

**Αυξημένο μηχανικό φορτίο στις αρθρώσεις
οδηγεί τους χονδροβλάστες των αρθρικών
επιφανειών σε διαφοροποίηση/ωρίμανση
μέσω ενεργοποίησης του μεταγωγικού
άξονα MAP κινασών-AP-1**

ΣΚΟΠΟΣ Η μηχανική φόρτιση είναι σημαντικός ρυθμιστής της χονδροστεογένεσης. Εντούτοις, οι μοριακοί μηχανισμοί που υπαγορεύουν την απόκριση των χονδροβλαστών στα μηχανικά ερεθίσματα παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Έχει δειχθεί ότι το μεταγωγικό μονοπάτι των MAP/SAP κινασών (MAPK/SAPK) και ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 ενέχονται στη μηχανο-επαγόμενη οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Επιπλέον, οι μηχανο-ενεργοποιημένες ERK MAPKs διεγείρουν τον οστεο-ειδικό μεταγραφικό παράγοντα Cbfa1/Runx2, ο οποίος εμπλέκεται στην (παθο)φυσιολογία οστεοβλαστών/χονδροβλαστών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του μηχανικού φορτίου στην ενεργοποίηση των JNK-AP-1 και ERK μονοπατιών και ο έλεγχος της συμμετοχής του στη βιολογία των χονδροβλαστών του αρθρικού χόνδρου. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Χρησιμοποιήθηκαν 100 επίμυες, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε σκληρή τροφή (αυξημένη μηχανική φόρτιση), ενώ στη δεύτερη μαλακή τροφή (προσομοίωση φυσιολογικής μάσησης). Σε βιοψίες κονδύλων της κροταφογοναθικής διάρθρωσης ελέγχθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση των πρωτεϊνών p-c-Jun (φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της c-Jun), JunB και JunD (μέλη της οικογένειας των Jun πρωτεϊνών), c-Fos (βασικός εταίρος της p-c-Jun για τη σύνθεση του μεταγραφικού συμπλόκου AP-1), Fra-1 και Fra-2 (μέλη της οικογένειας των Fos πρωτεϊνών), JNK2 (κύρια κινάση της c-Jun), p-JNK (φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της JNK), p-ERK (φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της ERK) και Cbfa1/Runx2, στις 2 και 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Τα παραπάνω πρωτεϊνικά προφίλ συσχετίστηκαν τόσο μεταξύ τους όσο και με το βαθμό χονδροβλαστικής διαφοροποίησης/ωρίμανσης. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών p-c-Jun, c-Fos, p-ERK και Cbfa1/Runx2, αλλά όχι των JNK2, p-JNK, JunB, JunD, Fra-1 και Fra-2, ήταν σημαντικά υψηλότερα στους επίμυες που έλαβαν σκληρή τροφή σε σχέση με αυτούς που έλαβαν μαλακή, στις 24 αλλά όχι στις 2 ώρες από την εκκίνηση της πειραματικής διαδικασίας. Εξάλλου, σημαντικά εντονότερη ήταν η ανοσο-έκφραση των πρωτεϊνών p-c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1, Fra-2, p-JNK, p-ERK και Cbfa1/Runx2, στις 24 σε σχέση με τις 2 ώρες, κυρίως στα ζώα που έλαβαν σκληρή τροφή. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η αυξημένη μηχανική φόρτιση πυροδοτεί το μεταγωγικό καταρράκτη των MAPKs στα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι τα μηχανο-επαγόμενα JNK και ERK μονοπάτια «συγκλίνουν» στους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και Cbfa1/Runx2, προκειμένου να ρυθμίσουν τη διαφοροποίηση/ωρίμανση των χονδροβλαστών.

Δ.Ι. Παπαχρήστου,¹
Ν.Ι. Αγνάντη,¹
Α.Γ. Παπαβασιλείου,²
Ε.Κ. Μπάσδρα³

¹Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων, Ιωάννινα

²Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών,
Πάτρα

³Εργαστήριο Ορθοδοντικής, Τμήμα
Οδοντιατρικής, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,
Θεσσαλονίκη

Increased cartilage loading triggers
differentiation/maturation
of articular surface chondroblasts
via activation of the MAPK-AP-1
signal transduction pathway

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

AP-1
Cbfa1/Runx2
MAP κινάσες
Μηχανικό φορτίο
Χονδροκύτταρα

Ποικίλα εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως οι κυτταροκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι ορμόνες, ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των χονδροβλαστών, καθώς επίσης και τη διαδικασία της χονδρο-οστεογένεσης.¹ Κλινικές παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι από τους σημαντικότερους παράγοντες για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και της σωστής λειτουργίας του χόνδρινου ιστού είναι η επίδραση μηχανικών δυνάμεων.¹ Η εφαρμογή της μηχανικής φόρτισης έχει τα τελευταία χρόνια ευρεία χρήση στην αντιμετώπιση παθολογικών (εκφυλιστικών, δυστροφικών) και τραυματικών καταστάσεων στην Ορθοπαιδική-Τραυματιολογία, και στη Γναθοπροσωπική Ορθοπαιδική για τη διόρθωση σκελετικών κρανιοπροσωπικών ανωμαλιών.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, το μηχανικό περιβάλλον των αρθρώσεων επιδρά στα κύτταρα και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του χόνδρου, ρυθμίζοντας τη βιολογία και τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τους.² *In vitro* μελέτες σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων έδειξαν ότι ικανού βαθμού περιοδική μηχανική φόρτιση επιτείνει τη χονδροβλαστική δραστηριότητα, ενώ το στατικό φορτίο ή η μειωμένη μηχανική φόρτιση την ελαττώνουν.³⁻⁵ Παρά τις εκτεταμένες κλινικοεργαστηριακές έρευνες, οι βιολογικοί μηχανισμοί που ενέχονται στη μετατροπή μηχανικών ερεθισμάτων σε βιοχημική απάντηση δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Είναι κατανοητό ότι οι μηχανικές δυνάμεις αποτελούν φυσικές οντότητες. Επομένως, η μηχανική διέγερση κυττάρων –και κατ' επέκταση η μελέτη των μονοπατιών μεταγωγής της ενδοκυτταρικά– παρουσιάζει μια εγγενή ιδιαιτερότητα, καθώς δεν μπορεί να «ιχνηλατηθεί», όπως συμβαίνει π.χ. με τις ορμόνες. Έτσι, κάθε προσπάθεια διερεύνησης των μονοπατιών μεταγωγής του σήματος της μηχανικής διέγερσης θα πρέπει να βασίζεται στη μελέτη χαρακτηρισμένων συστημάτων μεταγωγής σημάτων από ανάλογες φυσικές οντότητες, όπως το οσμωτικό stress και η υπερϊώδης ακτινοβολία.

Ένα τέτοιο, επαρκώς χαρακτηρισμένο σύστημα, αποτελεί η οικογένεια των MAP/SAP (mitogen-activated protein/stress-activated protein) κινασών, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιηθούν από ποικίλα εξωκυττάρια μηνύματα (αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, οσμωτικό stress). Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις διαφορετικές υπο-οικογένειες των MAP κινασών: οι ERKs (extracellular signal-regulated kinases), JNKs (c-Jun N-terminal kinases) και p38 MAP κινάσες (MAPKs).⁶

Τα μεταγωγικά μονοπάτια των JNK και ERK MAP κινασών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία των χονδροκυττάρων, καθώς τροποποιούν την έκ-

φραση γονιδίων απαραίτητων για τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους.¹ Και οι δύο αυτές κινάσες ασκούν τη δράση τους φωσφορυλιώνοντας μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν γονίδια άμεσης απόκρισης, κυρίως των οικογενειών *jun* (*c-jun*, *junB*, *junD*) και *fos* (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*).⁷ Η πρωτεΐνη c-Jun ομοδιμερίζεται ή και ετεροδιμερίζεται με τα μέλη της οικογένειας Fos, δημιουργώντας το μεταγραφικό σύμπλοκο AP-1 (activator protein-1).^{8,9}

Επιπλέον, μελέτες σε οστεοβλάστες –ιστό που υπόκειται φυσιολογικά στη συνεχή επίδραση μηχανικών δυνάμεων– έδειξαν ότι μικρής έντασης μηχανικές δυνάμεις επάγουν τη δραστηριότητα των JNK και ERK MAPK μονοπατιών μεταγωγής σήματος, τα οποία, στη συνέχεια, ενεργοποιούν τα κύρια συστατικά του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, τις πρωτεΐνες c-Jun και c-Fos, επάγοντας τελικά την έκφραση οστεοειδικών γονιδίων-στόχων, όπως το γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP).^{10,11} Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι μηχανικές δυνάμεις επιδρούν στους οστεοβλάστες προάγοντας τη διαφοροποίησή τους. Σ' αυτή την κατεύθυνση, πρόσφατα δεδομένα από κυτταρικές καλλιέργειες οστεοβλαστών κατέδειξαν ότι, υπό την επίδραση μηχανικού φορτίου, οι JNK και ERK MAPKs αυξάνουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και ενισχύουν το δυναμικό *trans*-ενεργοποίησης του οστεοειδικού μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1 (core-binding factor 1)/Runx2, προάγοντας έτσι την οστεοβλαστική διαφοροποίηση.¹²

Η πρωτεΐνη Cbfa1/Runx2 ανήκει στην οικογένεια των runt domain (δομικό μοτίβο) μεταγραφικών παραγόντων και, σε ό,τι αφορά το χονδρικό ιστό, εκφράζεται κυρίως στην προϋπερτροφική-υπερτροφική ζώνη της επιφυσιακής πλάκας.¹³⁻¹⁵ Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες προτείνουν τη συμμετοχή του Cbfa1/Runx2 στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των χονδροβλαστών και στην ωρίμανση των χονδροκυττάρων.^{14,16}

Το ερώτημα, ωστόσο, κατά πόσο η άσκηση μηχανικού φορτίου πυροδοτεί και στο χονδρικό ιστό παρόμοια σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτά των JNK-AP-1 και ERK επιδρώντας στη χονδροβλαστική διαφοροποίηση/ωρίμανση, δεν έχει διερευνηθεί μέχρι σήμερα. Ο έλεγχος της χονδροβλαστικής διαφοροποίησης έχει θεμελιώδη σημασία για την ανάπτυξη και αύξηση του χόνδρου και κατ' επέκταση του ίδιου του οστού. Κλινικές παρατηρήσεις αποδεικνύουν ότι η άσκηση μηχανικού φορτίου κατά μήκος των μακρών οστών έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη ανάπτυξή τους, λόγω της περιορισμένης αύξησης/ανάπτυξης των επιφυσιακών πλα-

κών. Φαίνεται, δηλαδή, ότι το αυξημένο μηχανικό φορτίο επηρεάζει την αύξηση/ανάπτυξη του χόνδρου, επιδρώντας στο ρυθμό διαφοροποίησης/ωρίμανσης/απόπτωσης των κυττάρων του χόνδρου, των χονδροβλαστών.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση του αυξημένου μηχανικού φορτίου στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των χονδροβλαστών, εξετάστηκαν τα κυτταρικά επίπεδα (α) των συστατικών των JNK και ERK μονοπατιών μεταγωγής σήματος, (β) του μεταγραφικού συμπλόκου AP-1, καθώς και (γ) του μεταγραφικού ρυθμιστή Cbfa1/Runx2, σε τομές παραφίνης από την κροταφογναθική διάρθρωση νεαρών επίμυων πριν και μετά από την επίδραση μηχανικών φορτίων/διεγέρσεων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση των πρωτεϊνών JNK2 (κύριας c-Jun κινάσης), p-JNK (φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της JNK), pc-Jun (φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της c-Jun), JunB, JunD, c-Fos, Fra-1, Fra-2, p-ERK (φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της ERK) και Cbfa1/Runx2, σε μια σειρά από πειραματόζωα που τρέφονταν με τροφή διαφορετικής σκληρότητας (διαφορετική επίδραση φορτίων στις επιφάνειες της κροταφογναθικής διάρθρωσης) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, και συσχετίστηκαν τα παραπάνω πρωτεϊνικά προφίλ τόσο μεταξύ τους όσο και με το βαθμό χονδροβλαστικής διαφοροποίησης/ωρίμανσης.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν επίμυες ηλικίας 30 ημερών, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα (μάρτυρες) τοποθετήθηκαν πειραματόζωα τα οποία τρέφονταν με στερεά, σκληρή τροφή. Στη δεύτερη ομάδα τοποθετήθηκαν επίμυες οι οποίοι τρέφονταν με μαλακή τροφή σε μορφή σκόνης, που προκαλεί ελαττωμένη μηχανική φόρτιση της κροταφογναθικής διάρθρωσης. Το νερό ήταν διαθέσιμο *ad librium*.

