



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

Διπλωματική Εργασία

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΞΕΙΑΣ ΣΤΗΝ
ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΥΣΤΑΛΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ
ΛΕΙΑ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

Νικόλαος Τσιούγκος

Ειδ/νος Αλλεργιολόγος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ευφροσύνη Παρασκευά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Εργαστήριο Φυσιολογίας

Λάρισα 2013

Τριμελής επιτροπή:

- **Ευφροσύνη Παρασκευά**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Αποστολία Χατζηευθυμίου**, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Αναστάσιος Γερμενής**, Καθηγητής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Καταρχάς, θέλω να εκφράσω τις εκ βαθέων ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα των εργασιών μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, κα Ευφροσύνη Παρασκευά. Την ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος της εργασίας, την επιστημονική καθοδήγηση και πολύτιμη έμπρακτη βοήθεια της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Την ευχαριστώ επίσης για την κατανόηση, την επιμονή και υπομονή της. Η μεθοδικότητα της επιστημονικής της σκέψης και η σαφήνεια στον επιστημονικό της λόγο είναι για μένα υποδειγματικής σημασίας.

Τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Καθηγητή κο Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ενθάρρυνση που μου πρόσφερε σε δύσκολη στιγμή μου.

Τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κα Αποστολία Χατζηευθυμίου, Επίκουρο Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας και κα Χρυσή Χατζόγλου, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, ευχαριστώ για την αρμονική και γόνιμη συνεργασία.

Επίσης, την κα Α. Χατζηευθυμίου, όπως και τον κο Αναστάσιο Γερμενή, καθηγητή Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής ΠΘ, αμφοτέρους μέλη της τριμελούς επιτροπής, ευχαριστώ για το χρόνο αξιολόγησης της παρούσας εργασίας.

Την μετα-διδασκαρική ερευνήτρια του εργαστηρίου Φυσιολογίας κα Ροδόπη Σταματίου ευχαριστώ για την αρμονική συνεργασία και τις χρήσιμες υποδείξεις της σε θέματα εργαστηριακής τεχνικής.

Τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας κο Ηλία Μυλωνή, λέκτορα Βιοχημείας, κα Αγγελική Λυμπεροπούλου, μετα-διδασκαρική ερευνήτρια, και κα Χριστίνα Μπεφάνη, υποψήφια διδάκτορα, θέλω να ευχαριστήσω για την πρακτική βοήθεια που πάντα με προθυμία και ευγένεια μου προσέφεραν.

Τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κα Ελένη Γιαννή και κα Εράλντα Σαλάταϊ, όπως και τον τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κο Ιωάννη Μακαντάση, ευχαριστώ για την αρμονική και απρόσκοπτη συνεργασία.

Ακόμη, θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα την κα Βασιλική Νούτσου, γραμματέα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, που πάντοτε με ενδιαφέρον και ευγένεια μου συμπαραστάθηκε από τη θέση αυτή.

Ιδιαίτερη θέση τη στιγμή αυτή κατέχει η υποψήφια διδάκτορας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, κα Σταματίνα Τσαπουρνιώτη. Της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την καθοριστική συμβολή της, πρακτική κυρίως αλλά και ηθική, στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Ματίνα, χωρίς τη βοήθεια σου δεν ξέρω αν θα έγραφα τώρα αυτές τις γραμμές. Επίσης, την ευχαριστώ για την παρέα και τα γέλια που κάναμε.

Τη φίλη μου Χριστούλα ευχαριστώ για το χαμόγελο και την σημαντική ψυχολογική ώθηση που μου έδωσε κατά την συγγραφή της εργασίας αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την φροντίδα της. Ιδιαίτερος ευχαριστώ την αδερφή μου Αγλαΐα για την έμπρακτη στήριξή της όταν τη χρειάστηκα. Επίσης, ευχαριστώ την ξαδέρφη μου Κωνσταντίνα για την ηθική της υποστήριξη όταν τη χρειάστηκα.

Την εργασία αυτή αφιερώνω στη γιαγιά μου Αγλαΐτσα.

Λάρισα, 2013

Νίκος Τσιούγκος

*Or say that the end precedes the beginning,
And the end and the beginning were always there
Before the beginning and after the end.
And all is always now.*

(Four Quartets, l. 150-153, T. S. Eliot)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες.....	1
Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1. Αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και βρογχική υπεραπαντητικότητα στο άσθμα.....	5
1.2. Λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών.....	6
1.2.1. Φαινοτυπική πλαστικότητα και λειτουργική ετερογένεια λείων μυϊκών κυττάρων.....	6
1.2.1.1. Φαινοτυπική πλαστικότητα.....	8
1.2.1.2. Λειτουργική Ετερογένεια.....	10
1.2.1.2.1. Μηχανική πλαστικότητα.....	11
1.2.1.2.2. Ποικιλότητα πρωτεϊνικής έκφρασης.....	11
1.2.1.3. Φαινοτυπική πλαστικότητα και λειτουργική ετερογένεια: σημασία και σχέση με την παθογένεια του άσθματος.....	12
1.2.2. Συσταλτική συσκευή.....	15
1.2.2.1. Πρωτεΐνες παχιών νηματίων.....	16
1.2.2.1.1. Βαριές αλυσίδες μυοσίνης.....	16
1.2.2.1.2. Ελαφριές αλυσίδες μυοσίνης.....	17
1.2.2.2. Πρωτεΐνες λεπτών νηματίων.....	17
1.2.3. Φυσιολογία της συστολής.....	18
1.2.3.1. Συστολή εξαρτώμενη από το Ca ²⁺	18

1.2.3.2. Συστολή ανεξάρτητη από το Ca^{2+}	19
1.3. Η απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων στον παράγοντα φλεγμονής TNF-α	20
1.3.1. Παραγωγή και βιολογική σημασία του TNF-α.....	20
1.3.2. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταρική σηματοδότηση του TNF-α.....	21
1.3.3. Σύνθεση και ρύθμιση έκφρασης του TNF-α στους αεραγωγούς.....	22
1.3.4. Η σημασία του TNF-α στην παθογένεια της Ενιαίας Νόσου των Αεραγωγών (άσθμα, ρινίτιδα).....	22
1.3.4.1. Τα επίπεδα του TNF-α στους αεραγωγούς είναι αυξημένα στο άσθμα.....	22
1.3.4.2. Ο TNF-α επάγει τη βρογχική υπεραπαντητικότητα, τη χημειοταξία φλεγμονωδών κυττάρων και την ενεργοποίηση κυττάρων ανοσίας στους αεραγωγούς.....	23
1.3.4.3. Η αυξημένη έκφραση (συγκέντρωση) του TNF-α στους αεραγωγούς είναι χαρακτηριστική του σοβαρού άσθματος.....	24
1.3.5. Η σημασία του TNF-α στη συμβολή των λείων μυϊκών κυττάρων στη φλεγμονή και την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.....	25
1.3.5.1. Ο TNF-α αυξάνει την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών αεραγωγών ως απάντηση σε ποικίλους αγωνιστές σύσπασης.....	26
1.3.5.1.1. Μηχανισμός επαγωγής βρογχικής υπεραπαντητικότητας από τον TNF-α.....	26
1.3.5.2. Ο TNF-α επάγει τον «συνθετικό / πολλαπλασιαστικό» φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών.....	27

1.4. Η απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών στην υποξία και την υποξική φλεγμονή.....	28
1.4.1. Σημασία και ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου.....	28
1.4.1.1. HIF: Ρόλος και ρύθμιση από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου.....	28
1.4.1.2. Ο HIF-1 συμβάλλει στην αλλεργική φλεγμονή των αεραγωγών και την παθοφυσιολογία του άσθματος.....	31
1.4.1.3. Απόκριση λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών στην υποξία.....	32
1.4.2. Απόκριση λείων μυϊκών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και φλεγμονής.....	33
1.4.2.1. Λειτουργική διάδραση (Cross talk) NF-κB και HIF.....	33
1.4.2.2. Η απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών στον TNF-α και την υποξία.....	35
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	37
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
3.1. Καλλιέργεια κυττάρων.....	38
3.2. <i>In vitro</i> διαφοροποίηση λείων μυϊκών κυττάρων.....	38
3.3. Κατεργασία των κυττάρων.....	39
3.4. Απομόνωση ολικού RNA.....	39
3.5. Εκτίμηση της συγκέντρωσης του RNA.....	40
3.6. Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή.....	40
3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	42
3.7.1. Αρχή της μεθόδου.....	42

3.7.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR).....	44
3.7.2.1. Συνθήκες αντίδρασης.....	45
3.7.2.2. Διάγραμμα ενίσχυσης: threshold και C _T value, δύο χρήσιμοι όροι.....	47
3.7.2.3. Έλεγχος βελτιστότητας αντιδράσεων ενίσχυσης.....	49
3.7.2.3.1. Πρότυπη καμπύλη (Standard Curve).....	50
3.7.2.3.2. Απόδοση ενίσχυσης E.....	51
3.7.2.4. Ανάλυση καμπύλης τήξης (melt curve analysis).....	52
3.7.2.5. Ποσοτικοποίηση έκφρασης mRNA.....	52
3.7.2.6. Επιλογή κατάλληλου ενδογενούς γονιδίου ελέγχου.....	54
3.7.2.7. Στατιστική επεξεργασία.....	55
3.8. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	55
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
4.1. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης mRNA πρωτεϊνών συστολής των λειών μυϊκών κυττάρων με RT-qPCR.....	58
4.1.1. Πρότυπες καμπύλες και έλεγχος της απόδοσης ενίσχυσης E των αντιδράσεων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για την έκφραση των mRNA των πρωτεϊνών συστολής των ΛΜΚ αεραγωγών.....	58
4.1.1.1. Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της <i>Actin a2</i>	60
4.1.1.2 Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της <i>SMMHC</i>	60
4.1.1.3 Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της <i>MLCK</i>	61

4.1.1.4 Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της <i>SM22</i>	62
4.1.2 Καμπύλες Τήξης.....	64
4.1.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης mRNA πρωτεϊνών συστολής.....	65
4.1.3.1 Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της <i>SMMHC</i>	65
4.1.3.2 Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της <i>Actin α2</i>	68
4.1.3.3 Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της <i>SM22</i>	70
4.1.3.4 Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της <i>MLCK</i>	71
4.2. Έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών συστολής.....	72
4.2.1. Ανίχνευση των πρωτεϊνών συστολής με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	72
4.2.1.1. Ανίχνευση της <i>SMMHC</i>	73
4.2.1.2. Ανίχνευση της Phospo-MLC2.....	74
4.2.1.3. Ανίχνευση της <i>Actin α2</i>	75
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

Συντομογραφίες

BVA: Βρογχική υπεραπαντητικότητα

AMK: Λεία μυϊκά κύτταρα

MO: Μέσος όρος

cDNA: Complementary DNA — Συμπληρωματικό DNA

DNA: Deoxyribonucleic acid — Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

dNTPs: Deoxynucleotide Triphosphates — Τριφωσφοδεοξυριβονουκλεοτίδια

FBS: Fetal Bovine Serum — Ορός εμβρύου βοός

GPCRs: G protein coupled receptors — Υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor — Διεγερτικός παράγοντας αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων

