράλληλη συνεισφορά αυτοκρινών αυξητικών παραγόντων, που μπορεί να είναι υπεύθυνοι για μια παρατεταμένη επαγωγή της έκφρασης του Cbfa1 μετά την άσκηση μηχανικής διέγερσης.

Μέχρι πρόσφατα, ο μόνος παράγοντας που έχει δείχθει ότι ελέγχει άμεσα την έκφραση του Cbfa1 είναι ο ίδιος ο Cbfa1.³⁹ Αυτό συμβαίνει γιατί ο υποκινητής του Cbfa1 γονιδίου φέρει θέσεις πρόσδεσης του Cbfa1 (OSE2 στοιχεία) και, επιπλέον, έχει δείχθει ότι η υπερέκφραση μιας αρνητικά επικρατούς μορφής Cbfa1 σε ώριμα οστεοβλαστικά κύτταρα οδηγεί σε ελάττωση των επιπέδων της ενδογενούς πρωτεΐνης.^{8,56} Ένας τέτοιος αυτορρυθμιζόμενος μηχανισμός είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας και θα μπορούσε να εξηγήσει, σε μεγάλο βαθμό, την παρατηρούμενη επαγωγή της έκφρασης του Cbfa1 μετά από μηχανική διέγερση. Έτσι, η γρήγορη αύξηση της ενεργότητας των MAPKs μετά από μηχανική διέγερση προάγει τη φωσφορυλίωση –και συνεπώς την ενεργοποίηση– προϋπαρχόντων μορίων Cbfa1. Αυτά, με τη σειρά τους, προσδένονται στα OSE2 στοιχεία στον υποκινητή του Cbfa1 και επάγουν την έκφραση του γονιδίου του. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από την κινητική της επαγόμενης δυνατότητας του Cbfa1 για πρόσδεση στο DNA-στόχο του, που είναι ενδεικτική μιας άμεσου τύπου (immediate-early) απόκρισης, αλλά και από τα πειράματα αναστολής της δράσης των MAPKs. Ρύθμιση *in vitro* της δυνατότητας του Cbfa1 για πρόσδεση στο DNA-στόχο του μέσω φωσφορυλίωσης έχει ήδη περιγραφεί.²⁵ Τα αποτελέσματά μας από την αντίδραση κινάσης στο πήκτωμα και από τις συν-ανοσοκαθιζήσεις υποστηρίζουν έντονα ότι το ίδιο συμβαίνει και *in vivo*.

Έχει αναφερθεί ότι αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης του Cbfa1 στο DNA-στόχο του μετά από αλληλεπίδραση της α_2 -ιντεγκρίνης με κολλαγόνο δεν προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα του Cbfa1.⁵⁷ Αυτή η παρατήρηση δεν αναιρεί κατ' ανάγκη τη δική μας υπόθεση. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ο τύπος των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ή ακόμα και η φύση των ερεθισμάτων που καταλήγουν στην έκφραση του Cbfa1. Ειδικότερα, στην προαναφερθείσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σχετικά ώριμοι οστεοβλάστες, οι οποίοι εκφράζουν τον Cbfa1 ακόμα και χωρίς την παρουσία διέγερσης που να οδηγεί σε

διαφοροποίηση. Αντίθετα, τα hPDL-κύτταρα είναι πρόιμα (αδιαφοροποίητα) οστεοβλαστικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν οριακά ανιχνεύσιμα επίπεδα Cbfa1 σε συνθήκες μη επαγωγής. Η διπλή στόχευση σε επίπεδο μεταγραφής και φωσφορυλίωσης του Cbfa1, μέσω της συντονισμένης ή ιεραρχικής δράσης των μηχανοδιεγερμένων ERK/JNK MAPKs, είναι αναμφισβήτητα απαραίτητη για την πυροδότηση του προγράμματος οστεοβλαστικής διαφοροποίησης σ' αυτά τα κύτταρα και σ' αυτές τις συνθήκες.