Συνολικά, 50 επίμυες από την πρώτη και 50 από τη δεύτερη ομάδα θυσιάστηκαν 2 και 24 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, αντίστοιχα. Σε καθεμιά από τις προαναφερθείσες χρονικές στιγμές, τα ζώα και των δύο ομάδων υπέστησαν εκτομή των κονδύλων της δεξιάς κροταφογναθικής διάρθρωσης. Τα ιστοτεμάχια τα οποία ελήφθησαν, μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμαλίνης για 24 ώρες. Ακολούθησε αφαλάτωση σε διάλυμα 5% φορμικού οξέος για 5 ημέρες και εμβύθιση των ιστοτεμαχίων σε παραφίνη. Από τους σκηνωμένους σε παραφίνη ιστούς ελήφθησαν ιστολογικές τομές για εφαρμογή ανοσοϊστοχημικής χρώσης.

Ανοσοϊστοχημική μέθοδος

Εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική μέθοδος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης σε τομές πάχους 4 μm, υλικού εμβυθισμένου σε παραφίνη.

Η ανάδειξη των αντιγονικών επιτόπων έγινε με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων. Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) και είναι τα εξής:

- Anti-JNK2 (μονοκλωνικό, sc-7345/αραίωση 1:50)
- Anti-p-JNK2 [ενεργοποιημένη μορφή της κινάσης JNK2 (μονοκλωνικό, sc-6254/αραίωση 1:50)]
- Anti-c-Jun (πολυκλωνικό, sc-1649/αραίωση 1:70)
- Anti-JunB (πολυκλωνικό, sc-4/αραίωση 1:70)
- Anti-JunD (πολυκλωνικό, sc-74/αραίωση 1:70)
- Anti-pc-Jun [ενεργοποιημένη μορφή της πρωτεΐνης c-Jun (μονοκλωνικό, sc-822/αραίωση 1:70)]
- Anti-c-Fos (πολυκλωνικό, sc-253/αραίωση 1:100)
- Anti-Fra-1 (πολυκλωνικό, sc-605/αραίωση 1:100)
- Anti-Fra-2 (πολυκλωνικό, sc-604/αραίωση 1:100)
- Anti-p-ERK [ενεργοποιημένη μορφή της κινάσης ERK (μονοκλωνικό, sc-7383/αραίωση 1:100)]
- Anti-PEBP2aA/Cbfa1/Runx2 (πολυκλωνικό, sc-10758/αραίωση 1:100).

Την επώαση με το ειδικό αντίσωμα ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των τομών, επί 5 min η καθεμιά, σε διάλυμα TBS. Η δέσμευση του ειδικού αντισώματος ανιχνεύθηκε με το σύμπλεγμα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης [Super Sensitive Ready-to-Use Detection Kit (BioGenex Laboratories Inc, San Ramon, CA, USA)]. Η ανίχνευση των θέσεων δέσμευσης της υπεροξειδάσης έγινε με την εφαρμογή διαλύματος 0,05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan με 0,05% 3,3-τετραϋδροχλωρικής διαμινο-βενζιδίνης (DAB) [Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA)] και 0,01% υπεροξειδίου του υδρογόνου, για 3 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση των τομών με τρεχούμενο νερό βρύσης και χρώση αντίθεσης των πυρήνων (counterstaining) με αιματοξυλίνη Harris. Έγινε στιγμιαία εμβάπτιση των ιστών σε οξινισμένη αλκοόλη για την αφαίρεση της περίσσειας αιματοξυλίνης και αφυδάτωσή τους σε ανιούσα αλκοολών. Τέλος, μετά από την εμβάπτιση των πλακιδίων σε ξυλόλη, πραγματοποιήθηκε επικόλληση των καλυπτρίδων με τη χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan, Merck, Germany).

Η εκτίμηση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε με τη χρήση φωτονικού μικροσκοπίου, από δύο ανεξάρτητους ερευνητές. Περίπου 1000 κύτταρα εξετάστηκαν από κάθε δείγμα.

Πίνακας 1. Διαβάθμιση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για κάθε αντίσωμα, ανάλογα με το είδος της τροφής και τη διάρκεια της μάσησης.

	Μαλακή τροφή		Σκληρή τροφή	
	2 ώρες (n=86)	24 ώρες (n=86)	2 ώρες (n=86)	24 ώρες (n=90)
pc-Jun	4 (0), 7 (1+), 1 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 9 (2+), 3 (3+), 0 (4+)	0 (0), 8 (1+), 5 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 1 (2+), 8 (3+), 4 (4+)
c-Fos	5 (0), 5 (1+), 2 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 4 (2+), 8 (3+), 0 (4+)	0 (0), 8 (1+), 5 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 0 (2+), 10 (3+), 3 (4+)
JNK2	3 (0), 2 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	1 (0), 1 (1+), 3 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 4 (1+), 2 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 2 (2+), 2 (3+), 1 (4+)
p-JNK	7 (0), 6 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 10 (2+), 3 (3+), 0 (4+)	3 (0), 7 (1+), 2 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 4 (2+), 7 (3+), 2 (4+)
JunB	2 (0), 2 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 3 (1+), 2 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 5 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 3 (2+), 2 (3+), 0 (4+)
JunD	3 (0), 2 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 3 (1+), 2 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 5 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 2 (2+), 4 (3+), 0 (4+)
Fra-1	2 (0), 3 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 1 (1+), 4 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 4 (1+), 1 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 2 (2+), 1 (3+), 2 (4+)
Fra-2	0 (0), 5 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 4 (2+), 1 (3+), 0 (4+)	0 (0), 4 (1+), 1 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 3 (2+), 2 (3+), 0 (4+)
p-ERK	5 (0), 7 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 2 (1+), 8 (2+), 2 (3+), 0 (4+)	1 (0), 8 (1+), 3 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 3 (2+), 7 (3+), 2 (4+)
Cbfa1/Runx2	9 (0), 4 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 1 (1+), 11 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (3+), 10 (1+), 0 (2+), 0 (3+), 0 (4+)	0 (0), 0 (1+), 3 (2+), 10 (3+), 0 (4+)

Η διαβάθμιση της χρώσης έγινε με τη χρήση κλίμακας από 0 έως 4+ (πίν. 1), σύμφωνα με την εξής παραδοχή:^{17,18}

- 0: Μη ανιχνεύσιμη χρώση
- 1+: Ήπια κυτταρική χρώση
- 2+: Μέτρια κυτταρική χρώση
- 3+: Έντονη κυτταρική χρώση
- 4+: Πολύ έντονη κυτταρική χρώση.

Το ποσοστό των θετικών κυττάρων δεν εκτιμήθηκε, γιατί η ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών αφορούσε σε όλα τα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου.

Στατιστικές αναλύσεις

Για τον έλεγχο της επίδρασης των μεταβλητών είδος τροφής (σκληρή, μαλακή) και χρόνος (2 ώρες, 24 ώρες) στα επίπεδα έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης κάθε πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία two-way ANOVA. Στη συνέχεια, έγινε Turkey test post-hoc ανάλυση, προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα ανοσοέκφρασης κάθε πρωτεΐνης ως προς το είδος της τροφής (σκληρή, μαλακή) για κάθε χρονική στιγμή (2 ώρες, 24 ώρες). Επίσης, έγινε post-hoc ανάλυση ως προς τον παράγοντα χρόνο, προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής ή μη διαφοράς μεταξύ της κυτταρικής έκφρασης των εξεταζόμενων πρωτεϊνικών μορίων στα διάφορα

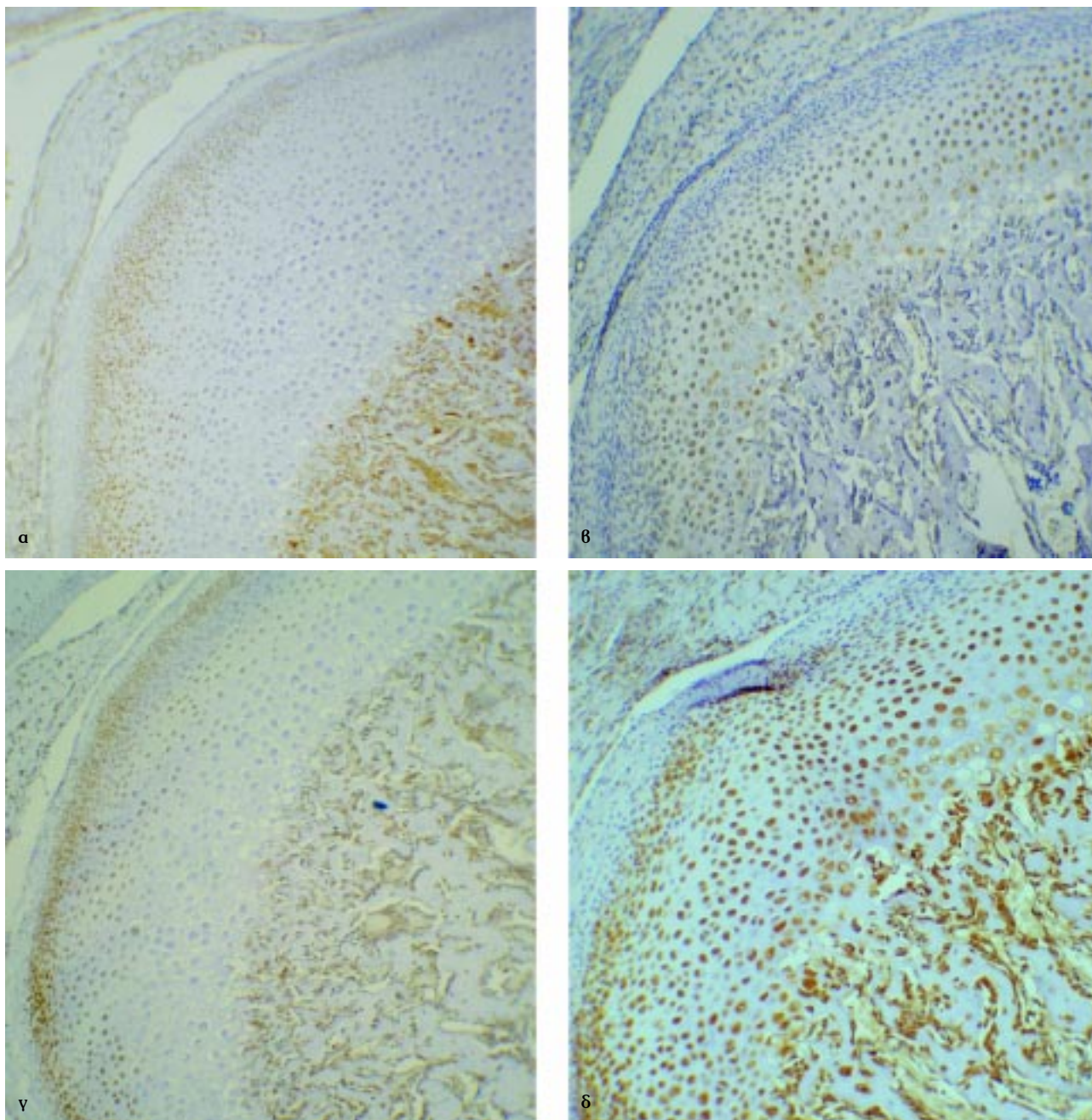
ζεύγη χρονικών στιγμών, στα ζώα που τρέφονταν με σκληρή και μαλακή τροφή.