HGF: Hepatocyte growth factor — Αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων

HIF: Hypoxia Inducible Factor — Επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας

IP3: Inositol trisphosphate — Τριφωσφορική ινοσιτόλη

MLC2: Myosin light chain 2 — Ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης

MLCK: Myosin light chain kinase — Κινάση ελαφριάς αλυσίδας μυοσίνης

MLCP: Myosin light-chain phosphatase — Φωσφατάση ελαφριάς αλυσίδας μυοσίνης

OD: Optical Density — Οπτική πυκνότητα

PBS: Phosphate buffer saline — Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PCR: Polymerase chain reaction — Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PDGF: Platelet-derived growth factor — Αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων

PHD: Prolyl-hydroxylase — Προλυλ-υδροξυλάση

Phospho-MLC2: Φωσφορυλιωμένη ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase — Κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3

PKC: Protein kinase C — Πρωτεϊνική κινάση C

PLC: Phospholipase C — Φωσφολιπάση C

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ — Πυρηνικός υποδοχέας ενεργοποίησης των υπεροξυσωματίων τύπου γ

rh TNF: Recombinant human TNF — Ανασυνδυασμένος ανθρώπινος TNF

RNA: Ribonucleic acid — Ριβονουκλεϊκό οξύ

ROCK: Rho kinase — Κινάση Rho

ROS: Reactive oxygen species — Ενεργές ρίζες οξυγόνου

RT-qPCR: Real Time-quantitive PCR — Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

SE: Standard error — τυπικό σφάλμα

SMMHC: Smooth-Muscle Myosin Heavy-Chain — Βαριά αλυσίδα μυοσίνης λείου μυός

TGF: Transforming growth factor — Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης

TNF: Tumor necrosis factor — Παράγοντας νέκρωσης των όγκων

UDG: Uracil-DNA glycosylase — Γλυκοσιλάση της DNA-ουρακίλης

VEGF: Vascular endothelial growth factor — Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

Περίληψη

Η φαινοτυπική πλαστικότητα και η λειτουργική ετερογένεια των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) αεραγωγών συνιστούν ένα πολύ-λειτουργικό και δυναμικό φάσμα συμπεριφοράς, άμεσα συνυφασμένο με την φλεγμονή και την υποξία που συχνά συσχετίζονται στην ενορχήστρωση της ιστικής αναδιαμόρφωσης και βρογχικής υπεραπαντητικότητας στο άσθμα.

Στην παρούσα μελέτη, επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του φλεγμονώδους μεσολαβητή TNF-α ή/και της υποξίας στην έκφραση των πρωτεϊνών συστολής SMMHC, MLCK, α2 ακτίνη, SM22 και phospho-MLC2 των ΛΜΚ αεραγωγών.

Πρωτογενείς καλλιέργειες *in vitro* διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων επωάστηκαν για 24 ώρες παρουσία ή απουσία TNF-α σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Ολικά εκχυλίσματα RNA απομονώθηκαν σε κάθε πειραματική συνθήκη και τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *SMMHC*, *MLCK*, α2 ακτίνη και *SM22* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Επίσης, έγινε ενδοκυττάρια αντίχνευση των πρωτεϊνών SMMHC, α2 ακτίνη και phospho-MLC2 με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.

Ο TNF-α προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης της SMMHC στη νορμοξία αλλά και στην υποξία. Η κατεργασία στην υποξία όπως και η κατεργασία με TNF-α, σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, προκάλεσαν μείωση των επιπέδων mRNA της MLCK. Ωστόσο, τα επίπεδα πρωτεΐνης του υποστρώματος της MLCK phospho-MLC2 φάνηκε να είναι αυξημένα στην υποξία, παρουσία ή απουσία TNF-α, υποδεικνύοντας αύξηση της δραστηριότητας της MLCK στις συνθήκες αυτές, πιθανόν μέσω μετά-μεταγραφικής ρύθμισης. Ο TNF-α και η υποξία, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, προκάλεσαν περιορισμένες αλλαγές των επιπέδων έκφρασης mRNA της α2 ακτίνης, οι οποίες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η αντίχνευση της πρωτεΐνης α2 ακτίνη δεν κατέδειξε εμφανείς διαφορές των επιπέδων έκφρασης της μεταξύ των συνθηκών της μελέτης. Ο TNF-α και η υποξία, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, μείωσαν την έκφραση mRNA της SM22 χωρίς, ωστόσο, η συνδυαστική τους επίδραση στην έκφραση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Φαίνεται ότι ο TNF-α και η υποξία ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων πρωτεϊνών συστολής σε *in vitro* διαφοροποιημένα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων.

Abstract

Dynamic multifunctional behavior of airway smooth muscle cells (ASMCs), namely phenotype plasticity and functional diversity, is directly involved with tissue inflammation that often interrelates with hypoxia in orchestrating airway remodeling and hyperresponsiveness characteristic of asthma.

Herein, we sought to investigate the effect of individual or combined treatment of ASMCs with the inflammatory mediator TNF- α and/or hypoxia on the expression of the contractile proteins SMMHC, MLCK, $\alpha 2$ actin, SM22 and phospho MLC2.

Primary *in vitro* differentiated human bronchial ASMC cultures were incubated for 24 hours in the presence or absence of TNF- α under normoxia or hypoxia. Total RNA was extracted, reverse transcribed and mRNA expression levels of *SMMHC*, *MLCK*, *$\alpha 2$ actin* and *SM22* were determined by quantitative real-time PCR. Intracellular detection of SMMHC, $\alpha 2$ actin and phospho MLC2 was assessed by immunofluorescence microscopy.

TNF- α increased SMMHC mRNA and protein levels under both normoxia and hypoxia. Treatment under hypoxia as well as treatment with TNF- α , under normoxia or hypoxia, decreased MLCK mRNA levels. However, protein levels of MLCK substrate phospho-MLC2 appeared to be augmented in hypoxia, in the presence or absence of TNF- α , implying up-regulation of MLCK activity by post-transcriptional mechanisms in these conditions. TNF- α and hypoxia, alone or in combination, had modest effects on $\alpha 2$ actin mRNA levels and these effects were not statistically significant. Detection of $\alpha 2$ actin provided no apparent alterations in protein levels among study conditions. TNF- α and hypoxia, alone or in combination, down-regulated SM22 mRNA, but their combined effect was not statistically significant.

TNF- α and hypoxia appear to regulate expression of contractile genes in *in vitro* differentiated human bronchial ASMCs.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και βρογχική υπεραπαντητικότητα στο άσθμα.

Το άσθμα είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών, φλεγμονή και δομικές αλλαγές στο τοίχωμα των βρόγχων οι οποίες περιλαμβάνουν απογύμνωση του επιθηλίου, υπερτροφία των βλεννοπαραγωγών αδένων, υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ), πάχυνση της δικτυωτής βασικής μεμβράνης, υποεπιθηλιακή συσσώρευση ουσιών της θεμέλιας ουσίας, αύξηση του αριθμού των υποβλεννογόνιων μυοϊνοβλαστών, νεοαγγειογένεση και προέκταση των νευρικών κυττάρων. Οι δομικές αυτές αλλαγές, γνωστές ως αναδιαμόρφωση των αεραγωγών, πυροδοτούνται πιθανόν από λοιμώδη ή/και αλλεργιογονική προσβολή που οδηγεί σε κυτταρική βλάβη και διήθηση των αεραγωγών από ποικιλία φλεγμονωδών κυττάρων, κυρίως Τ λεμφοκυττάρων και ηωσινοφίλων (Al-Muhsen et al., 2011).

Η βρογχική υπεραπαντητικότητα (BYA), δηλαδή η χαρακτηριστική ιδιότητα των ατόμων με βρογχικό άσθμα να παρουσιάζουν βρογχόσπασμο μετά την έκθεση τους σε διάφορα αντιγόνα ή κάτω από την επίδραση διαφόρων φυσικών αιτιών, αποτελεί κύριο εύρημα στο άσθμα και χρησιμοποιείται ως αντικειμενικός δείκτης μελέτης της νόσου. Η «υπερβολική» αυτή απάντηση των ΛΜΚ των αεραγωγών σε αγωνιστές σύσπασης, η οποία συνίσταται σε μείωση της απαιτούμενης συγκέντρωσης αγωνιστή για την επαγωγή συστολής αλλά και αύξηση του βαθμού σύσπασης ως απάντηση σε δεδομένη συγκέντρωση αγωνιστή, οφείλεται εν πολλοίς στο συνδυασμό αύξησης της μάζας των ΛΜΚ, σε αριθμό και μέγεθος, και αύξησης της συσταλτότητας όπως και υπολειμματικής ικανότητας χάλασης των ΛΜΚ (Black et al., 2012).

Η χρόνια τοπική φλεγμονή των αεραγωγών οδηγεί σε σταδιακές δομικές αλλαγές και αποτελεί βασικό συστατικό της ανάπτυξης αναστρέψιμης BYA και άσθματος. Τόσο η οξεία όσο και η χρόνια φλεγμονή ενορχηστρώνονται από ποικίλες κυτοκίνες των Τ λεμφοκυττάρων και μαστοκυττάρων, όπως IL-1β, IL-5, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α αλλά και ποικίλους μεσολαβητές όπως τα κυστεϊνιλικά λευκοτριένια και οι ισοπροστάνες. Επιπρόσθετα, τα ΛΜΚ, τα επιθηλιακά κύτταρα και οι μυοϊνοβλάστες παράγουν μεσολαβητές που

συμβάλλουν στην εγκατάσταση και εξέλιξη της φλεγμονής, επάγοντας έτσι την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και τη BYA (Al-Muhsen et al., 2011).

1.2. Λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών

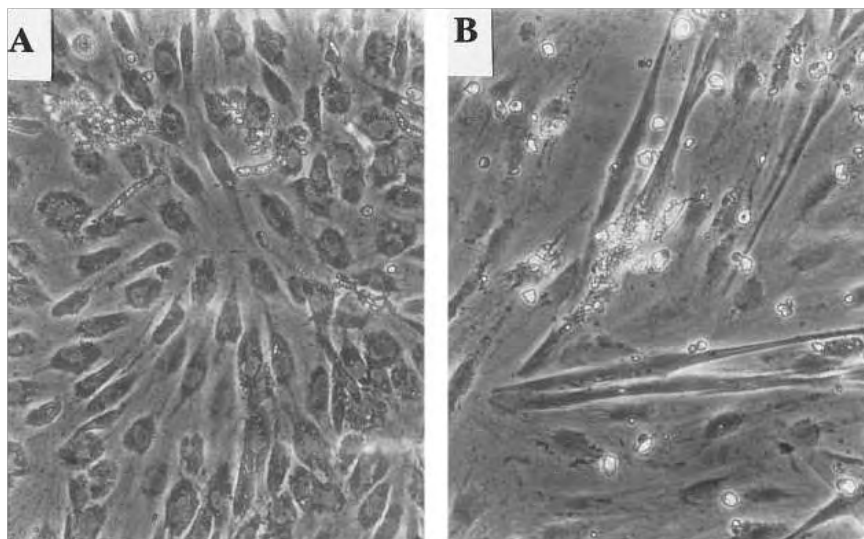
Στους αεραγωγούς, τα ΛΜΚ περιβάλλουν τον αυλό των βρόγχων. Στους ανώτερους αεραγωγούς, αποτελούν κατά προσέγγιση το 25% της κυτταρικής μάζας και κατανέμονται κυρίως στο οπίσθιο τμήμα του χόνδρου της τραχείας. Στους κατώτερους αεραγωγούς, αποτελούν το 4-5% της κυτταρικής μάζας και είναι προσανατολισμένα σε ένα μοτίβο έλικας-αντιέλικας «αγκαλιάζοντας» τους βρόγχους. Ο προσανατολισμός αυτός συνιστά μια αρχιτεκτονική δομή ικανή να ενισχύει και να διατηρεί τη σύσπαση των βρόγχων.