Είναι πολύ πιθανό ότι επιπρόσθετοι παράγοντες, εκτός των MAPKs, μπορεί να συμμετέχουν στη μεταβολή της έκφρασης και της ενεργότητας του Cbfa1 μετά από μηχανική διέγερση. Ένας προφανής υποψήφιος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1. Στην περιοχή του υποκινητή του Cbfa1 γονιδίου υπάρχει μια κανονική θέση πρόσδεσης για τον AP-1 και μάλιστα δίπλα ακριβώς από τη θέση πρόσδεσης του Cbfa1. Η ύπαρξη αυτής της θέσης αφήνει ανοιχτή την πιθανότητα συμμετοχής του AP-1 στον έλεγχο της μεταγραφής του Cbfa1 γονιδίου. Ήδη έχει δείχθει ότι ο Cbfa1 και ο AP-1 αλληλεπιδρούν φυσικά και ότι έτσι ελέγχουν από κοινού την έκφραση του γονιδίου της κολλαγενάσης-3.⁵⁸ Επιπλέον, πρόσφατα πειράματα με το σύστημά μας κατέδειξαν επαγωγή της ικανότητας πρόσδεσης του AP-1 στο DNA-στόχο του μετά από 15 min εφαρμογής μηχανικής τάσης.²³ Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα βασικά συστατικά του AP-1, οι πρωτεΐνες c-Jun και c-Fos, αυξάνονται ταχύτατα μετά από μηχανική διέγερση των hPDL-κυττάρων και μάλιστα η παρουσία αναστολέων των MAPKs καταργεί αυτή την επαγωγή.²⁴ Η πιθανότητα μιας επαγόμενης από τη μηχανική διέγερση «διασυσνομίας» Cbfa1 και AP-1 είναι αυτή τη στιγμή αντικείμενο μελέτης στο εργαστήριό μας.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη παρέχει νέες πληροφορίες για τη μοριακή διασύνδεση μηχανικής διέγερσης και οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, διαμέσου της επαγωγής της έκφρασης του οστεο-ειδικού μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1, καθώς και του δυναμικού πρόσδεσης στο DNA-στόχο του. Επειδή ο Cbfa1 ελέγχει απευθείας το ρυθμό σχηματισμού του οστού μέσω των διαφοροποιημένων οστεοβλαστών, η ταυτοποίηση ερεθισμάτων που αυξάνουν την έκφρασή του ή και την ενεργότητά του σ' αυτά τα κύτταρα αναμένεται να ανοίξει το δρόμο σε καινούργιες μεθόδους, τόσο πρόληψης όσο και θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με μείωση της οστικής μάζας. Προς αυτή την κατεύθυνση, η οστεογενετική ικανότητα μικρών φυσικών ερεθισμάτων, όπως η μικρής έκτασης (φυσιολογικού εύρους) μηχανική τάση, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, μπορεί να συνεισφέρει

στην ανάπτυξη άλλου τύπου παρεμβάσεων ενδυνάμωσης των οστών σε οστικές εκφυλιστικές παθήσεις (π.χ. οστεοπόρωση), παρακάμπτοντας έτσι τις γνωστές ανεπιθύμητες ενέργειες που συνοδεύουν τις τρέχουσες φαρμακευτικές αγωγές. Επιπλέον, “εκμαιεύοντας”, με βάση τα χαμηλής

έντασης μηχανικά σήματα, τη “θεραπευτική απόκριση” από το ίδιο το οστό, επάγουμε με πιο φυσιολογικό τρόπο τον πολύπλοκο κύκλο ανάπτυξής του, βελτιώνοντας τόσο την οστική μάζα όσο και την ποιότητα του οστού.⁵⁹

ABSTRACT

Stimulation of osteogenesis via mechanoinduction of the osteoblastic transcription factor Cbfa1

P.G. ZIROS¹, A.P. ROJAS GIL¹, T. GEORGAKOPOULOS¹, I. HABEOS¹, D. KLETSAS², E.K. BASDRA³, A.G. PAPAVALASSIOU¹

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, GR-26110 Patras, Greece,

²Institute of Biology, N.C.S.R. "Demokritos", GR-15310 Athens, Greece, ³Department of Orthodontics, Heidelberg University, INF 400, D-69120 Heidelberg, Germany

Archives of Hellenic Medicine 2002, 19(5):539-552

OBJECTIVE A primary goal of bone research is to understand the mechanism(s) by which mechanical forces dictate the cellular and metabolic activities of osteoblasts, the bone-forming cells. Several studies indicate that osteoblastic cells respond to physical loading by transducing signals that alter gene expression patterns. Accumulated data have documented the fundamental role of the osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. **METHOD** Primary cultures of human osteoblast-like cells were subjected to low-level continuous mechanical strain employing an established system for applying calibrated stretch. A combination of Northern/Western blotting, mobility-shift, protein kinase inhibition, in-gel kinase, and co-immunoprecipitation assays were used to address the role of Cbfa1 in mechanotransduction. **RESULTS** It was demonstrated that physiological amounts of mechanical deformation (stretching) directly up-regulate the expression and DNA-binding activity of Cbfa1 in human osteoblastic cells. This effect seems to be “fine-tuned” by stretch-triggered induction of distinct mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades. Importantly, it is shown that activated extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAPK physically interacts and phosphorylates endogenous Cbfa1 *in vivo*, ultimately potentiating this transcription factor. **CONCLUSIONS** The findings of this study provide a molecular link between mechanostressing and stimulation of osteoblast differentiation. Elucidation of the specific modifiers and co-factors that operate in this mechanotranscription circuitry will contribute to a better understanding of mechanical load-induced bone formation which may set the basis for non-pharmacological intervention in bone loss pathologies.