Για την εκτίμηση των διαφορών στην ένταση της ανοσοθετικότητας ανάμεσα στις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στις διαφορετικές χρονικές στιγμές (2 ώρες και 24 ώρες) εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος one-way ANOVA, ενώ για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών ανά δύο, έγινε ο έλεγχος Tukey post-hoc.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το μηχανικό φορτίο ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες-στατικά του JNK μονοπατιού μεταγωγής σήματος και τα μέλη των οικογενειών Jun και Fos, στα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου

Η φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της c-Jun, pc-Jun, εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα των χονδροκυττάρων του αρθρικού χόνδρου (εικ. 1). Τα αποτελέσματα περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 1. Τα επίπεδα κυτταρικής έκφρασης της pc-Jun ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στα ζώα που τρέφονταν με σκληρή τροφή, σε σύγκριση με τα ζώα που τρέφονταν με μαλακή

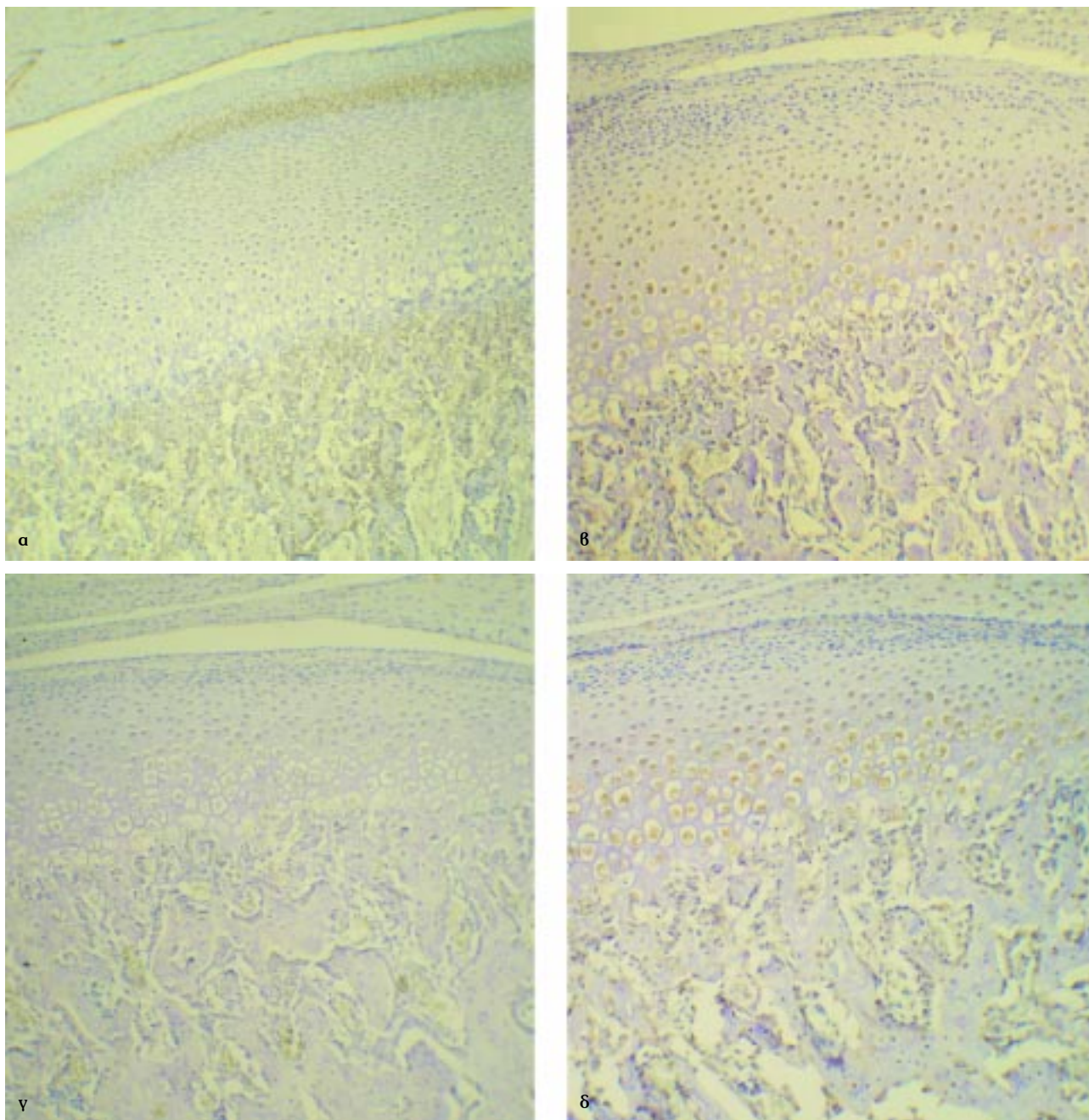


Εικόνα 1. Απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (α) και έντονη χρώση (β) της πρωτεΐνης p-c-Jun, στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου, στις 2 ώρες από την έναρξη του πειράματος, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Μέτρια (γ) και πολύ έντονη (δ) ανοσοϊστοχημική χρώση για την p-c-Jun, στις 24 ώρες μετά από τη λήψη μαλακής και σκληρής τροφής, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

τροφή, στις 24 άλλα όχι στις 2 ώρες ($P < 0,001$ και $P > 0,05$, αντίστοιχα). Τόσο στους επίμυες που έλαβαν σκληρή όσο και σ' αυτούς που έλαβαν μαλακή τροφή, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της p-c-Jun μεταξύ 2 και 24 ωρών ($P < 0,001$ και για τις δύο ομάδες).

Τα άλλα μέλη της οικογένειας των Jun πρωτεϊνών, JunB και JunD, εμφάνισαν τόσο πυρηνική όσο και κυτ-

ταροπλασματική ανοσοεντόπιση. Η αύξηση του μηχανικού φορτίου προκάλεσε αύξηση των επιπέδων κυτταρικής έκφρασης και για τις δύο πρωτεΐνες (εικόνες 2, 3). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφρασή τους, μεταξύ μαλακής και σκληρής τροφής, τόσο στις 2 όσο και στις 24 ώρες από την αρχή της πειραματικής διαδικασίας. Σημαντικά εντονότερη ήταν η ανοσοχρώση και των δύο πρωτεϊνών, στις 24 ώρες σε

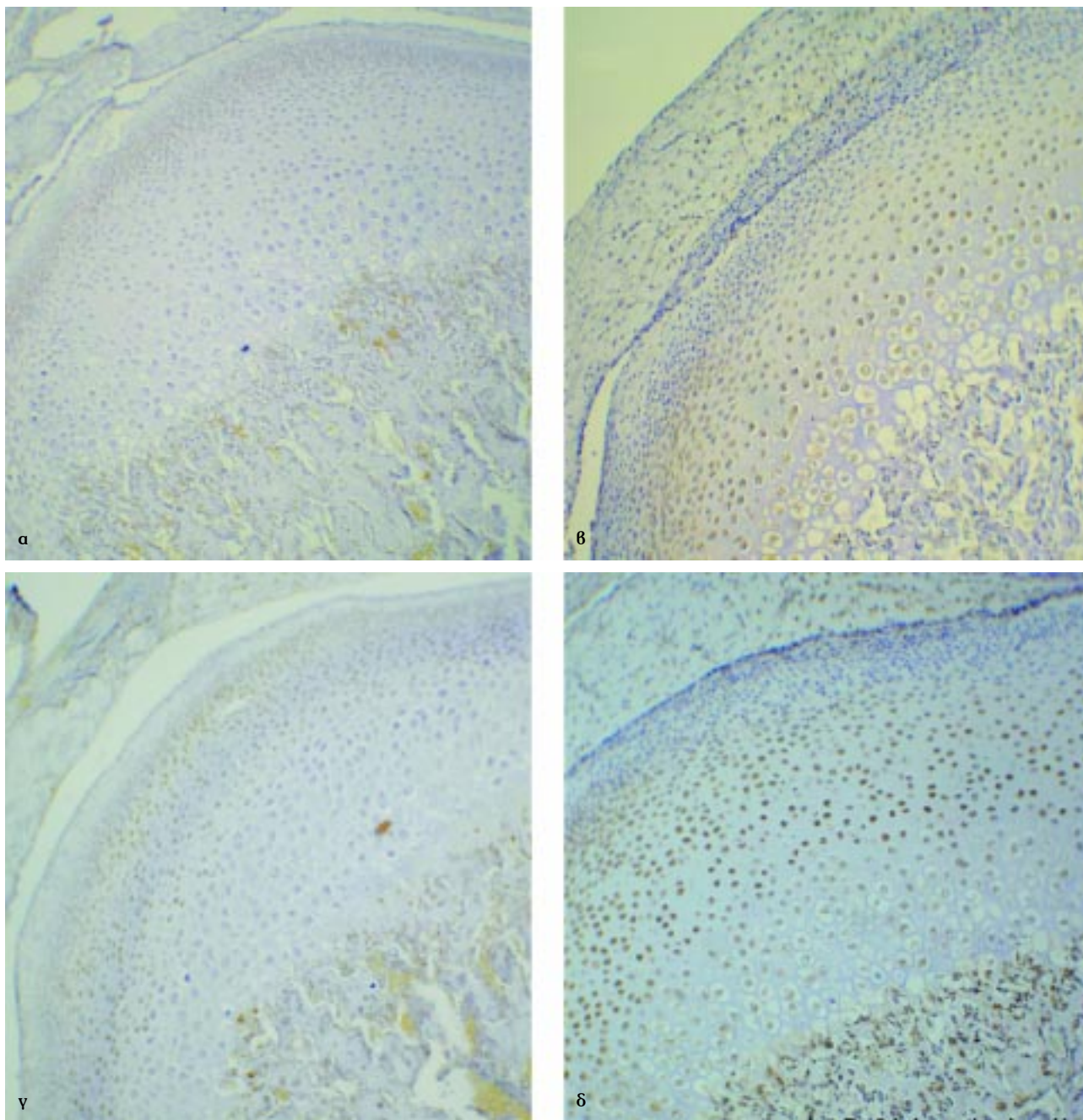


Εικόνα 2. Ήπια (α) και έντονη (β) ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης JunB, στις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Ήπια (γ) και έντονη (δ) ανοσοχρώση για την JunB, στις 24 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

σχέση με τις 2 ώρες, στα ζώα που έλαβαν σκληρή τροφή ($P < 0,05$ και $P < 0,01$, αντίστοιχα) (πίν. 1).