Τα ΛΜΚ ασκούν δυναμικό έλεγχο στην διάμετρο των αεραγωγών και συντονιστικό ρόλο στις διαδικασίες φλεγμονής και ιστικής αναδιαμόρφωσης που παρατηρούνται σε ασθένειες όπως το άσθμα. Ο έλεγχος της διαμέτρου των αεραγωγών γίνεται τόσο οξέως, μέσω της συσταλτικής τους ικανότητας και αναστρέψιμης σύσπασης των βρόγχων, όσο και χρονίως, μέσω της πολλαπλασιαστικής/συνθετικής τους ικανότητας και υπερπλασίας/υπερτροφίας που αυτή συνεπάγεται. Επιπλέον, τα ΛΜΚ ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση και τη δομή των αεραγωγών μέσω της σύνθεσης και έκκρισης κυτοκινών, χημειοκινών και πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (Black et al., 2012).

1.2.1. Φαινοτυπική πλαστικότητα και λειτουργική ετερογένεια λείων μυϊκών κυττάρων.

Τα τελευταία 40 χρόνια η *in vitro* και *in vivo* έρευνα στα ΛΜΚ των αγγείων οδήγησε στη γενική ιδέα ότι υπάρχει ένα δυναμικό φαινοτυπικό φάσμα διαφοροποιημένων ΛΜΚ που κυμαίνεται μεταξύ μιας επονομαζόμενης «συσταλτής» και μιας «συνθετικής/πολλαπλασιαστικής» κατάστασης (Chamley-Campbell et al., 1979; Wissler, 1967). Μυοκύτταρα του συσταλτού φαινοτύπου υπάρχουν σε όλο το σώμα και είναι πρωταρχικώς σχεδιασμένα για τη συστολή ή τη χάλαση ως απάντηση σε χημικά ή μηχανικά σήματα. Τα «συνθετικά/πολλαπλασιαστικά» κύτταρα παρουσιάζουν ένα «ανώριμο» φαινότυπο, όπως έχει επονομαστεί, που χαρακτηρίζεται από τάση πολλαπλασιασμού και σύνθεσης προϊόντων της θεμέλιας ουσίας και άλλων βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών.

Πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ αεραγωγών, από παρασκευάσματα τραχείας σκύλου, πρωτοπεριγράφηκαν μόλις μετά το 1980 (Avner et al., 1981). Εννέα χρόνια αργότερα (Panettieri et al., 1989; Twort and van Breemen, 1989), αναφέρθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ΛΜΚ, οδηγώντας στη μελέτη της έκφρασης και της λειτουργίας κυτταρικών υποδοχέων, διαύλων ιόντων και παραγόντων ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Twort and van Breemen, 1989). Μολονότι υπήρχαν ενδείξεις ότι πρόσφατα απομονωμένα σε καλλιέργεια ΛΜΚ αεραγωγών τροποποιούνται από ένα αρχικά συσταλτό φαινότυπο, δεν ήταν παρά στα τέλη της δεκαετίας του '90 όταν συστηματικές περιγραφές της φαινοτυπικής και λειτουργικής μεταστροφής άρχισαν να δημοσιεύονται (Halayko et al., 1999; Halayko et al., 1996; Ma et al., 1997) (εικ. 1). Το γεγονός αυτό παρείχε ώθηση στη μεγάλου εύρους μελέτη της λειτουργίας των ΛΜΚ των αεραγωγών. Μελέτες των βιολογικών και μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν το φαινότυπο και τη λειτουργία των ΛΜΚ πέρασαν στο προσκήνιο, αποκαλύπτοντας την εκτενή συμμετοχή των κυττάρων αυτών στην παθοφυσιολογία των αποφρακτικών νόσων του αναπνευστικού.



Εικόνα 1. Επιμήκη ατρακτοειδή κύτταρα που εκφράζουν μεγάλες ποσότητες ρυθμιστικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών της συσταλτικής συσκευής συνυπάρχουν σε δεσμίδες στην ίδια καλλιέργεια με ένα δεύτερο υποπληθυσμό που αποτελείται από δορυφορικά επίπεδα κύτταρα με χαμηλότερη έκφραση των προαναφερθέντων δεικτών (Ma et al., 1997)

1.2.1.1. Φαινοτυπική πλαστικότητα

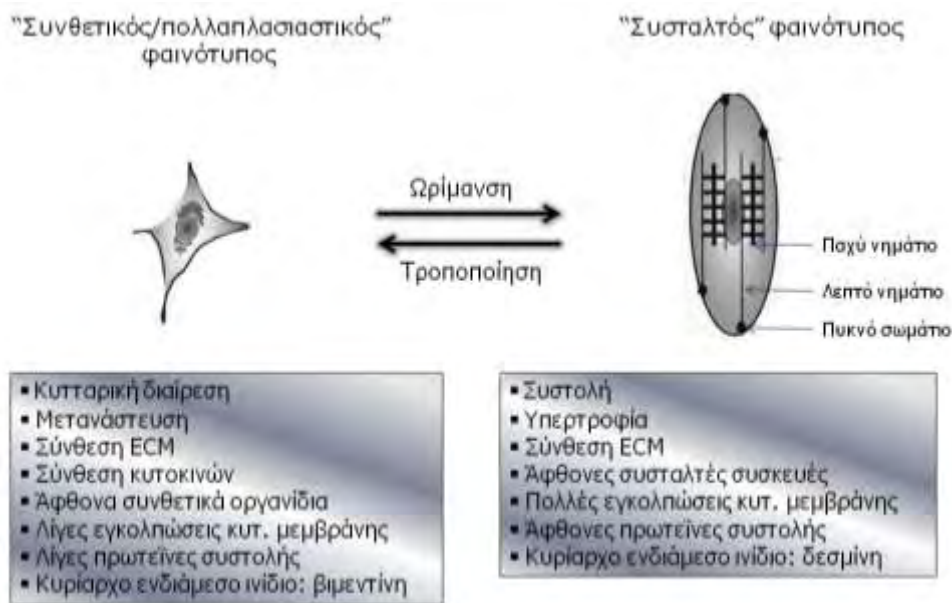
Η φαινοτυπική πλαστικότητα αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των διαφοροποιημένων ΛΜΚ και εκδηλώνεται ως αναστρέψιμη «τροποποίηση» και «ωρίμανση» των μυοκυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Halayko and Solway, 2001). Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες παρήγαγαν γνώση του ελέγχου της φαινοτυπικής έκφρασης και της ρύθμισής της από ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες, συνδέτες υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες (GPCRs) και πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Αναλόγως του ερεθίσματος, τα μυοκύτταρα «τροποποιούνται» σε ένα συνθετικό/πολλαπλασιαστικό φαινότυπο ή «ωριμάζουν» σε ένα λειτουργικά συστατικό φαινότυπο.

Σε πρωτογενείς καλλιέργειες, πρόσφατα απομονωμένα ΛΜΚ συστατικού φαινοτύπου υφίστανται «τροποποίηση» προς μία λειτουργική συνθετική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία άφθονων οργανιδίων πρωτεϊνικής και λιπιδικής σύνθεσης, όπως και πολυάριθμων μιτοχονδρίων. Στα κύτταρα αυτά παρατηρείται υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού, αλλά σχετικά μικρή ποσότητα πρωτεϊνών της συστατικής συσκευής όπως και μειωμένη απαντητικότητα σε αγωνιστές που επάγουν σύσπαση *in vitro* (Mitchell et al., 2000). Η ανάστροφη διεργασία, η μεταστροφή δηλαδή προς ένα πιο συστατικό φαινότυπο αναφέρεται ως «ωρίμανση». Η ωρίμανση αυτή συνοδεύεται από αξιοσημείωτη αύξηση των μυοϊνιδίων και άλλων πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη συστολή, ανάκτηση της απαντητικότητας σε φαρμακολογικούς αγωνιστές όμοιας της *in vivo*, και μείωση της ποσότητας των συνθετικών κυτταρικών οργανιδίων (Halayko et al., 1999; Mitchell et al., 2000). Ένα επιπρόσθετο χαρακτηριστικό των συστατικών μυοκυττάρων είναι η άφθονη παρουσία μικροκοιλάνσεων της πλασματικής μεμβράνης και των ειδικών για αυτές πρωτεϊνών καβεολίνη 1 και καβεολίνη 2, οι οποίες ευοδώνουν τη μεταγωγή σημάτων συστολής ρυθμίζοντας την ενδοκυττάρια κινητοποίηση Ca^{2+} (Gosens et al., 2007; Halayko et al., 2008). Μερικούς μοριακούς δείκτες του συστατικού φαινοτύπου αποτελούν οι ειδικές για τον λείο μυ α -ακτίνη (SM α -actin) και βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (SMMHC), η καλπονίνη, η h-καλδεσμόνη, η SM22, η δεσμίνη, η β -δυστρογλυκάνη και η ιντεγκρίνη $\alpha 7$ (Halayko et al., 1999; Halayko et al., 1996; Sharma et al., 2008; Tran et al., 2007). Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών απαιτεί το συντονισμένο έλεγχο της μεταγραφής και της μετάφρασης των αντίστοιχων γονιδίων (Halayko and Solway, 2001; Halayko et al., 2006). Οι ενδοκυττάρια σηματοδοτικές αλληλουχίες των Rho/Rho κινασών και της κινάσης

της 3 φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών αυτών (Camoretti-Mercado et al., 2000; Halayko et al., 2004; Liu et al., 2003).