Key words: Cbfa1, ERK, MAP kinase, Mechanical stimulation, Osteoblastic cell

Βιβλιογραφία

1. LANYON LE. Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *J Biomech* 1987, 20:1083–1093
2. DUCY P, ZHANG R, GEOFFROY V, RIDALL AL, KARSENTY G. Ost2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997, 89:747–754
3. DUCY P, KARSENTY G. Two distinct osteoblast-specific *cis*-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 1995, 15:1858–1869
4. HARADA H, TAGASHIRA S, FUJIWARA M, OGAWA S, KATSUMATA T, YAMAGUCHI A ET AL. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 1999, 274:6972–6978
5. JIMENEZ MJ, BALBIN M, LOPEZ JM, ALVAREZ J, KOMORI T, LOPEZ-OTIN C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the *runt* gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 1999, 19:4431–4442
6. MUNDLOS S, OTTO F, MUNDLOS C, MULLIKEN JB, AYLSWORTH AS, ALBRIGHT S ET AL. Mutations involving the transcription factor CBFA 1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997, 89:773–779
7. OTTO F, THORNELL AP, CROMPTON T, DENZEL A, GILMOUR KC, ROSEWELL IR ET AL. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997, 89:765–771
8. DUCY P, STARBUCK M, PRIEMEL M, SHEN J, PINERO G, GEOFFROY V ET AL. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone

- formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999, 13:1025–1036
9. KARSENTY G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 1999, 13:3037–3051
 10. RODAN GA, NODA M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1991, 1:85–98
 11. STEIN GS, LIAN JB, STEIN JL, VAN WIJNEN AJ, MONTECINO M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 1996, 76:593–629
 12. FRANCESCHI RT. The development control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999, 10:40–57
 13. HIPSKIND RA, BILBE G. MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblast. *Front Biosci* 1998, 3:D804–D816
 14. LOU J, TU Y, LI S, MANSKE PR. Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T^{1/2}. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 268:757–762
 15. GALLEA S, LALLEMAND F, ATFI A, RAWADI G, RAMEZ V, SPINELLA-JEAGLE S ET AL. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 2001, 28:491–498
 16. HUANG Z, CHENG SL, SLATOPOLSKY E. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is required for extracellular calcium stimulation of human osteoblast proliferation. *J Biol Chem* 2001, 276: 21351–21358
 17. LAI CF, CHAUDHARY L, FAUSTO A, HALSTEAD LR, ORY DS, AVIOLI LV ET AL. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2001, 276:14443–14450
 18. TAKEUCHI Y, SUZAWA M, KIKUCHI T, NISHIDA E, FUJITA T, MATSUMOTO T. Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by collagen- α 2 β 1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1997, 272:29309–29316
 19. SCHMIDT C, POMMERENKE H, D'ORR F, NEBE B, RYCHLY J. Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem* 1998, 273:5081–5085
 20. ARCEO N, SAUK JJ, MOEHRING J, FOSTER RA, SOMERMAN MJ. Human periodontal cells mineral-like nodules *in vitro*. *J Periodontol* 1991, 62:499–503
 21. BASDRA EK, KOMPOSCH G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an *in vitro* analysis. *Eur J Orthod* 1997, 19:615–621
 22. CARNES DL, MAEDER CL, GRAVES DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol* 1997, 68:701–707
 23. PEVERALI FA, BASDRA EK, PAPAVALASSIOU AG. Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells. *Mol Med* 2001, 7:68–78
 24. KLETSAS D, BASDRA EK, PAPAVALASSIOU AG. Effect of protein kinase inhibitors on the stretch-elicited c-Fos and c-Jun up-regulation in human PDL osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 2002, 190:313–321
 25. XIAO G, JIANG D, THOMAS P, BENSON MD, GUAN K, KARSENTY G ET AL. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem* 2000, 275:4453–4459
 26. BASDRA EK, PAPAVALASSIOU AG, HUBER LA. Rab and rho GTPases are involved in specific response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1268:209–213
 27. KLETSAS D, BASDRA EK, PAPAVALASSIOU AG. Mechanical stress induces DNA synthesis in PDL fibroblasts by a mechanism unrelated to autocrine growth factor action. *FEBS Lett* 1998, 430:358–362
 28. MARAIS R, WYNNE J, TREISMAN R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 1993, 73:381–393
 29. SCHREIBER E, MATTHIAS P, MULLER MM, SCHAFFNER W. Rapid detection of octamer binding proteins with “mini-extracts”, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989, 17:6419
 30. CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156–159
 31. AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA ET AL. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York, 1994: 4.9.1–4.9.8
 32. PAPAVALASSIOU AG, TREIER M, BOHMANN D. Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J* 1995, 14:2014–2019
 33. D'SOUZA RN, EBERG T, GAIKWAD J, CAVENDER A, OWEN M, KARSENTY G ET AL. Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 1999, 126:2911–2920
 34. BRONCKERS AL, ENGELSE MA, CAVENDER A, GAIKWAD J, D'SOUZA RN. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 2001, 101:255–258
 35. PAVLIN D, DOVE SB, ZADRO R, GLUHAK-HEINRICH J. Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblast in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* 2000, 67:163–172
 36. GEOFFROY V, CORRAL DA, ZHOU L, LEE B, KARSENTY G. Genomic organization, expression of the human CBFA1 gene, and evidence for an alternative splicing event affecting protein function. *Mamm Genome* 1998, 9:54–57
 37. XIAO ZS, THOMAS R, HINSON TK, QUARLES LD. Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor. *Gene* 1998, 214:187–197
 38. XIAO ZS, HINSON TK, QUARLES LD. Cbfa1 isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 1999, 74:596–605
 39. DUCY P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000, 219:461–471