Η πρωτεΐνη c-Fos, βασικός εταίρος της c-Jun στο σχηματισμό του μεταγραφικού συμπλόκου AP-1, εμφάνισε τόσο πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική εντόπιση (εικ. 4). Στις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαν-

τικές διαφορές στην έκφραση της c-Fos, μεταξύ των ζώων που έλαβαν μαλακή και αυτών που έλαβαν σκληρή τροφή ($P > 0,05$). Αντίθετα, στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις 24 ώρες ($P < 0,01$). Τόσο οι επίμυες που τρέφονταν με σκληρή όσο και αυτοί που έλαβαν μαλακή τροφή, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές της c-Fos, στις 24 σε σχέση με τις 2

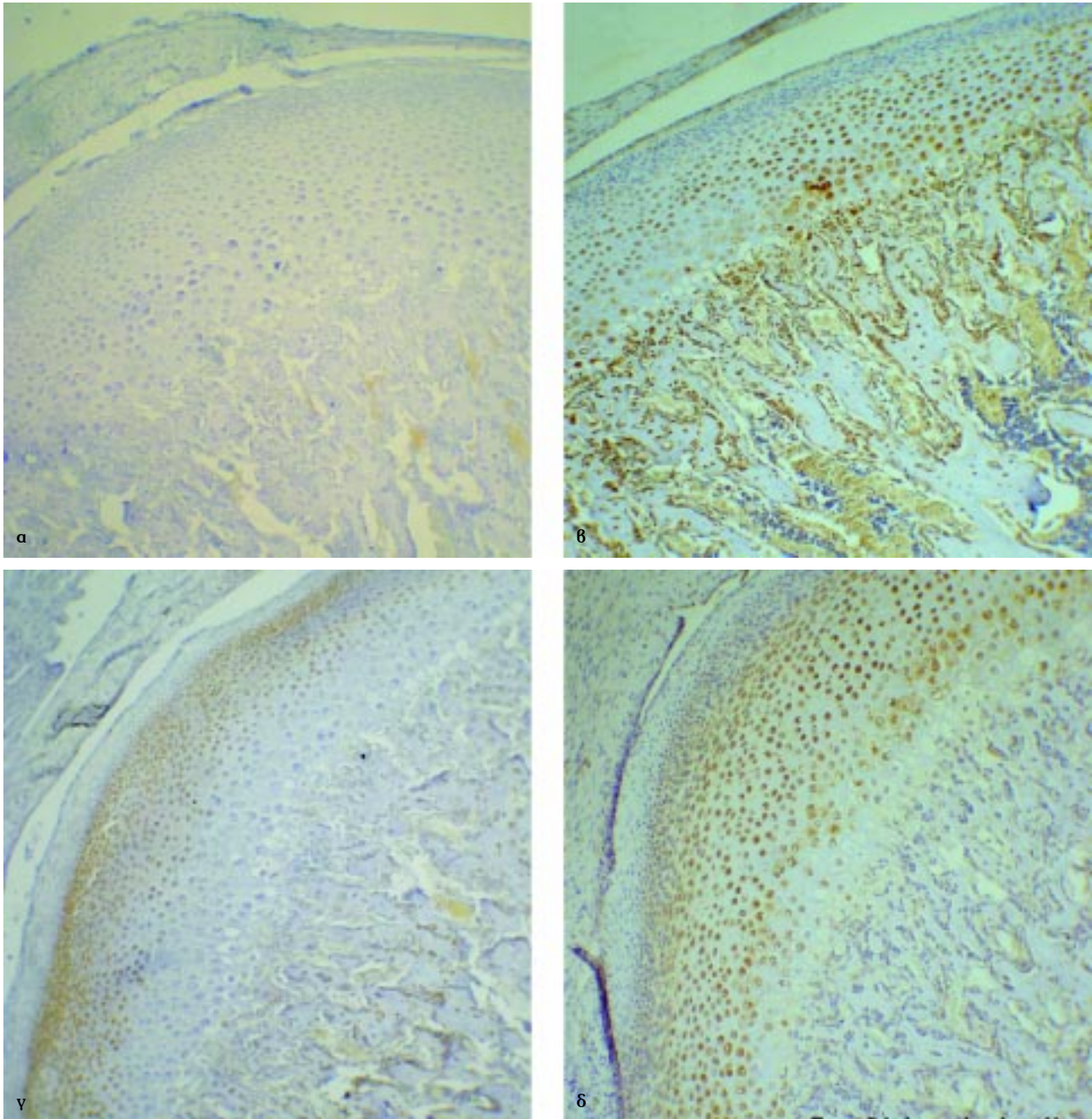


Εικόνα 3. Απουσία ανοσοέκφρασης (α) και μέτρια ανοσοέκφραση (β) της πρωτεΐνης JunD, στις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Ήπια (γ) και έντονη (δ) ανοσοϊστοχημική χρώση για την JunD, στις 24 ώρες μετά από τη λήψη μαλακής και σκληρής τροφής, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

ώρες από την αρχή του πειράματος ($P < 0,001$ και για τις δύο ομάδες) (πίν. 1).

Τα μέλη της οικογένειας Fos, Fra-1 και Fra-2, εντοπίστηκαν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων της επιφυσιακής πλάκας των κονδύλων των επίμυων που μελετήθηκαν (εικόνες 5, 6). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην

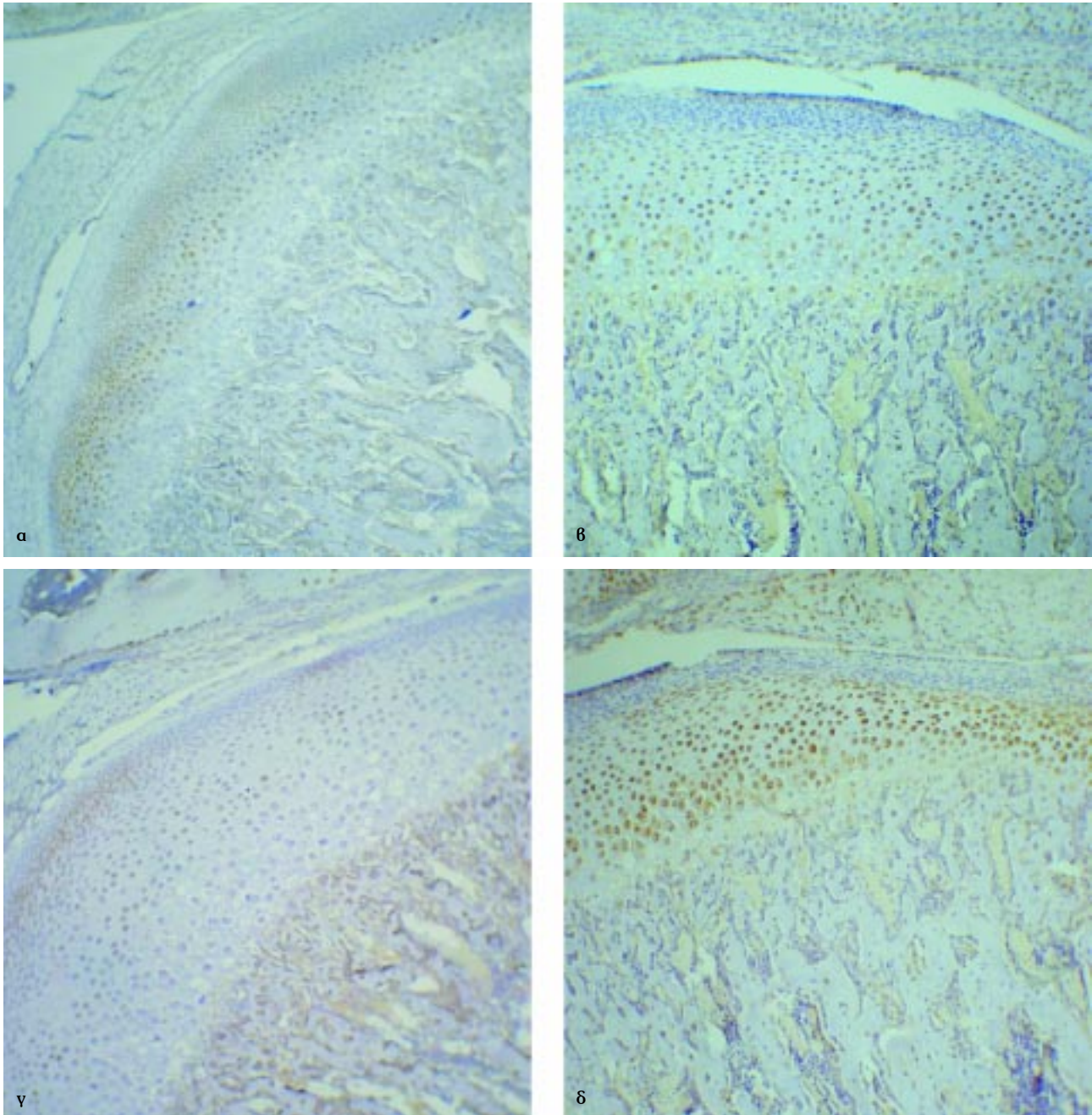
ένταση της χρώσης μεταξύ των ζώων που έλαβαν σκληρή και αυτών που έλαβαν μαλακή τροφή, τόσο στις 2 όσο και στις 24 ώρες ($P > 0,05$ και για τις δύο χρονικές στιγμές). Οι επίμυες που τρέφονταν με σκληρή τροφή εμφάνισαν σημαντικά εντονότερη ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών Fra-1 και Fra-2, στις 24 σε σχέση με τις 2 ώρες από την εκκίνηση της πειραματικής διαδικασίας ($P < 0,01$ και $P < 0,05$, αντίστοιχα) (πίν. 1).



Εικόνα 4. Απουσία ανοσοέκφρασης (α) και έντονη ανοσοχρώση (β) της πρωτεΐνης c-Fos, στις 2 ώρες από την έναρξη του πειράματος, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Μέτρια (γ) και πολύ έντονη (δ) ανοσοχρώση για τη c-Fos, στις 24 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

Η JNK2 ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων του αρθρικού χόνδρου των κονδύλων, στις ιστολογικές τομές που μελετήθηκαν (εικ. 7). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ένταση της ανοσοέκφρασης της JNK2 μεταξύ των επίμυων που έλαβαν μαλακή και αυτών που

έλαβαν σκληρή τροφή, τόσο στις 2 όσο και στις 24 ώρες ($P > 0,05$). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα κυτταρικής έκφρασης της JNK2 μεταξύ 2 και 24 ωρών, στους επίμυες που τρέφονταν με μαλακή τροφή ($P > 0,05$). Αντίθετα, τα ζώα που έλαβαν σκληρή τροφή εμφάνισαν στατιστικώς