Σε καλλιέργεια, αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β1 (TGF-β1) και η ινσουλίνη, και πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, όπως οι λαμινίνες, επάγουν την έκφραση συσταλτού φαινοτύπου των ΛΜΚ. Αντίθετα, μιτογόνα, όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) ή ο ορός εμβρύου και εξωκυττάρια ουσίες όπως η φμπρονεκτίνη πριμοδοτούν τη συνθετική/πολλαπλασιαστική λειτουργία των ΛΜΚ (Dekkers et al., 2007; Schaafsma et al., 2007; Tran et al., 2006). Η ενδογενής έκφραση της πρωτεΐνης λαμινίνης-2 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της «ωρίμανσης». Η έκφραση συγκεκριμένων υπομονάδων της πρωτεΐνης αυτής αυξάνει αποκλειστικά σε ΛΜΚ που σε καλλιέργεια και σε συνθήκες στέρησης εμβρυϊκού ορού ανακτούν το συσταλτό φαινότυπο (Tran et al., 2006). Αξιοσημείωτο είναι ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες, μόνο ένα μέρος των ΛΜΚ επανακτά ένα λειτουργικά συσταλτό φαινότυπο. Η προέλευση των ΛΜΚ των αεραγωγών από αποκλίνοντα μεσεγχυματικά κύτταρα αποτελεί πιθανή εξήγηση της εγγενούς αυτής ετερογένειας (Halayko et al., 1999). Αξιοσημείωτο επίσης, είναι το γεγονός ότι η «ωρίμανση» σε ένα συσταλτό φαινότυπο βαίνει παράλληλα με τη διεργασία της κυτταρικής υπερτροφίας. Η αύξηση του μεγέθους των κυττάρων σηματοδοτείται από τη συσσώρευση πρωτεϊνών του συσταλτού φαινοτύπου – μυοϊνιδίων του κυτταροσκελετού, α-ακτίνης, SMMHC-, όπως και την αυξημένη απάντηση στην ακετυλοχολίνη (Goldsmith et al., 2006). Επιπλέον, η υπερτροφία των ΛΜΚ, όπως και η «ωρίμανση», ρυθμίζονται από ενεργοποίηση κυτταρικού μονοπατιού της PI3K (Halayko et al., 2004; Zhou et al., 2005).

Η αύξηση της μάζας των ΛΜΚ αποτελεί θεμελιώδες γνώρισμα της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών. Για το λόγο αυτό, η κατανόηση του μηχανισμού και της ρύθμισης της «ωρίμανσης» των ΛΜΚ συνεισφέρει στην ίδια την κατανόηση της παθογένεσης των αποφρακτικών νόσων των αεραγωγών (εικ. 2).



Εικόνα 2. Αναστρέψιμη φαινοτυπική πλαστικότητα ΛΜΚ αεραγωγών. Η τροποποίηση των μυοκυττάρων σε μια «συνθετική-πολλαπλασιαστική» κατάσταση παρατηρείται σε πρωτογενείς καλλιέργειες με έκθεση σε μιτογόνους παράγοντες αλλά και σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας όπως η φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο 1. Η «ωρίμανση» σε μια «συσταλή» κατάσταση συμβαίνει σε καλλιέργειες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας και ως απάντηση στην απομάκρυνση μιτογόνων, στην έκθεση σε ινσουλίνη, και την προσκόλληση σε πλούσια σε λαμινίνη θεμέλια ουσία. «Συσταλά» μυοκύτταρα κυριαρχούν σε ενήλικες ιστούς και παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού ωρίμανση, αναλόγως της έκφρασης μοριακών δεικτών. Παρουσιάζονται λειτουργικά, δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των δύο ακραίων φαινοτύπων. (Προσαρμοσμένη από "Cells contributing to the pathogenesis of allergic diseases in the respiratory tract", σελ. 164, σε "Inflammation and Allergy Drug Design", 2011, Wiley-Blackwell).

1.2.1.2. Λειτουργική Ετερογένεια

Αν και υπάρχουν μοριακοί δείκτες όπως και δείκτες «λεπτής» δομής - παρατηρούμενοι στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο - των μυοκυττάρων συσταλτού φαινοτύπου, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν ευρεία ετερογένεια όσον αφορά στην «ευαισθησία» και την απαντητικότητά τους σε παράγοντες συστολής και χάλασης. Ετερογένεια σε λειτουργικές απαντήσεις σε πολλαπλασιαστικούς και προ-συνθετικούς μεσολαβητές παρατηρείται και στα μυοκύτταρα που εκφράζουν έναν πιο «ανώριμο» φαινότυπο (Burgess et al., 2004; Johnson et al., 2001). Φαίνεται ότι υπάρχουν μηχανισμοί που διέπουν τον λεπτό συντονισμό της κυτταρικής λειτουργίας μεταξύ των δύο ακραίων, «συσταλτού» και «ανώριμου», φαινοτύπων. Επιπλέον, ΛΜΚ συσταλτού φαινοτύπου διατηρούν μια μεταβαλλόμενη ικανότητα σύνθεσης και έκφρασης κυτοκινών, χημειοκινών και πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (Redhu et al., 2009; Tran et al., 2007; Tran et al., 2006). Ο αυστηρός προσδιορισμός των

μυοκυττάρων ως συσταλών ή συνθετικών/πολλαπλασιαστικών δεν είναι ο καταλληλότερος. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για δύο υποθετικά ακραίους φαινοτύπους που διατηρούν λειτουργική ποικιλοτροπία στις απαντήσεις τους (εικ. 3).

1.2.1.2.1. Μηχανική πλαστικότητα

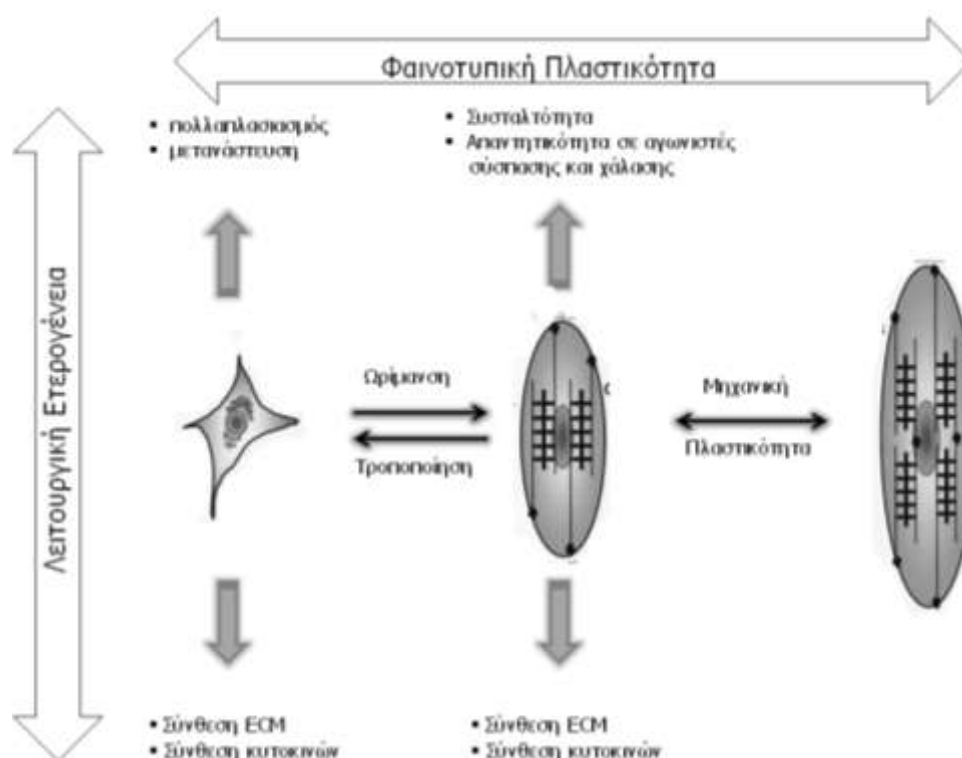
Ένα στοιχείο της λειτουργικής ετερογένειας των ΛΜΚ είναι η μηχανική πλαστικότητα. Τα ΛΜΚ μπορούν και προσαρμόζουν το συστατικό τους απάντηση στις αλλαγές, παροδικές ή χρόνιες, του μήκους τους και του μηχανικού φορτίου που υφίστανται. Η λεία μυϊκή ίνα έχει δηλαδή την ξεχωριστή ιδιότητα να προσαρμόζεται στις γεωμετρικές αλλαγές, που συμβαίνουν είτε λόγω της ίδιας της συστολής είτε λόγω αυξομειώσεων των πνευμονικών όγκων, χωρίς να υπολείπεται σε ικανότητα παραγωγής ενεργούς δύναμης. Υποκείμενοι μηχανισμοί της μηχανικής πλαστικότητας είναι η δυναμική αναδιαμόρφωση του δικτύου της ακτομυοσίνης (Seow, 2005) και των εστιακών προσκολλήσεων με τη θεμέλια ουσία (Hirota et al., 2009). Η μηχανική πλαστικότητα των λείων μυϊκών ινών συμβάλλει στην ΒΥΑ αφού η προσαρμογή του κυτταροσκελετού και της συσταλτής συσκευής σε μηχανικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος διατηρεί την παραγωγή βέλτιστης δύναμης, αυξάνει όμως την ταχύτητα βράχυνσης της μυϊκής ίνας (Halayko and Amrani, 2003). Η ικανότητα και η ταχύτητα βράχυνσης της λείας μυϊκής ίνας, όχι η παραγωγή βέλτιστης δύναμης, εξαρτώνται από το μήκος αυτής (Bai et al., 2004). Η απώλεια του βρογχοπροστατευτικού αντανακλαστικού της βαθιάς εισπνοής που παρατηρείται στο άσθμα έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με τη μηχανική πλαστικότητα των λείων μυϊκών ινών (Halayko and Amrani, 2003).

Συνολικά, η μηχανική πλαστικότητα των ΛΜΚ παρέχει τη δυνατότητα διαφορικής ρύθμισης της διαμέτρου του αυλού των βρόγχων τόσο προσωρινά, μέσω της αναστρέψιμης απόφραξης, όσο και μόνιμα, μέσω της ίνωσης και υπερτροφίας των ΛΜΚ.

1.2.1.2.2. Ποικιλότητα πρωτεϊνικής έκφρασης

Ένα επιπρόσθετο στοιχείο της λειτουργικής ετερογένειας των «ώριμων» ΛΜΚ είναι η ποικιλότητα έκφρασης πρωτεϊνών που μεσολαβούν απαντήσεων σε διάφορα εξωκυττάρια ερεθίσματα. Το ευρύ φάσμα έκφρασης υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, ρυθμιστικών υπομονάδων υποδοχέων, ενδοκυττάρων

σηματοδοτικών μορίων και πρωτεϊνών διαύλων ιόντων, συμβάλλει καθοριστικά στην τελική λειτουργική ρύθμιση των ΛΜΚ μεταξύ των δύο υποθετικά ακραίων, συσταλτού και συνθετικού/πολλαπλασιαστικού, φαινοτύπων (Borchers et al., 2003; Janssen, 2002; Walker et al., 2004).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση φαινοτυπικής πλαστικότητας και λειτουργικής ετερογένειας λείου μυϊκού κυττάρου. Η φαινοτυπική πλαστικότητα είναι αποτέλεσμα της αναστρέψιμης τροποποίησης και ωρίμανσης των μυοκυττάρων. Η μηχανική πλαστικότητα, μέρος της λειτουργικής ετερογένειας, αφορά στην αναδιοργάνωση του συσταλτής συσκευής-κυτταροσκελετού ως απάντηση σε αλλαγές μήκους κατά τη διάρκεια της μηχανικής έκτασης ή συστολής/χάλασης των μυοκυττάρων συσταλτού φαινοτύπου. Η λειτουργική ετερογένεια απαντάται σε μυοκύτταρα οποιουδήποτε φαινοτύπου και αφορά κυρίως σε διαφορές στην έκφραση i) υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, ορμονών, νευροδιαβιβαστών, πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, ii) σηματοδοτικών πρωτεϊνών που επάγονται από την ενεργοποίηση υποδοχέων (π.χ. καβεολινών GRKs) iii) διαύλων ιόντων. (Προσαρμοσμένη από “Cells contributing to the pathogenesis of allergic diseases in the respiratory tract”, σελ 166, σε “Inflammation and Allergy Drug Design”, 2011, Wiley-Blackwell).