40. LIAN JB, STEIN GS, STEIN JL, VAN WIJNEN AJ. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem* 1998, (Suppl 30-31):62–72
41. GEOFFROY V, DUCY P, KARSENTY G. A PEBP α AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *J Biol Chem* 1995, 270:30973–30979
42. FAVATA MF, HORIUCHI KY, MANOS EJ, DAULERIO AJ, STRADLEY DA, FEESER WS ET AL. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998, 273:18623–18632
43. DAVIES SP, REDDY H, CAIVANO M, COHEN P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000, 351:95–105
44. CHEN YR, TAN TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998, 17:173–178
45. LEKIC P, McCULLOCH CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblast in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996, 245:327–341
46. KARSENTY G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol* 2000, 11:343–346
47. DUCY P, SCHINKE T, KARSENTY G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000, 289:1501–1504
48. KERN B, SHEN J, STARBUCK M, KARSENTY G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 2001, 276:7101–7107
49. ZAMAN G, DALLAS SL, LANYON LE. Cultured embryonic bone shafts show osteogenic responses to mechanical loading. *Calcif Tissue Int* 1992, 51:132–136
50. HARTER LV, HRUSKA KA, DUNCAN RL. Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology* 1995, 136:528–535
51. CARVALHO RS, SCOTT JE, YEN EH. The effects of mechanical stimulation on the distribution of β 1-integrin and expression of β 1-integrin mRNA in TE-85 human osteosarcoma cells. *Arch Oral Biol* 1995, 40:257–264
52. LEE MH, JAVED A, KIM HJ, SHIN HI, GUTIERREZ S, CHOI JY ET AL. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999, 73:114–125
53. LEE KS, KIM HJ, LI QL, CHI XZ, UETA C, KOMORI T ET AL. Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000, 20:8783–8792
54. TSUJII K, ITO Y, NODA M. Expression of the PEBP2 α A/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells. *Bone* 1998, 22:87–92
55. MASSAGUE J, CHEN YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 2000, 14:627–644
56. DRISSI H, LUC Q, SHAKOORI R, CHUVA DE SOUSA LOPES S, CHOI JY, TERRY A ET AL. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol* 2000, 184:341–350
57. XIAO G, WANG D, BENSON MD, KARSENTY G, FRANCESCHI RT. Role of the α ₂-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem* 1998, 273:32988–32994
58. HESS J, PORTE D, MUNZ C, ANGEL P. AP-1 and Cbfa/Runt physically interact and regulate PTH-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new OSE/AP-1 composite element. *J Biol Chem* 2000, 276:20029–20038
59. RUBIN C, TURNER AS, BAIN S, MALLINCKRODT C, McLEOD K. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 2001, 412:603–604

Corresponding author:

A.G. Papavassiliou, Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, GR-261 10 Patras, Greece
E-mail: papavas@med.upatras.gr