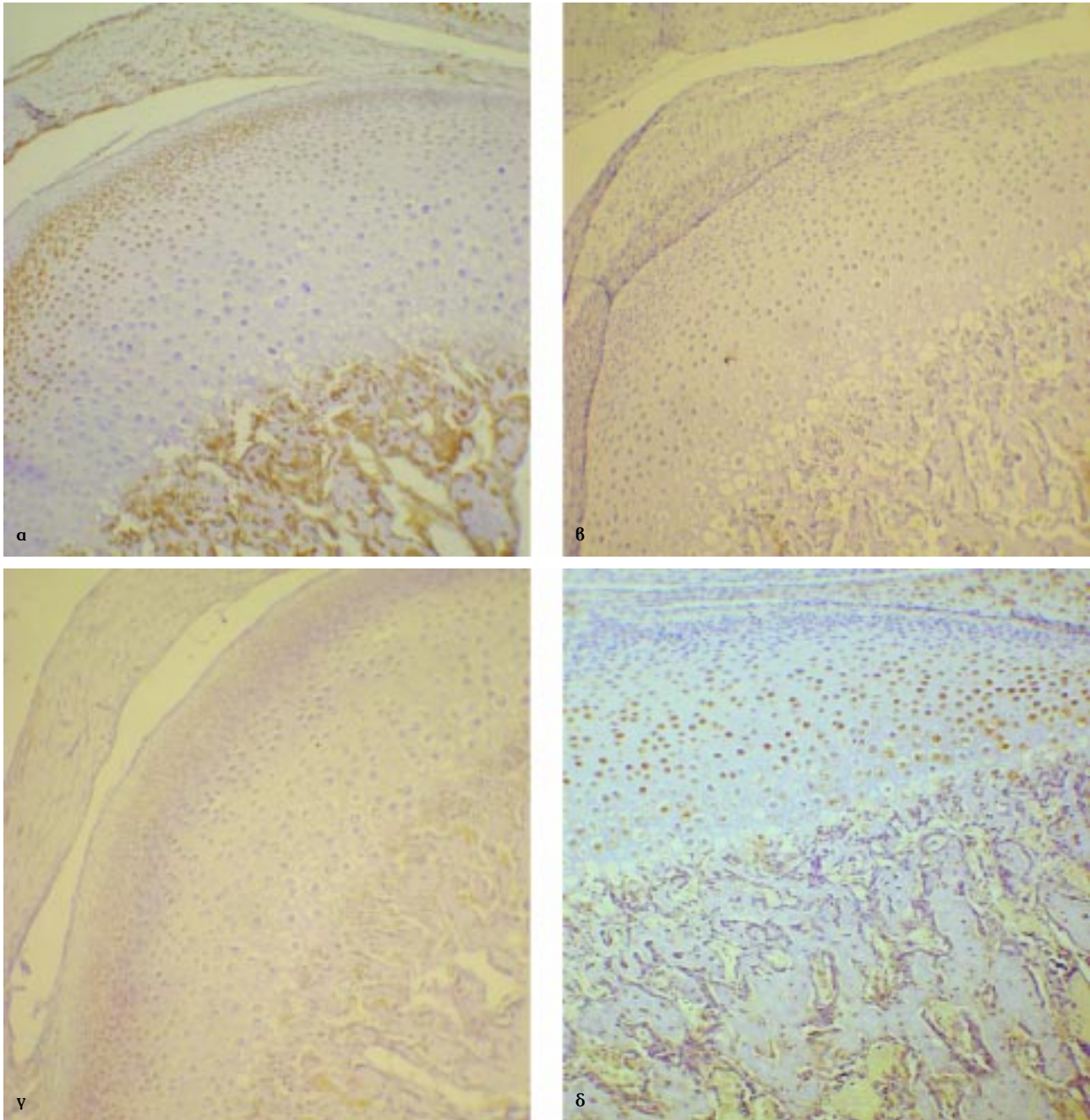


Εικόνα 5. Μέτρια (α) και έντονη (β) ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης Fra-1, στις 2 ώρες από την έναρξη του πειράματος, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Μέτρια (γ) και πολύ έντονη (δ) ανοσοχρώση για τη Fra-1, στις 24 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

σημαντικά υψηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης, στις 2 σε σχέση με τις 24 ώρες, από την έναρξη του πειράματος ($P < 0,05$) (πίν. 1).

Η φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της JNK2, p-JNK, εμφάνισε πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση (εικ. 8). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της p-JNK μεταξύ των ζώων που έλαβαν

σκληρή και αυτών που έλαβαν μαλακή τροφή, τόσο στις 2 όσο και στις 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος ($P > 0,05$). Εντούτοις, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα ανοσοϊστοχημικής χρώσης της p-JNK, μεταξύ 2 και 24 ωρών, και στις δύο ομάδες επίμυων ($P < 0,001$ και για τις δύο ομάδες) (πίν. 1).

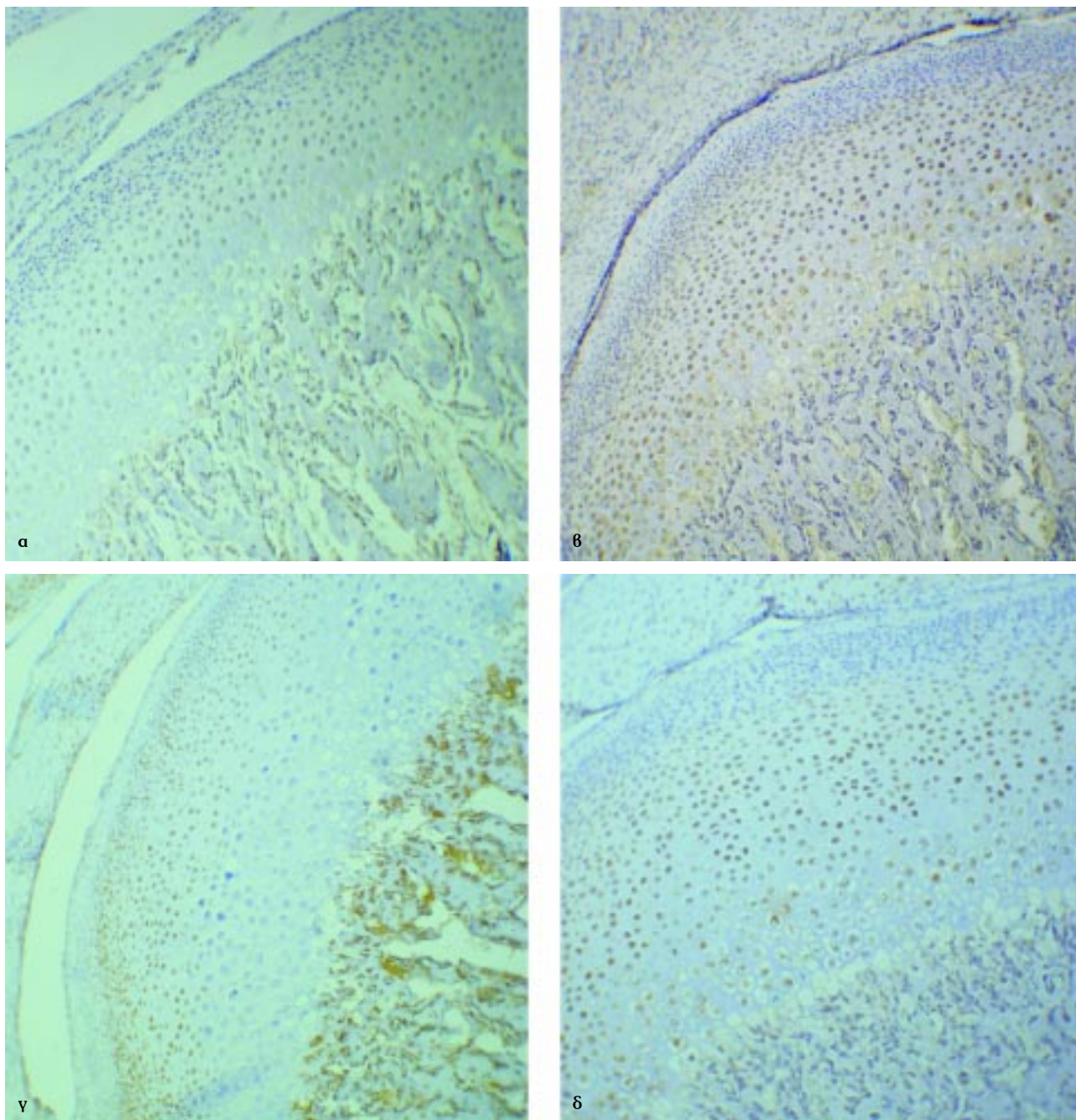


Εικόνα 6. Ήπια (α) και μέτρια (β) ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης Fra-2, στις 2 ώρες από την έναρξη του πειράματος, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Ήπια (γ) και έντονη (δ) ανοσοέκφραση της Fra-2, στις 24 ώρες μετά από τη λήψη μαλακής και σκληρής τροφής, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

Το μηχανικό φορτίο επάγει την έκφραση της ERK MAP κινάσης και του μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1/Runx2 στα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου

Η ενεργός-φωσφορυλιωμένη μορφή της ERK MAP κινάσης, p-ERK, εμφάνισε κυρίως πυρηνική εντόπιση, στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων του αρθρικού

χόνδρου στους κονδύλους που μελετήθηκαν (εικ. 9). Τα επίπεδα έκφρασης της p-ERK ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στους επίμυς που έλαβαν σκληρή σε σχέση με αυτούς που έλαβαν μαλακή τροφή στις 24 ώρες ($P < 0,01$), αλλά όχι στις 2 ώρες ($P > 0,05$). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 2 και 24 ωρών, τόσο στα

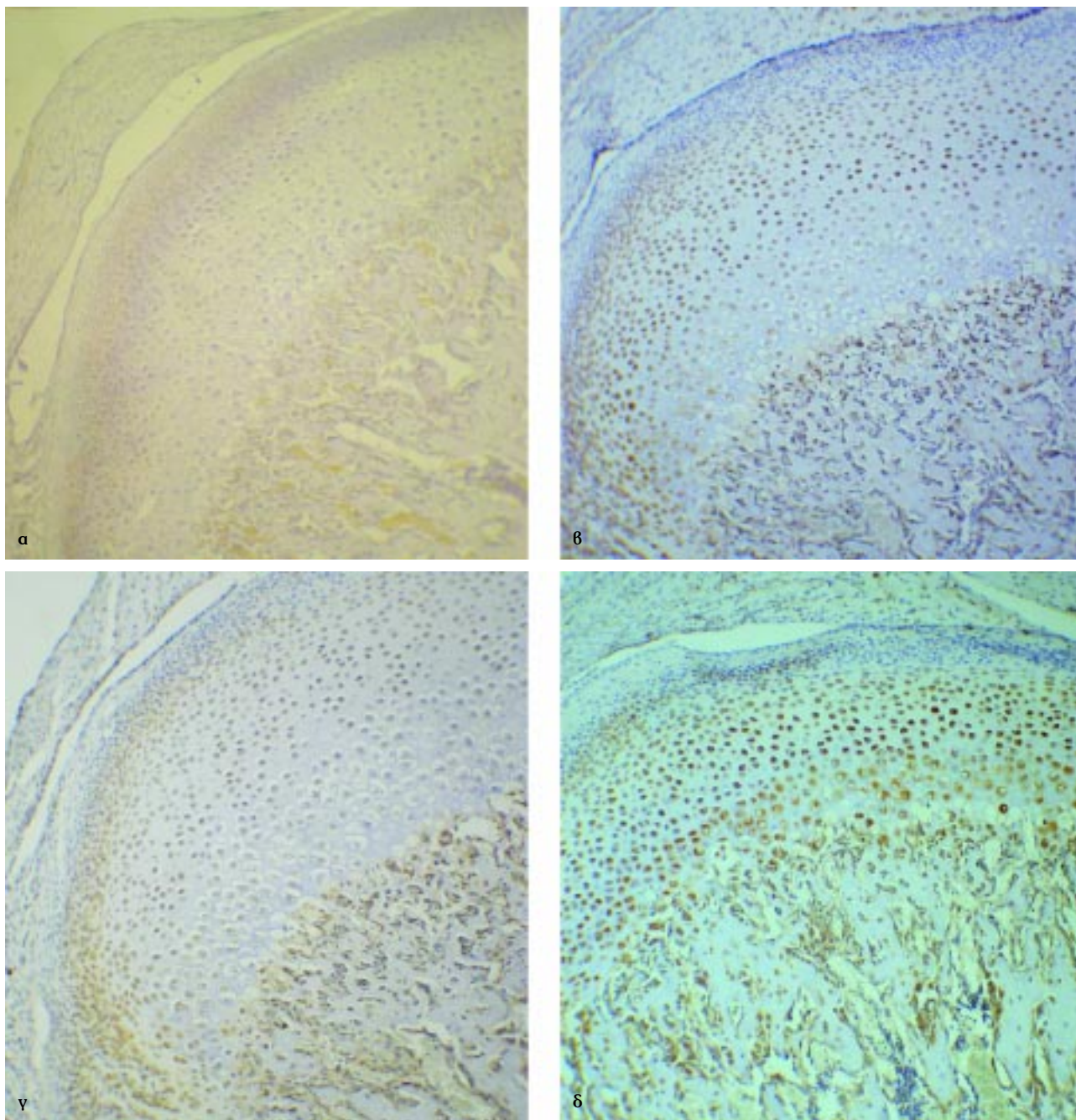


Εικόνα 7. Ήπια (α) και έντονη (β) ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης JNK2, στις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε πειραματόζωα που έλαβαν σκληρή και μαλακή τροφή, αντίστοιχα. Ήπια (γ) και πολύ έντονη (δ) ανοσοχρώση για την JNK2, στις 24 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

ζώα που έλαβαν σκληρή όσο και σ' αυτά που έλαβαν μαλακή τροφή ($P < 0,001$ και για τις δύο ομάδες) (πίν. 1).