1.2.1.3. Φαινοτυπική πλαστικότητα και λειτουργική ετερογένεια: σημασία και σχέση με την παθογένεια του άσθματος

Τα ΛΜΚ συμβάλλουν τόσο στο βρογχόσπασμο όσο και σε μόνιμες δομικές αλλαγές κατά την απόφραξη των αεραγωγών στο άσθμα. Οι λειτουργίες των ΛΜΚ είναι η συστολή, ο πολλαπλασιασμός, η υπερτροφία, η μετανάστευση και η σύνθεση ενεργών βιομορίων. Ο βαθμός έκφρασης των λειτουργιών αυτών, εκτός των

περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, εξαρτάται από τη φαινοτυπική πλαστικότητα (Halayko et al., 2006).

Διαφοροποιημένα ΛΜΚ αεραγωγών υπό την επίδραση φλεγμονωδών μεσολαβητών συνθέτουν και εκκρίνουν κυτοκίνες, χημεικίνες, μόρια προσκόλλησης και αυξητικούς παράγοντες. Μερικά από τα φλεγμονώδη βιομόρια που συνθέτουν σε καλλιέργεια είναι κυτοκίνες [Th1 τύπου: ιντερλευκίνη 2 (IL-2), ιντερφερόνη γ (INF- γ), IL-12, Th2 τύπου: IL-5, IL-6], διεγερτικό παράγοντα αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF) και υψηλά επίπεδα διεγερτικό παράγοντα αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF)), εοταξίνης, IL-8, και IL-11 (Hirota et al., 2009). Επιπλέον, συνθέτουν και εκκρίνουν μόρια προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1, CD44 ιντεγκρίνες) (Lazaar and Panettieri, 2001) όπως και αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), έναν παράγοντα σημαντικό στην αγγειογένεση (Knox et al., 2001). Επίσης, είναι γνωστό ότι μεσολαβητές εκκρινόμενοι από τα ΛΜΚ μπορούν με αυτοκρινή τρόπο να ρυθμίζουν τη λειτουργία αυτών, όπως και τη διήθηση των αεραγωγών από φλεγμονώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, η σύνθεση και έκκριση από τα ΛΜΚ βιολογικά ενεργού TGF- β επάγει αυτοκρινή σύνθεση κολλαγόνου. Έτσι, τα ΛΜΚ καθορίζουν την τοπική φλεγμονή και εγκαθιστούν ένα μηχανισμό «αυτορρύθμισης» της φαινοτυπικής πλαστικότητας που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση και τα συμπτώματα του άσθματος.

Λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών σε καλλιέργεια τροποποιούν τη σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας. Η εξωκυττάρια ουσία επιδρά σε μεγάλο εύρος των λειτουργιών τους. Για παράδειγμα, η φιμπρονεκτίνη ή το κολλαγόνο τύπου I προάγουν τον συνθετικό/πολλαπλασιαστικό φαινότυπο, ενώ εξωκυττάρια ουσία πλούσια σε λαμινίνη είναι απαραίτητη για την «ωρίμανση» σε ένα συστατικό φαινότυπο. Η λαμινίνη-2 και ο εκλεκτικός της υποδοχέας, $\alpha 7\beta 1$ ιντεγκρίνη, απαιτούνται για την «ωρίμανση» και την υπερτροφία των μυοκυττάρων. Επιπλέον, η λαμινίνη-2 είναι αυξημένη στους «ασθματικούς» αεραγωγούς (Tran et al., 2006).

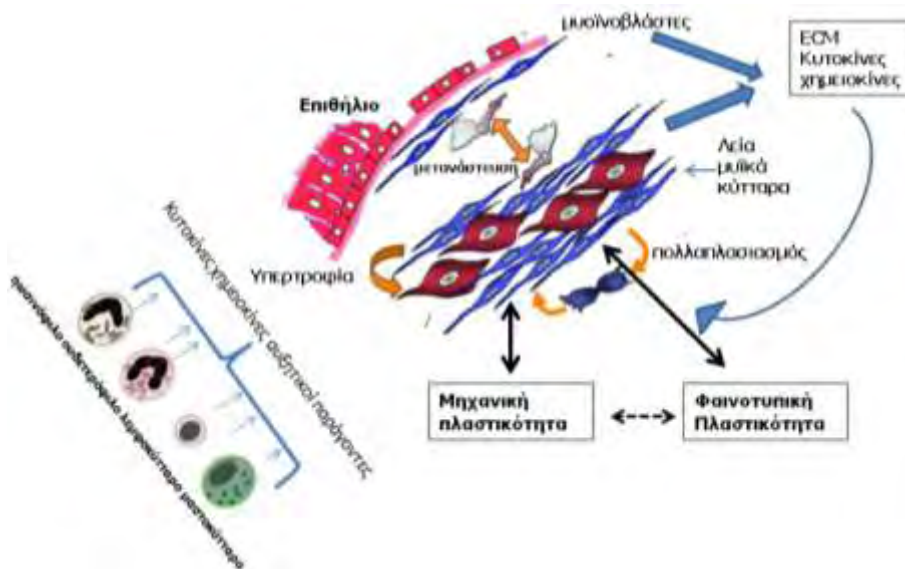
Η αυξημένη μάζα των λείων μυϊκών ινών στους αεραγωγούς είναι αποτέλεσμα κυτταρικής υπερπλασίας και υπερτροφίας. Λείες μυϊκές ίνες από ενδοβρογχικές βιοψίες ασθματικών ασθενών σε καλλιέργεια πολλαπλασιάζονται με γρηγορότερο ρυθμό σε σχέση με των υγιών. Η διαφορά αυτή φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένη με αλλαγές στο προφίλ των συντιθέμενων πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας από τα «ασθματικά» μυοκύτταρα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη εγγενούς σταθερής «ανωμαλίας» στο φαινότυπο των ΛΜΚ που σχετίζεται με αλλαγές

στις λειτουργικές απαντήσεις σε μιτογόνα. Παράγοντες που επάγουν υπερτροφία των ΛΜΚ σε καλλιέργεια και είναι αυξημένοι στους αεραγωγούς ασθενών με άσθμα περιλαμβάνουν τον TGF-β1 και την ενδοθηλίνη 1 (Bentley and Hershenson, 2008) . Η αυξημένη μυϊκή μάζα, ακόμη και στο ήπιο προς μέτριο άσθμα, συνοδεύεται από αύξηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη συστολή, όπως της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), θεμελιώνοντας τη συσχέτισή της με την αυξημένη συσταλτικότητα στο άσθμα και τα μοντέλα άσθματος (Ammit et al., 2000).

Η πολυλειτουργικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών αποκαλύπτει επιπρόσθετους μηχανισμούς αύξησης της μάζας των κυττάρων αυτών. Η μετανάστευση ινοβλαστών από τον υποβλεννογόνο χιτώνα στο στρώμα των λείων μυϊκών ινών και η επακόλουθη ωρίμανση σε ένα συσταλτό φαινότυπο έχει ως αποτέλεσμα την πάχυνση του λείου μυϊκού ιστού. Αντιστρόφως, φαινοτυπικά τροποποιημένα ΛΜΚ μεταναστεύουν στον υποβλεννογόνο χιτώνα αυξάνοντας τον αριθμό των μυοϊνοβλαστών. Επιπλέον, κυκλοφορούντα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μεταναστεύουν στους αεραγωγούς, που έχουν υποστεί βλάβη, όπου υφίστανται διαφοροποίηση σε λεία μυϊκά (Halayko and Amrani, 2003).

Τόσο οι οξείες όσο και οι χρόνιες φλεγμονώδεις απαντήσεις οργανώνονται από κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού (T λεμφοκύτταρα, ηωσινοφιλα, ουδετερόφιλα), μαστοκύτταρα, μυοϊνοβλάστες, επιθηλιακά και ΛΜΚ. Η φλεγμονή ρυθμίζει τη φαινοτυπική πλαστικότητα άμεσα, επάγοντας ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που μεταποιούν τις απαντήσεις συστολής/χάλασης σε GPCRs, και χρονικά, μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική υπερπλασία/υπερτροφία, τη μετανάστευση, την έκκριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών και πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας.

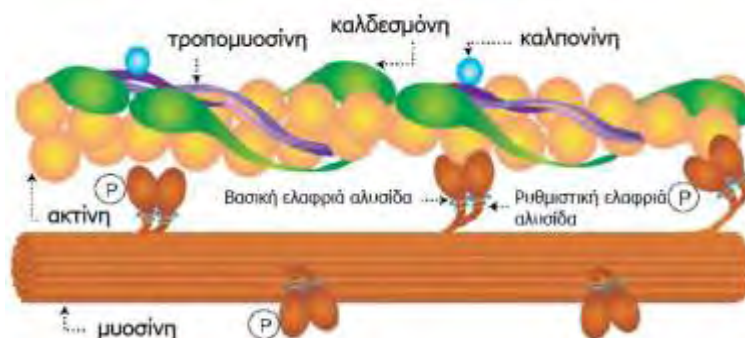
Η φαινοτυπική και μηχανική πλαστικότητα είναι δύο διεργασίες που δεν εξελίσσονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη, ούτε αλληλοαναιρούνται. Η έκφραση πρωτεϊνών της συσταλτικής συσκευής τροποποιεί την προσαρμοστικότητα στο μηχανικό περιβάλλον και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού φαίνεται να τροποποιεί τη γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών συστολής και την κυτταρική απαντητικότητα σε GPCRs (Halayko and Amrani, 2003) (εικ. 4).