Στα ζώα που θυσιάστηκαν στις 2 ώρες, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού ρυθμιστή Cbfa1/Runx2 όσον αφορά στη λήψη μαλακής ή σκληρής τροφής ($P > 0,05$). Η εντόπισή του ήταν κυρίως πυρηνική (εικ. 10). Όμως,

στις 24 ώρες, βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη έκφραση του Cbfa1/Runx2 στα ζώα που έλαβαν σκληρή σε σχέση με αυτά που έλαβαν μαλακή τροφή ($P < 0,01$). Τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού ρυθμιστή ήταν σημαντικά υψηλότερα στις 24 σε σχέση με τις 2 ώρες, τόσο στα ζώα που έλαβαν σκληρή όσο και σ' αυτά που έλαβαν μαλακή τροφή ($P < 0,001$ και για τις δύο ομάδες) (πίν. 1).

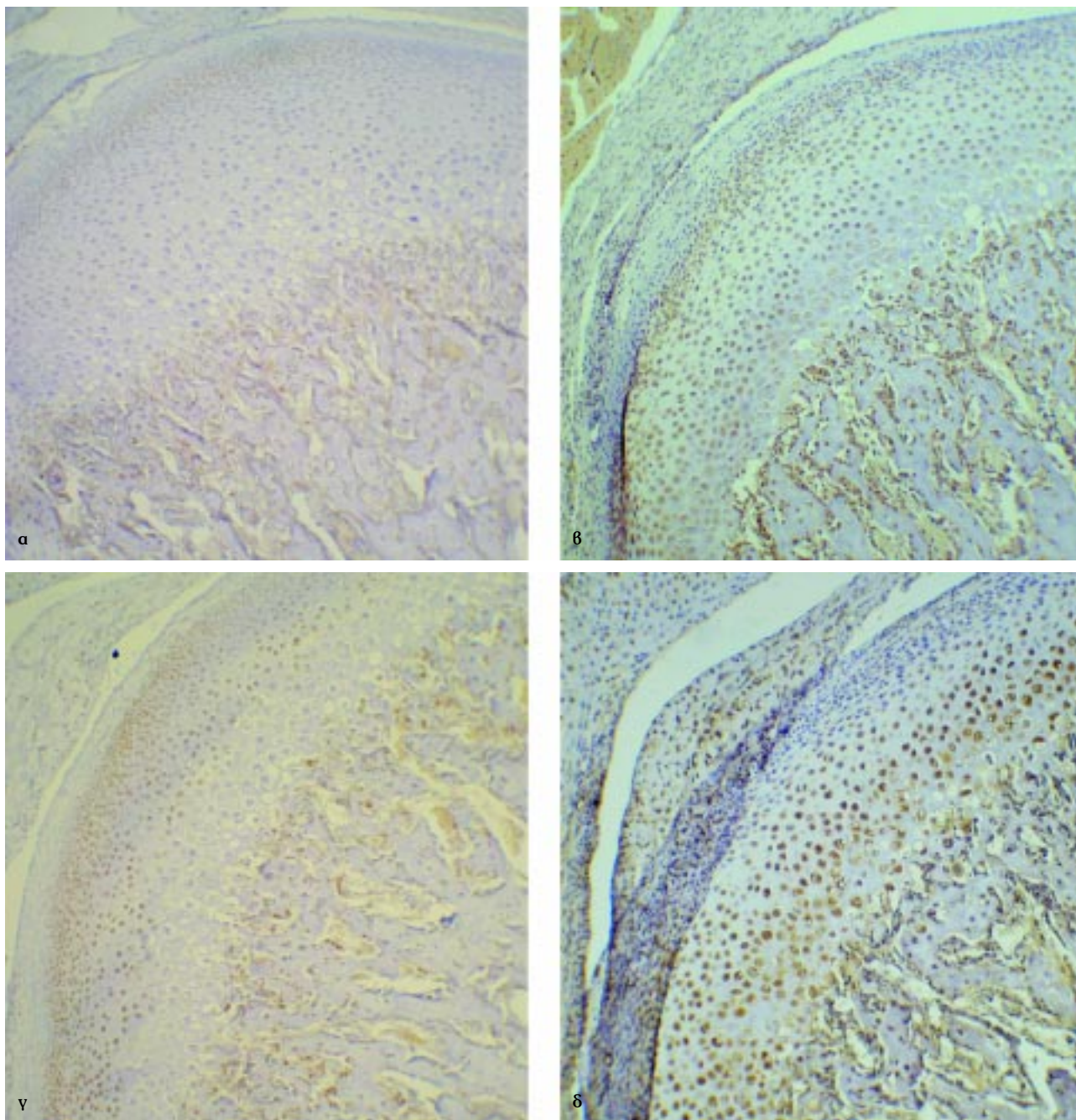


Εικόνα 8. Απουσία χρώσης (α) και έντονη ανοσοέκφραση (β) της πρωτεΐνης p-JNK, στις 2 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Έντονη (γ) και πολύ έντονη (δ) ανοσοχρώση για την JNK2, στις 24 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη και η διατήρηση του χονδρικού ιστού συνδέονται άμεσα με την επίδραση του μηχανικού φορτίου στα κύτταρα και την εξωκυττάρια ουσία του. Μικρής έντασης, περιοδικά φορτία εξασφαλίζουν τη φυσική και μηχανική ακεραιότητα του χόνδρου,¹ στοιχεία απαραίτητα για τη διασφάλιση της κινητικότητας των αρθρώσεων.

Τα μοριακά μονοπάτια που ελέγχουν την αντίδραση των κυττάρων του χονδρικού ιστού στη μηχανική διέγερση δεν έχουν μέχρι σήμερα διαλευκανθεί. Πρόσφατες *ex vivo* αναφορές προτείνουν τη συμμετοχή της μηχανικής συμπίεσης στην ενεργοποίηση των JNK και ERK MAP κινασών στον αρθρικό χόνδρο.^{1,19} Επιπρόσθετα, μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες οστεοβλαστών έδειξαν ότι μικρής έντασης μηχανικές δυνάμεις

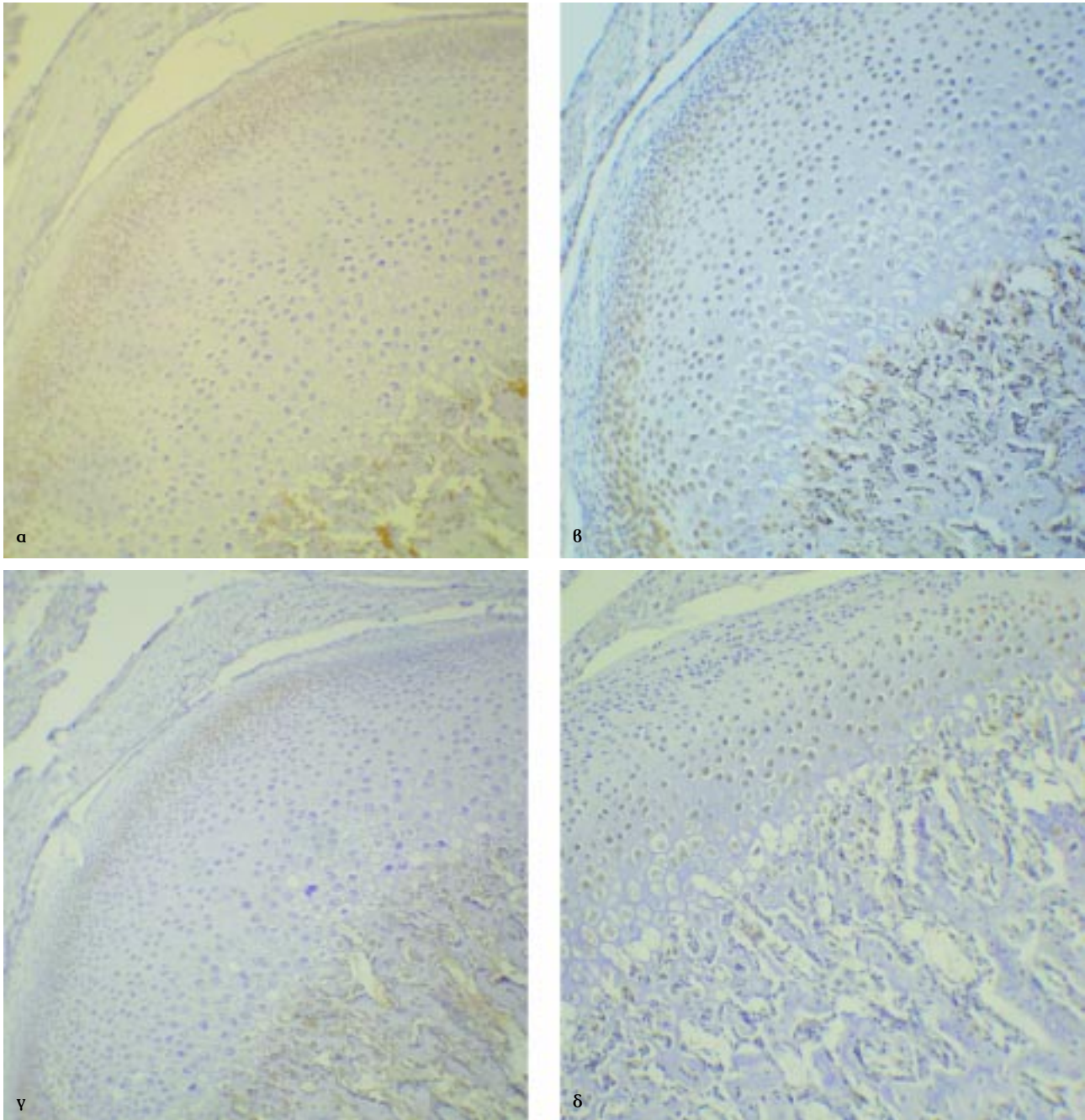


Εικόνα 9. Μέτρια (α) και έντονη (β) ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης p-ERK, στις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Μέτρια (γ) και πολύ έντονη (δ) ανοσοχρώση για την p-ERK, στις 24 ώρες, στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου πειραματόζωων που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

επάγουν την ενεργότητα των JNK και ERK MAPK μονοπατιών μεταγωγής σήματος, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα κύρια συστατικά του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (c-Jun και c-Fos).^{10,11}

Η επίδραση του μηχανικού φορτίου στη ρύθμιση των σηματοδοτικών οδών που προάγουν τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των χονδροκυττάρων δεν έχουν διε-

ρευνηθεί *in vivo*. Με στόχο να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης ή και ενεργοποίησης των μελών των οικογενειών Jun και Fos, καθώς και των κινασών JNK και ERK που τις φωσφορυλιώνουν στα χονδροκύτταρα, δημιουργήθηκε ένα περιβάλλον συνεχούς διέγερσης με την εφαρμογή μηχανικού φορτίου. Έτσι, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών στα κύτταρα



Εικόνα 10. Απουσία ανοσοχρώσης (α) και μέτρια (β) ανοσοέκφραση του μεταγραφικού ρυθμιστή Cbfa1/Runx2, στις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα. Μέτρια (γ) και έντονη (δ) ανοσοχρώση για τον Cbfa1/Runx2, στις 24 ώρες, σε πειραματόζωα που έλαβαν μαλακή και σκληρή τροφή, αντίστοιχα (αυθεντικές μεγεθύνσεις $\times 200$).

του χόνδρου της κροταφογναθικής διάρθρωσης επίμυων που τρέφονταν με σκληρή και μαλακή τροφή, συσχετίζοντάς τα τόσο με το είδος της χορηγούμενης τροφής όσο και με τη χρονική διάρκεια της μάσησης/διέγερσης (2 και 24 ώρες). Η ερευνητική προσέγγιση έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, καθώς αυτή επιτρέπει τον *in situ* έλεγχο των επιπέδων έκφρασης και ενεργοποίησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Παράλληλα, παρέχει τη

δυνατότητα εκτίμησης της μορφολογίας του αρθρικού χόνδρου, αναδεικνύοντας ταυτόχρονα τη διαφορετική κυτταρική ανοσοεντόπιση των ανενεργών και ενεργοποιημένων-φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνικών συστατικών των JNK και ERK μεταγωγικών μονοπατιών.²⁰

Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το μηχανικό φορτίο αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών-μελών των οικογενειών

των μεταγραφικών παραγόντων Jun και Fos στα χονδροκύτταρα της αρθρικής επιφάνειας. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν ομο- ή και ετεροδιμερή, συνθέτοντας το μεταγραφικό σύμπλοκο AP-1.²¹ Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει το διαφορετικό ρόλο των Jun και Fos AP-1 πρωτεϊνών στη ρύθμιση της λειτουργίας των κυττάρων. Αναλυτικότερα, ενώ η ενεργοποίηση της c-Jun συντελεί κυρίως στην προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ενεργοποίηση των JunB και JunD έχει κατά κύριο λόγο αντι-μιτωτική δράση, επάγοντας την απόπτωση.^{9,22} Τα μέλη της οικογένειας των Fos πρωτεϊνών, επίσης, ενέχονται τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο και στην απόπτωση των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας καταδεικνύουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στην ανοσοέκφραση των πρωτεϊνών pc-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1 και Fra-2 στις 24 σε σχέση με τις 2 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, κυρίως στα ζώα που τρέφονταν με σκληρή τροφή. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου πολλαπλασιάζονται, υπερτρέφονται και στη συνέχεια αποπίπτουν. Στην παρούσα μελέτη, οι AP-1 πρωτεΐνες βρέθηκαν υπερεκφρασμένες σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων του αρθρικού χόνδρου στους κονδύλους των κροταφογναθικών διαρθρώσεων. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η μηχανο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση όλων των AP-1 πρωτεϊνών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση όσο και στην απόπτωση των χονδροκυττάρων και συνάδουν απόλυτα με ευρήματα σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων οστεοβλαστών και ινοβλαστών, που δείχνουν αύξηση των επιπέδων έκφρασης και ενεργοποίησης της c-Jun υπό την επίδραση μηχανικής τάσης.^{11,23} Είναι γνωστό ότι η JNK MAP κινάση φωσφορυλιώνει και, συνεπώς, ενεργοποιεί τη c-Jun, ενώ συμμετέχει και στην ενεργοποίηση της c-Fos.⁹ Συγκεκριμένα, οι JNK MAPKs ενεργοποιούν τη c-Jun φωσφορυλιώνοντας ρυθμιστικά κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Ser-63 και Ser-73).^{24,25} Η φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της πρωτεΐνης c-Jun (pc-Jun) εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ασκεί τη δράση της ως μεταγραφικός παράγοντας λειτουργώντας ως θετικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού διαφόρων τύπων κυττάρων, όπως ινοβλαστών, ηπατοκυττάρων και οστεοβλαστών.²¹

Η παρούσα μελέτη κατέδειξε επαγωγή της ανοσοέκφρασης της φωσφορυλιωμένης-ενεργοποιημένης μορφής της c-Jun (pc-Jun) στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου, μετά την εφαρμογή μηχανικού φορτίου. Το προφίλ ενεργοποίησης της pc-Jun στις ιστολογικές τομές που

μελετήθηκαν βρισκόταν σε σύμπλευση με το προφίλ της κινάσης p-JNK που τη φωσφορυλιώνει. Από τα δεδομένα αυτά εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μηχανικό φορτίο προκαλεί επαγωγή του JNK-c-Jun μονοπατιού μεταγωγής σήματος στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου, συμμετέχοντας στη διαφοροποίησή τους. Η JNK2 εντοπίστηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων, ενώ η φωσφορυλιωμένη-ενεργός μορφή της (p-JNK), καθώς και η ενεργοποιημένη μορφή της c-Jun (pc-Jun), εμφάνισαν, κατά βάση, πυρηνική εντόπιση. Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν υπέρ μιας «ενορχηστρωμένης» επαγωγής του μονοπατιού στον αρθρικό χόνδρο μετά την επίδραση μηχανικού φορτίου. Ειδικότερα, η επίδραση του μηχανικού φορτίου στις κινάσες του κυτταροπλάσματος που βρίσκονται σε κατάσταση «ηρεμίας» επάγει την ενεργοποίηση και τη μετανάστευσή τους στον πυρήνα του χονδροκυττάρου, όπου η pc-Jun προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων ασκώντας τη δράση της ως ενεργός μεταγραφικός παράγοντας.

Στον πυρήνα του κυττάρου, η πρωτεΐνη c-Jun ομοδιμερίζεται ή ετεροδιμερίζεται με τη c-Fos, δημιουργώντας το μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι αύξηση της μηχανικής τάσης προκαλεί αύξηση της έκφρασης ή και της ενεργοποίησης της c-Fos σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών και οστεοβλαστών.^{11,23} Σε συμφωνία με αυτό το εύρημα, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε αύξηση της ανοσοέκφρασης της πρωτεΐνης στα χονδροκύτταρα της κροταφογναθικής διάρθρωσης επίμυων, υπό την επίδραση μηχανικού φορτίου (είδος τροφής και χρονική διάρκεια μάσησης). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το στοιχείο ότι η διαβάθμιση των επιπέδων ανοσοέκφρασης των πρωτεϊνών c-Fos και pc-Jun ήταν σε συμφωνία στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου. Το τελευταίο είναι ενδεικτικό της συμμετοχής του c-Jun-c-Fos AP-1 ετεροδιμερούς στη μηχανο-επαγόμενη διαφοροποίηση των κυττάρων του αρθρικού χόνδρου. Η ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο βασικών συντελεστών του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, c-Jun και c-Fos, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Είναι γνωστό ότι το γονίδιο *c-fos* φέρει στον υποκινητή του στοιχεία, τα οποία «αποκρίνονται» σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως κυταροκίνες, αυξητικοί και στρεσογόνοι παράγοντες. Ένα τέτοιο στοιχείο είναι το SRE (serum response element), στο οποίο δεσμεύεται, μεταξύ άλλων, και το μεταγραφικό σύμπλοκο TCF (ternary complex factor). Η JNK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον TCF, ενισχύοντας έτσι τη SRE-εξαρτώμενη έκφραση του γονιδίου *c-fos*.²¹ Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσο η μηχανική πυροδότηση του JNK μονοπατιού συμμετέχει στην αύξηση της έκφρασης της c-Fos.

In vitro πειράματα προτείνουν τη συμμετοχή του ERK MAPK μονοπατιού μεταγωγής σήματος και του μεταγραφικού ρυθμιστή Cbfa1/Runx2 στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των χονδροβλαστών.^{14,16,26,27} Εξάλλου, πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες οστεοβλαστών έδειξαν ότι υπό την επίδραση μηχανικού φορτίου οι JNK και ERK MAPKs ενεργοποιούν τον Cbfa1/Runx2, προάγοντας, έτσι, την οστεοβλαστική διαφοροποίηση.¹² Στην προσπάθειά μας να ελεγχθεί η συμμετοχή της ERK MAP κινάσης και του μεταγραφικού ρυθμιστή Cbfa1/Runx2 στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων *in vivo*, εκτιμήθηκε η μηχανο-επαγόμενη ανοσοέκφρασή τους στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου. Το προφίλ κυτταρικής έκφρασης της p-ERK ήταν σε συμφωνία με αυτό του Cbfa1/Runx2, στις ιστολογικές τομές που εκτιμήθηκαν. Η εντόπιση και των δύο πρωτεϊνών ήταν κυρίως πυρηνική και αφορούσε σε όλα τα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το μηχανικό φορτίο προκαλεί τη διέγερση του μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1/Runx2, η οποία εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση της ERK MAP κινάσης, και βρίσκονται σε πλήρη σύμπλευση με αντίστοιχα ευρήματα στους οστεοβλάστες.¹²

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα συστατικά των μονοπατιών μεταγωγής σήματος JNK-AP-1 και ERK διατελούν σε διαρκή αλληλεπίδραση με το μεταγραφικό ρυθμιστή Cbfa1/Runx2. Συγκεκριμένα, *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι τα κύρια συστατικά του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, οι πρωτεΐνες c-Jun και c-Fos, διαντιδρούν *in vitro* και *in vivo* με τον Cbfa1/Runx2, ο οποίος φέρει στον υποκινητή του γονιδίου που τον κωδικοποιεί θέση δέσμευσης για το AP-1 σύμπλοκο.^{28,29} Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ενίσχυση των επιπέδων έκφρασης του Cbfa1/Runx2 στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου μετά την επίδραση μηχανικού φορτίου, που συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση των επιπέδων έκφρασης των κυρίαρχων συστατικών του μεταγραφικού διμερούς AP-1 (πρωτεϊνών pc-Jun και c-Fos) και των JNK και ERK MAP κινασών που τα φωσφορυλιώνουν. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι είναι πιθανό τα μηχανο-επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια των JNK και ERK MAP κινασών να προάγουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1/Runx2, είτε με άμεση φωσφορυλίωσή του, είτε μέσω ενεργοποίησης του AP-1 διμερούς, συμμετέχοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των χονδροκυττάρων. Απαιτούνται περισσότερες βιοχημικές/λειτουργικές μελέτες προκειμένου να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση.