Εικόνα 4. Φαινοτυπική πλαστικότητα και λειτουργική ετερογένεια στον «ασθματικό» αεραγωγό. Οι δομικές αλλαγές συμπεριλαμβάνουν την απογύμνωση του επιθηλίου, την πάχυνση της βασικής μεμβράνης, την υποεπιθηλιακή ίνωση, τη συγκέντρωση μυοινοβλαστών, την υπερτροφία/υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων και τη διήθηση ενεργοποιημένων κυττάρων ανοσίας. Λειτουργικά ετερογενείς υποπληθυσμοί μυοκυττάρων με ικανότητα φαινοτυπικής πλαστικότητας απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα. Η φλεγμονή επιδρά στη φαινοτυπική πλαστικότητα άμεσα, μέσω αλλαγών στην κυτταρική σηματοδότηση συστολής/χάλασης, και χρονικά μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που ελέγχει την υπερπλασία/υπερτροφία, τη μετανάστευση και έκκριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών και πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας. Η μηχανική πλαστικότητα είναι αποτέλεσμα της αναδιοργάνωσης της συσταλτικής συσκευής ως απάντηση στο μηχανικό φορτίο και στις γεωμετρικές αλλαγές κατά τη συστολή/χάλαση. Η φαινοτυπική και μηχανική πλαστικότητα δεν αλληλοαναιρούνται, ούτε εξελίσσονται ανεξάρτητα. Η έκφραση πρωτεϊνών της συσταλτής συσκευής επηρεάζει τη μηχανική προσαρμοστικότητα και συστατικά του αναδιοργανωμένου κυτταροσκελετού τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών της συσταλτικής συσκευής, όπως και την απαντητικότητα των GPCRs. Τροποποιημένη από (Gerthoffer et al., 2011).

1.2.2. Συσταλτική συσκευή

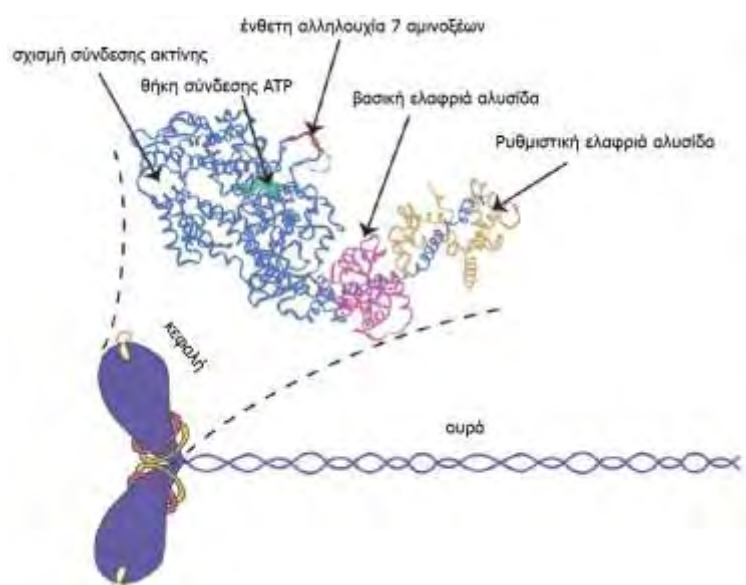
Η συσταλτική συσκευή του λείου μυϊκού κυττάρου αποτελείται από παχιά και λεπτά νημάτια. Τα παχιά νημάτια αποτελούνται από μόρια μυοσίνης, ενώ τα λεπτά νημάτια περιλαμβάνουν α- και γ-ακτίνη, τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες τροπομυοσίνη, καλδεσμόνη και καλπονίνη, όπως και την πρωτεΐνη SM22 (εικ. 5).



Εικόνα 5. Συσταλτική συσκευή λείου μυϊκού κυττάρου [τροποποιημένη από (Léguillette and Lauzon, 2008)].

1.2.2.1. Πρωτεΐνες παχιών νηματίων

Η κίνηση δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη μοριακή μηχανή της μυοσίνης που μπορεί και μετατρέπει τη χημική ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP σε μηχανικό έργο. Η μυοσίνη είναι μία εξαμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από 2 βαριές αλυσίδες (SMMHC, ~ 200 KD), η κάθε μία από τις οποίες συνδέεται μη ομοιοπολικά με ένα ζεύγος ελαφρών αλυσίδων, μία βασική (LC₁₇, 17 KD) και μια ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα (MLC2 ή LC20, 20 KD). Η κεφαλή, ή N-τελικό άκρο της μυοσίνης, περιέχει τα πεδία σύνδεσης ακτίνης και ATP. Η ουρά, ή C-τελικό άκρο, εμπλέκεται στη σύνδεση των βαριών αλυσίδων και το σχηματισμό των παχιών νηματίων (Léguillette and Lauzon, 2008) (εικ. 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση δομής των βαριών και ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης του λείου μυϊκού κυττάρου [τροποποιημένη από (Léguillette and Lauzon, 2008)].

1.2.2.1.1. Βαριές αλυσίδες μυοσίνης

Υπάρχουν 4 γνωστές ισομορφές της SMMHC στον άνθρωπο. Όλες σχηματίζονται από εναλλακτικό μάτισμα ενός μόνο γονιδίου (χρωμόσωμα 16p13.13-13.12) που έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της αμινοξικής αλληλουχίας είτε στο N τελικό άκρο είτε στο C τελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Οι SM-1 (204 KD) και SM-2 (200 KD) ισομορφές της SMMHC φέρουν 2 διακριτές αλληλουχίες, 43 και 9 αμινοξέων αντίστοιχα, στο C-τελικό άκρο τους. Η ακριβής βιολογική σημασία των ισομορφών αυτών παραμένει ασαφής. Πάντως, δεν παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ βρεφικής και ενήλικης ζωής, τόσο στους βρόγχους όσο και στην τραχεία. Επιπλέον, η έκφραση τους θεωρείται ότι δεν μεταβάλλεται στο άσθμα. Αν και τα κύτταρα περιέχουν κυρίως ομοδιμερή,

ετεροδιμερή SM-1 και SM-2 μπορούν να σχηματιστούν *in vitro* (Léguillette and Lauzon, 2008).

Η παρουσία ή απουσία αλληλουχίας 7 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της SMMHC έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των SM-B και SM-A ισομορφών αντίστοιχα. Η έκφραση των SM-B και SM-A είναι ιστοειδική. Οι ταχέως συσπώμενοι φασικοί λείοι μύες εκφράζουν περισσότερο την SM-B ενώ οι βραδέως συσπώμενοι τονικοί λείοι μύες εκφράζουν περισσότερο την SM-A ισομορφή. Επιπλέον, η ένθεση των 7 αμινοξέων στο N τελικό άκρο επιφέρει δραστικές αλλαγές στις μηχανικές ιδιότητες του μορίου της μυοσίνης. Συγκεκριμένα, η SM-B παρουσιάζει διπλάσια δραστηριότητα ATPάσης όπως και διπλάσια μέγιστη ταχύτητα βράχυνσης (v_{max}) σε σχέση με την SM-A ισομορφή (Léguillette and Lauzon, 2008).

1.2.2.1.2. Ελαφριές αλυσίδες μυοσίνης

Η φωσφορυλίωση της MLC2 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μυοσίνης. Χωρίς τη φωσφορυλίωση της MLC2 δεν παράγεται κίνηση. Υπάρχουν δύο ισομορφές της MLC2 χωρίς, ωστόσο, γνωστές λειτουργικές διαφορές. Οποιοσδήποτε συνδυασμός των ισομορφών βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας είναι δυνατός. Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ισομορφές της SMMHC και όχι της MLC2 αποτελούν μείζονες καθοριστές της ταχύτητας βράχυνσης της μυϊκής ίνας (Léguillette and Lauzon, 2008).

1.2.2.2. Πρωτεΐνες λεπτών νηματίων

Τα ινίδια ακτίνης σχηματίζονται από διπλή έλικα πολυμερών σφαιρικής ακτίνης. Οι συσταλτές ισομορφές ακτίνης συμπεριλαμβάνουν την α - και γ -ακτίνη. Η περιεκτικότητα των λείων μυών σε ακτίνη ποικίλει κατά την ανάπτυξη αλλά αποκτά ιστοειδική κατανομή στην ενήλικη ζωή. Οι δύο αυτές ισομορφές έχουν παρόμοια δομή αφού διαφέρουν σε 4 μόνο κατάλοιπα αμινοξέων στο N-τελικό άκρο. Η διαφορά στη λειτουργικότητα της α - και γ -ακτίνης δεν είναι γνωστή στα ΛΜΚ των αεραγωγών. Αν και ο ρόλος τους δεν είναι μηχανικός, αφού η αντικατάσταση της ακτίνης λείου μυός με σκελετική ακτίνη δεν επηρεάζει την ταχύτητα συστολής, πιστεύεται ότι, μαζί με τις πρωτεΐνες που συνδέονται την ακτίνη, εμπλέκονται στη ρύθμιση της συστολής (Léguillette and Lauzon, 2008).

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται στην ακτίνη ρυθμίζουν τις ενζυμικές και μηχανικές ιδιότητες του συστήματος των εγκάρσιων γεφυρών. Η τροπομυοσίνη και η καλδεσμόνη σχηματίζουν συνεχή νημάτια που περιβάλουν ελικοειδώς και αδιάλειπτα τη διπλή έλικα της ακτίνης. Λόγω της δομής τους, η τροπομυοσίνη και η καλδεσμόνη ρυθμίζουν τη λειτουργία αρκετών μορίων μυοσίνης ταυτόχρονα ευοδώνοντας τη συνεργική τους δράση. Η τροπομυοσίνη όταν συνδέεται στην ακτίνη αυξάνει τη v_{max} , ενώ η καλδεσμόνη μειώνει τόσο τη v_{max} όσο και τη δραστηριότητα ATPάσης της μυοσίνης. Η ανασταλτική αυτή δράση αναστρέφεται από τη σύνδεση του συμπλόκου Ca^{++} -καλμοδουλίνης στην καλδεσμόνη όπως και από τη φωσφορυλίωση της καλδεσμόνης. Όμοια με την καλδεσμόνη, η καλπονίνη αναστέλλει τη δραστηριότητα ATPάσης της μυοσίνης και η δράση της ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης (Morgan and Gangopadhyay, 2001).

Η SM22 είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 22 KD που συνδέεται με την ακτίνη και είναι πανταχού παρούσα στο λείο μυϊκό ιστό. Είναι άφθονη στα ΛΜΚ συσταλτού φαινοτύπου αλλά γρήγορα εξαφανίζεται με τη μεταστροφή στο συνθετικό φαινότυπο. Σταθεροποιεί τα νημάτια ακτίνης *in vitro* αλλά η ακριβής λειτουργία της παραμένει εν πολλοίς άγνωστη. Δεδομένου ότι σχετίζεται με την ακτίνη και η έκφρασή της αποτελεί έναν από τους πιο πρώιμους δείκτες διαφοροποίησης των ΛΜΚ, έχει υποτεθεί ότι ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη συσταλτική λειτουργία των κυττάρων αυτών. Μελέτες σε αγγειακά ΛΜΚ υποδεικνύουν συσχέτιση της SM22 με την επαγωγή συστολής ανεξάρτητης από το Ca^{++} (Morgan and Gangopadhyay, 2001). Επιπλέον, έχει υποτεθεί εμπλοκή της SM22 στο σχηματισμό ποδοσωματίων και τη μετανάστευση των μυοκυττάρων κατά την εμβρυϊκή ζωή, όπως και στην ιστική αναδιαμόρφωση αφού δρα κατασταλτικά στην έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης (MMP)-9 (Assinder et al., 2009).

1.2.3. Φυσιολογία της συστολής

1.2.3.1. Συστολή εξαρτώμενη από το Ca^{2+}

Η συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων επάγεται αρχικά από την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου Ca^{2+} . Το Ca^{2+} συνδέεται στην καλμοδουλίνη (CAM) και το σύμπλοκο Ca^{2+} -CAM συνδέεται και ενεργοποιεί την MLCK η οποία φωσφορυλιώνει την MLC2. Η φωσφορυλίωση της MLC2 αλλάζει τη διαμόρφωση της κεφαλής της μυοσίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητάς της ως

ΑΤΡάσης. Η μυϊκή συστολή δεν μπορεί να αρχίσει έως ότου η MLCK αυξήσει τη δραστηριότητα της μυοσίνης ως ΑΤΡάσης. Η μυοσίνη αλληλεπιδρά με την ακτίνη και το σύμπλοκο ακτίνη-μυοσίνη δρα ως μοριακή μηχανή (Sanderson et al., 2008).

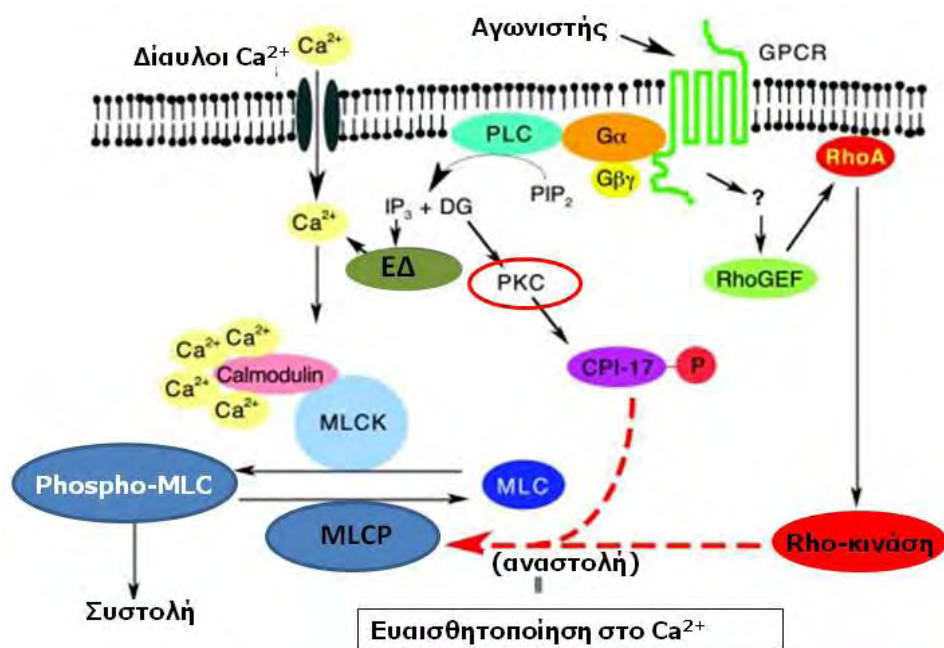
Για τη χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου, πρέπει η μυοσίνη να αποφωσφορυλιωθεί. Η αποφωσφορυλιωμένη μυοσίνη αδυνατεί να συνδέσει ακτίνη. Η αποφωσφορυλίωση αυτή μεσολαβείται από το ένζυμο φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCP), η οποία στο λείο μυϊκό κύτταρο είναι συνεχώς ενεργή τόσο κατά τη συστολή όσο και κατά την ηρεμία. Όταν το κυτοσολικό Ca^{2+} αυξάνεται, ο ρυθμός φωσφορυλίωσης της μυοσίνης από την ενεργοποιημένη MLCK υπερβαίνει το ρυθμό αποφωσφορυλίωσης από την MLCP και η ποσότητα φωσφορυλιωμένης μυοσίνης (Phospho-MLC2) στο κύτταρο αυξάνεται παράγοντας υψηλή τάση. Όταν η συγκέντρωση κυτοσολικού Ca^{2+} μειώνεται, ο ρυθμός αποφωσφορυλίωσης υπερβαίνει το ρυθμό φωσφορυλίωσης και η ποσότητα Phospho-MLC2 μειώνεται, προκαλώντας χάλαση (Sanderson et al., 2008).

Ο μηχανισμός που μόλις περιγράφηκε ενεργοποιεί τα παχιά νημάτια μυοσίνης στο λείο μυϊκό κύτταρο. Άλλοι μηχανισμοί δρουν στα λεπτά νημάτια ακτίνης του λείου μυός για να απομακρύνουν την αναστολή των αλληλεπιδράσεων ακτίνης-μυοσίνης. Δύο πρωτεΐνες, η καλδεσμόνη και η καλπονίνη, αναστέλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης-μυοσίνης. Αμφότερες είναι δεσμευτικές πρωτεΐνες του συμπλόκου Ca^{2+} -CAM. Αμφότερες δεσμεύονται στην ακτίνη και την τροπομυοσίνη. Η καλπονίνη, που βρίσκεται σε μια σταθερή στοιχειομετρία με τη τροπομυοσίνη και την ακτίνη, αναστέλλει τη δραστηριότητα ΑΤΡάσης της μυοσίνης. Όπως προαναφέραμε, η αύξηση της ενδοκυττάριας [Ca^{2+}] ενεργοποιεί το σύμπλοκο Ca^{2+} -CAM. Εκτός από την ενεργοποίηση της MLCK, το σύμπλοκο αυτό έχει δύο επιδράσεις στην καλπονίνη. Πρώτον, το Ca^{2+} -CAM δεσμεύεται στην καλπονίνη. Δεύτερον, το Ca^{2+} -CAM ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από το Ca^{2+} CAM πρωτεϊνική κίνηση που φωσφορυλιώνει την καλπονίνη. Και οι δύο επιδράσεις μειώνουν την αναστολή που ασκείται από την καλπονίνη επί της δραστηριότητας της μυοσίνης ως ΑΤΡάσης. Η καλδεσμόνη, όπως η καλπονίνη, αναστέλλει επίσης τονικά τη δραστηριότητα της μυοσίνης ως ΑΤΡάσης (Morgan and Gangopadhyay, 2001).

1.2.3.2. Συστολή ανεξάρτητη από το Ca^{2+}

Εκτός της ενεργοποίησης της MLCK, η απενεργοποίηση της MLCP συντελεί στη συστολή του λείου μυός. Ο μηχανισμός αυτός, που αναφέρεται ως

«ευαισθητοποίηση στο Ca^{2+} », κινητοποιείται μέσω ενεργοποίησης της Rho-κινάσης (RhoK). Όταν η MLCP είναι απενεργοποιημένη η phospho-MLC δεν μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί με αποτέλεσμα την ευόδωση της συστολής. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αναστολέα CPI-17 από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) έχει επίσης αναφερθεί στην αναστολή της MLCP και προαγωγή της «ευαισθητοποίησης στο Ca^{2+} » στα ΛΜΚ (Sanderson et al., 2008) (εικ. 7).



Εικόνα 7. Ρύθμιση της συστολής του λείου μύος από την MLCK και την MLCP. ΕΔ : ενδοπλασματικό δίκτυο. Τροποποιημένη από (Chiba and Misawa, 2004).

1.3. Η απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων στον παράγοντα φλεγμονής TNF-α

1.3.1. Παραγωγή και βιολογική σημασία του TNF-α

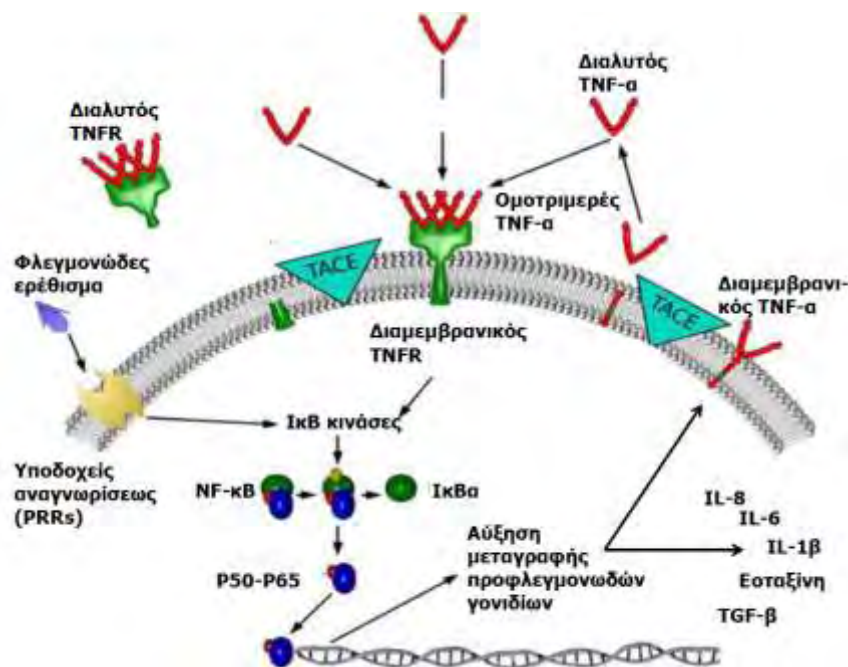
Ο TNF-α είναι μια κυτοκίνη με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των απαντήσεων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας. Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα, μονοκύτταρα και $CD4^+$ λεμφοκύτταρα. Εκτός της ρύθμισης φλεγμονωδών και ανοσολογικών απαντήσεων, ο TNF-α ασκεί σημαντική βιολογική δράση στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων (Aggarwal, 2003).

Στον άνθρωπο, ο TNF-α παράγεται αρχικά ως μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 26 KDa. Ο διαμεμβρανικός TNF-α (mTNF-α) αποτελεί ενεργό πρόδρομο μόριο. Το πρωτεολυτικό κόψιμο του εξωκυττάρου τμήματός του παράγει τη 17KDa διαλυτή

μορφή του TNF- α , μια μη γλυκοσιωμένη πρωτεΐνη αποτελούμενη από 157 αμινοξέα. Ο διαλυτός TNF- α είναι ένα ομοτριμερές μόριο (Jones et al., 1989). Το πρωτεολυτικό κόψιμο του mTNF- α γίνεται από μια ειδική μεταλλοπρωτεΐνάση που ονομάζεται TACE (TNF- α Converting Enzyme) (Black et al., 1997).

1.3.2. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταρική σηματοδότηση του TNF- α

Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς του TNF- α είναι ο TNFR-1 (p55 ή CD120a) και ο TNFR2 (p75 ή CD120b). Ο TNFR2 ενεργοποιείται κυρίως από τον mTNF- α , ενώ ο TNFR1 ενεργοποιείται από τον διαλυτό TNF- α . Αμφότεροι οι υποδοχείς εκφράζονται στα ΛΜΚ των αεραγωγών όπως και σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους (Amrani et al., 2000). Το σύμπλεγμα συνδέτη-υποδοχέα επάγει ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος μέσω της φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της ανασταλτικής υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, I κ B α (Brightling et al., 2008). Ο ενεργοποιημένος NF- κ B επιδρά στη δομή της χρωματίνης αυξάνοντας τη μεταγραφή κυτοκινών, χημειοκινών, και αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , εοταξίνης, TGF- β , αλλά και του ίδιου του TNF- α (Brightling et al., 2008) (εικ. 8).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της σειράς των γεγονότων που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση και τη λειτουργία των υποδοχέων του TNF- α [Τροποποιημένη από (Russo and Polosa, 2005)].