Τα χονδροκύτταρα του υαλοειδούς χόνδρου πολλαπλασιάζονται, υπερτρέφονται, ασβεστοποιούνται και τελικά αποπίπτουν. Η εναπομείνασα χόνδρινη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία σχηματίζει ικρίωμα, το οποίο χρησιμοποιείται από τους οστεοβλάστες προκειμένου να εναποθέσουν νεοσχηματιζόμενο οστίτη ιστό. Ένα ενδιαφέρον ιστομορφολογικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι στο υποχόνδριο οστό αναγνωρίστηκαν ενεργοποιημένοι οστεοβλάστες και εναπόθεση άωρου οστίτη ιστού. Είναι γνωστό ότι οι MAP κινάσες και ο μεταγραφικός ρυθμιστής Cbfa1/Runx2 παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών,^{13,30} καθώς και ότι το μηχανικό stress επάγει την ενεργοποίηση των JNK και ERK MAPK μεταγωγικών οδών και των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και Cbfa1/Runx2 σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα.^{11,12} Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, οι οστεοβλάστες του υποχόνδριου οστού της κροταφογοναθικής διάρθρωσης των επίμυων που ελέγχθηκαν στη μελέτη αυτή ανέδειξαν αυξημένη ανοσοέκφραση για όλες τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν. Η έκφραση ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στα ζώα που τρέφονταν με σκληρή τροφή, για 24 ώρες από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι το μηχανικό φορτίο επιδρά όχι μόνο στα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου, αλλά και στους υποχόνδριους οστεοβλάστες, επάγοντας τη διέγερσή τους μέσω της JNK, ERK-AP-1-εξαρτώμενης ενεργοποίησης του «κρίσιμου» ρυθμιστή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, Cbfa1/Runx2. Βιοχημικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη στο Εργαστήριό μας για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης.

Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι το μηχανικό φορτίο επάγει την JNK, ERK-AP-1-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Cbfa1/Runx2, συμμετέχοντας, έτσι, στη διαφοροποίηση/ωρίμανση των κυττάρων του αρθρικού χόνδρου. Λαμβάνοντας υπόψη το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι JNK και ERK MAPKs και ο Cbfa1/Runx2 στη βιολογία των χονδροκυττάρων και των οστεοβλαστών, η ταυτοποίηση ερεθισμάτων που αυξάνουν την έκφραση και προάγουν τη λειτουργία τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με απώλεια χόνδρου ή και οστού. Έτσι, η εφαρμογή ελεγχόμενου μηχανικού φορτίου θα ήταν δυνατό να ενισχύσει τη χονδρογενετική διαδικασία σε ασθενείς που πάσχουν από χονδροδυσπλαστικά/αχονδροπλαστικά νοσήματα. Τα νοσήματα αυτά κληρονομούνται κατά τον επικρατή αυτοσωμικό τύπο και χαρακτηρίζονται από διαταραχή στην ανάπτυξη του χονδρικού

ιστού. Εφαρμογή κατάλληλου μηχανικού φορτίου θα μπορούσε να ενισχύσει τη διαδικασία της χονδρογένεσης, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Ένα σημαντικό πεδίο θεραπευτικών εφαρμογών των μηχανικών δυνάμεων είναι η αντιμετώπιση γναθοπροσωπικών ανωμαλιών. Έτσι, ο προγναθισμός της κάτω γνάθου αντιμετωπίζεται με εφαρμογή δυνάμεων στον πώγωνα των ασθενών, σε μια προσπάθεια περιορισμού της περαιτέρω ανάπτυξης της κάτω γνάθου. Επιπλέον, η μηχανική διέγερση θα μπορούσε να συμβάλει στη θεραπευτική αντιμετώπιση καταστάσεων που σχετίζονται με διαταραχές της αύξησης/ανάπτυξης των οστών γενικότερα. Λαμβάνοντας υπόψη το σπουδαίο ρόλο των μηχανικών φορτίων στην ανάπτυξη των οστών, η πλήρης

διαλεύκανση του μηχανισμού μεταγωγής σήματος των μηχανικών δυνάμεων θα έδινε τη δυνατότητα θεραπευτικής παρέμβασης μέσω *de novo* σχεδιασμού μικρομοριακών φαρμακευτικών ουσιών, που μπορούν να στοχεύουν επιλεκτικά σε πρωτεΐνες-συστατικά των μονοπατιών, με σκοπό την ενεργοποίηση ή καταστολή τους και, επομένως, την ευόδωση ή παρεμπόδιση της σηματοδοτικής διαδικασίας. Πέρα από την προοπτική μιας τέτοιας στρατηγικής σε σοβαρές παθήσεις των οστών (π.χ. οστεοπόρωση), η σημερινή εποχή –αλλά πολύ περισσότερο το απώτερο(;) διαπλανητικό μας μέλλον– επιβάλλει τέτοιου είδους, θεωρητικές προς το παρόν, προσεγγίσεις σε καταστάσεις μειωμένης βαρύτητας.

ABSTRACT

Increased cartilage loading triggers differentiation/maturation of articular surface chondroblasts via activation of the MAPK–AP-1 signal transduction pathway

D.J. PAPACHRISTOU,¹ N.J. AGNANTIS,¹ A.G. PAPAVALASSILIOU,² E.K. BASDRA³

¹Department of Pathology, School of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, ²Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, Patras, ³Department of Orthodontics, School of Dentistry, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2004, 21(6):528–545

OBJECTIVE Mechanical loading is an important regulator of chondro-osteogenesis and a determinant of skeletal morphology. The molecular mechanisms underlying the chondroblastic response to mechanical cues remain elusive. Mitogen-activated protein/stress activated protein (MAP/SAP) kinase (MAPK) pathways and the activator protein-1 (AP-1) transcription complex have been shown to be involved in mechanically-stimulated osteoblast differentiation. Also, mechano-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAPKs activate the bone-specific transcriptional modulator core binding factor 1 (Cbfa1) Runx2, which is engaged in osteoblast/chondroblast (patho)biology. The present study was undertaken to explore the effect of mechanical load on c-Jun N-terminal kinase (JNK)–AP-1 and ERK signal transduction pathways activation and its implication in articular cartilage biology. **METHOD** One hundred rats were assigned to two groups: the first group was fed hard diet, causing increased joint loading, while the second was fed soft diet, simulating normal mastication. Biopsies from the temporomandibular joints of both groups were obtained at 2 and 24 hours post-experiment initiation, and the expression levels of a range of protein profiles were assessed immunohistochemically, specifically: pc-Jun (phosphorylated-active form of c-Jun), JunB and JunD (members of the Jun family of proteins), c-Fos (the major pc-Jun partner in forming the AP-1 transcription complex), Fra-1 and Fra-2 (members of the Fos family of proteins), JNK2 (principal c-Jun kinase), p-JNK (phosphorylated-active form of JNK), p-ERK (phosphorylated-active ERK species) and Cbfa1/Runx2. The above protein profiles were subjected to statistical correlation. **RESULTS** The protein levels of pc-Jun, c-Fos, p-ERK and Cbfa1/Runx2, but not those of JNK2, p-JNK, JunB, JunD, Fra-1 and Fra-2 were significantly higher in rats fed hard diet, at 24 but not at 2 hours after the experiment initiation. The immunorexpression of pc-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1, Fra-2, p-JNK, p-ERK and Cbfa1/Runx2 was significantly enhanced at 24 compared to 2 hours, especially in animals fed hard diet. **CONCLUSIONS** Increased cartilage loading induces the MAPK signaling pathway and it appears that the mechano-potentiated JNK and ERK cascades “converge” on AP-1 and Cbfa1/Runx2 transcription factors to regulate the chondroblastic differentiation/maturation process.

Key words: AP-1, Cbfa1/Runx2, Chondrocytes, MAP kinase, Mechanical load

Βιβλιογραφία

1. WONG M, CARTER DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003, 33:1–13
2. HEEGAARD JH, BEAUPRE GS, CARTER DR. Mechanically modulated cartilage growth may regulate joint surface morphogenesis. *J Orthop Res* 1999, 17:509–517
3. PIRTINIEMI P, KANTOMAA T. Effect of cytochalasin D on articular cartilage cell phenotype and shape in long-term organ culture. *Eur J Orthod* 1998, 20:491–499
4. ANTOMAA T, PIRTINIEMI P. Differences in biologic response of the mandibular condyle to forward traction or opening of the mandible. An experimental study in the rats. *Acta Odontol Scand* 1996, 54:138–144
5. TUOMINEN M, KANTOMAA T, PIRTINIEMI P. Effect of altered loading on condylar growth in rat. *Acta Odontol Scand* 1994, 52:129–134
6. TREISMAN R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996, 8:205–215
7. PAPAVALASSIOU AG, TREIER M, BOHMANN D. Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J* 1995, 14:2014–2029
8. ANGEL P, KARIN M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta* 1991, 1072:129–157
9. EFERL R, WAGNER EF. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Rev Cancer* 2003, 3:859–868
10. BASDRA EK, KOMPOSCH G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an *in vitro* analysis. *Eur J Orthod* 1997, 19:615–621
11. 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
12. ZIROS PG, ROJAS-GIL AP, GEORGAKOPOULOS T, HABEOS I, BASDRA EK, PAPAVALASSIOU AG. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002, 277:23934–23941
13. DUCY P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000, 219:461–471
14. KIM IS, OTTO F, MUNDLOS S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 1999, 80:159–170
15. KRONENBERG HM. Developmental regulation of growth plate. *Nature* 2003, 423:332–336
16. ENOMOTO H, ENOMOTO-IWAMOTO M, IWAMOTO M, NOMURA S, HIMENO M, KITAMURA Y ET AL. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 2000, 275:8695–8702
17. McCARTY KS Jr, MILLER LS, COX EB, KONRATH J, McCARTY KS Sr. Estrogen receptor analysis. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985, 109:716–721
18. KLOEN P, DI PAOLA M, BORENS O, RICHMOND L, PERINO G, HELFET DL ET AL. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* 2003, 33:362–371
19. FANNING PJ, EMKEY GE, SMITH RJ, GRODZINSKY AJ, SZASZ N, TRIPPEL SB. Mechanical regulation of mitogen-activated protein kinase signaling in articular cartilage. *J Biol Chem* 2003, 278:50940–50948
20. PAPAVALASSIOU AG, BATISTATOU A, SYKIOTIS GP, VARAKIS I, PAPAVALASSIOU AG. Activation of the JNK–AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone* 2003, 32:364–371
21. WHITMARSH AJ, DAVIS RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996, 74:589–607
22. SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 is a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biol* 2002, 4:131–136
23. 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
24. KALLUNKI T, SU B, TSGELNY I, SLUSS HK, DERIJARD B, MOORE G ET AL. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* 1994, 15:2996–3007
25. KARIN M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995, 270:16483–16486
26. MURAKAMI S, KAN M, McKEEHAN WL, CROMBRUGGHE B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the MAPK pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:1113–1118
27. KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, SASAKI K, DEGUCHI K, SHIMIZU Y ET AL. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturation arrest of osteoblasts. *Cell* 1997, 89:677–680
28. D'ALONZO RC, SALVAMURUGAN N, KARSENTY G, PATRIDGE NC. Physical interaction of the activator protein-1 factors c-Fos and c-Jun with Cbfa1 for collagenase-3 promoter activation. *J Biol Chem* 2002, 277:816–822
29. HESS J, PORTE D, MUNZ C, ANGEL P. AP-1 and Cbfa/Runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblast through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *J Biol Chem* 2001, 276:20029–20038
30. DAVIS RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000, 103:239–252

Corresponding author:

E.K. Basdra, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Aristotle University of Thessaloniki, GR-541 24 Thessaloniki, Greece