1.3.3. Σύνθεση και ρύθμιση έκφρασης του TNF-α στους αεραγωγούς

Στους αεραγωγούς μεγάλες ποσότητες TNF-α παράγονται ως απάντηση σε τοξίνες βακτηρίων και παρασίτων αλλά και σε δυνητικά επιβλαβείς παράγοντες, χημικούς, φυσικούς και ανοσολογικούς. Η κύρια πηγή παραγωγής του TNF-α είναι τα ενεργοποιημένα κυψελιδικά μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα. TNF-α παράγεται επίσης από διάφορα άλλα προφλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα αλλά και δομικά κύτταρα όπως οι ινοβλάστες, τα επιθηλιακά και τα ΛΜΚ. Η σύνθεση και παραγωγή του TNF-α ενεργοποιείται από μεγάλο εύρος κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου του ίδιου του TNF-α. Τα μαστοκύτταρα απαντούν στον TNF-α με θετική παλίνδρομη αυτοκρινή ρύθμιση. Η ρύθμιση της έκφρασης του TNF-α γίνεται σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, κυρίως κατόπιν ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-Kβ και AP-1 (Coward et al., 2002).

1.3.4. Η σημασία του TNF-α στην παθογένεια της Ενιαίας Νόσου των Αεραγωγών (άσθμα, ρινίτιδα)

Ο TNF-α και οι υποδοχείς του εμπλέκονται στην παθογένεια της αλλεργικής ρινίτιδας, του άσθματος, όπως και του επαγγελματικού άσθματος. Η επαγωγή φλεγμονής των αεραγωγών αλλά και ΒΥΑ από αντιγόνο, εξαρτώνται στενά από τον TNF-α. Τα μαστοκύτταρα, κύτταρα με κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του αλλεργικού άσθματος και που ο αριθμός τους στο στρώμα των λείων μυϊκών ινών έχει θετική συσχέτιση με το βαθμό της ΒΥΑ, αποτελούν σημαντική πηγή της κυτοκίνης αυτής (εικ. 9).

1.3.4.1. Τα επίπεδα του TNF-α στους αεραγωγούς είναι αυξημένα στο άσθμα

Αυξημένα επίπεδα TNF-α, λόγω αυξημένης παραγωγής από μαστοκύτταρα και μακροφάγα, ανευρίσκονται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα συμπτωματικών ασθματικών ασθενών και σε ευαισθητοποιημένα υποκείμενα που έχουν εκτεθεί σε αλλεργιογόνο ή ακόμη και λιποσακχαρίτη. Αξιοσημείωτο είναι ότι μαστοκύτταρα και κυψελιδικά μακροφάγα ευαισθητοποιημένων με αλλεργιογόνο ιστών παράγουν TNF-α με IgE-εξαρτώμενο μηχανισμό (Ohkawara et al., 1992). Επιπρόσθετα, ο παραγόμενος από τα μαστοκύτταρα TNF-α συμμετέχει στην επαγωγή IgE

εξαρτώμενης αλλεργικής φλεγμονής και βρογχικής υπεραπαντητικότητας μέσω της ενίσχυσης της χημειοταξίας T λεμφοκυττάρων και της παραγωγής Th2 κυτοκινών. Επίσης, λευκοκύτταρα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθματικών ασθενών εκκρίνουν αυξημένη ποσότητα TNF- α . Ακόμη, αυξημένα επίπεδα TNF- α ανευρίσκονται στους αεραγωγούς ασθματικών ασθενών ως απάντηση σε τοπική δοκιμασία πρόκλησης με αλλεργιογόνο (Cazzola and Polosa, 2006).

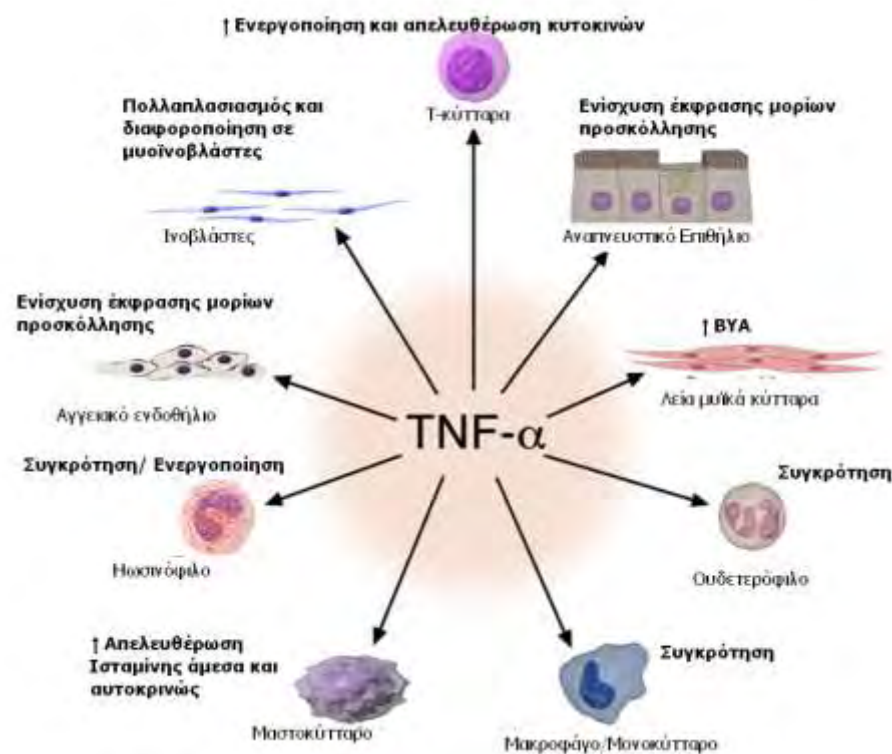
1.3.4.2. Ο TNF- α επάγει τη βρογχική υπεραπαντητικότητα, τη χημειοταξία φλεγμονωδών κυττάρων και την ενεργοποίηση κυττάρων ανοσίας στους αεραγωγούς

Ο TNFR1 είναι ο υπεύθυνος υποδοχέας επαγωγής BYA στη μεταχολίνη μετά από δοκιμασία βρογχικής πρόκλησης με αλλεργιογόνο σε πειραματικό μοντέλο άσθματος (ποντίκια ευαισθητοποιημένα και προκληθέντα με ωλευκωματίνη). Ο TNF- α αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων και ρύθμισης της χημειοταξίας ουδετεροφίλων και ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του TNFR1 εξαρτά σε μεγάλο βαθμό την περιβρογχική και περιαγγειακή διήθηση των αεραγωγών από ηωσινόφιλα μετά από δοκιμασία βρογχικής πρόκλησης με αλλεργιογόνο. Αντιθέτως, η ενεργοποίηση του TNFR2 ρυθμίζει αρνητικά την επαγόμενη από αλλεργιογόνο βρογχική υπεραπαντητικότητα μέσω ενεργοποίησης των $\gamma\delta$ T λεμφοκυττάρων (Kanehiro et al., 2002). Αμφότεροι οι υποδοχείς, TNFR1 και TNFR2, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή από το διΐσοκυανικό τολουένιο (επαγγελματικό αεροαλλεργιογόνο) ασθματικής αντίδρασης και συγκεκριμένα BYA, φλεγμονής των αεραγωγών και μετανάστευσης δενδριτικών κυττάρων (Matheson et al., 2002). Σε υγιείς εθελοντές η χορήγηση ανθρώπινου ανασυνδυασμένου TNF- α (recombinant human rhTNF- α) σε αερόλυμα, επάγει αύξηση της BYA όπως και συσσώρευση ουδετεροφίλων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (Thomas et al., 1995). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ήπιο άσθμα μετά από χορήγηση νεφελοποιημένου rhTNF- α .

Σε ποντίκια στα οποία με μεθόδους γενετικής μηχανικής είχε απαλειφθεί η έκφραση του TNF- α αναδεικνύεται ο ρόλος του TNF- α στην ανάπτυξη αλλεργικής ρινίτιδας μέσω ρύθμισης της παραγωγής ειδικών για το αλλεργιογόνο IgE

αντισωμάτων, οργάνωσης περιβάλλοντος κυτοκινών τύπου Th2 και συγκρότησης ηωσινοφίλων στον τόπο της αλλεργικής φλεγμονής (Iwasaki et al., 2003).

Ο TNF-α ευοδώνει τη μετανάστευση και συγκρότηση φλεγμονωδών κυττάρων στους αεραγωγούς μέσω της επαγωγής έκφρασης μορίων προσκόλλησης, ICAM1 και VCAM1, στα επιθηλιακά και ΛΜΚ (Thomas and Heywood, 2002).

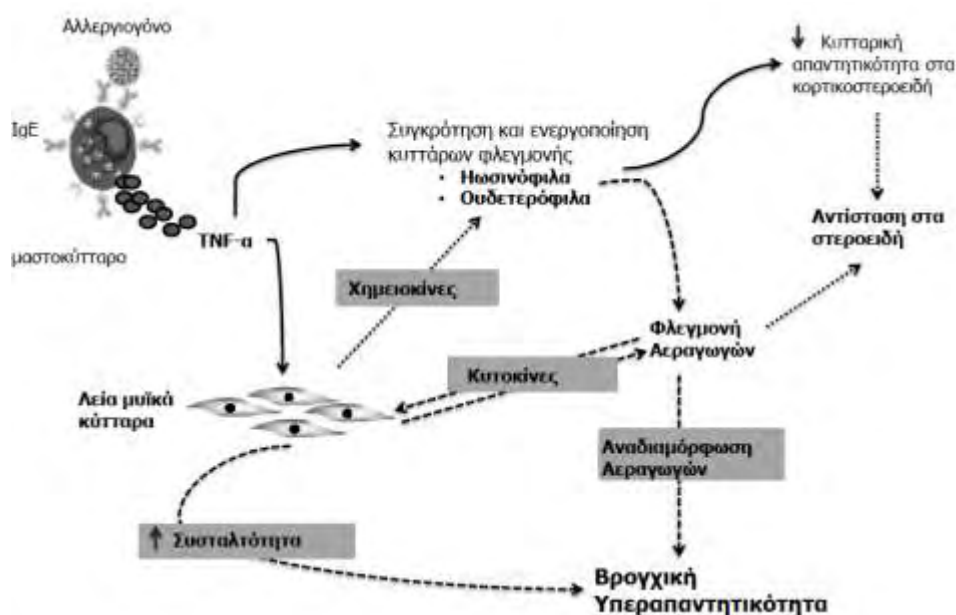


Εικόνα 9. Ρόλος του TNF-α στην παθογένεση του άσθματος. Ο TNF-α διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του άσθματος ασκώντας σημαντικές επιδράσεις σε κύτταρα φλεγμονής αλλά και δομικά κύτταρα του αναπνευστικού. BYA: βρογχική υπεραπαντητικότητα [Προσαρμοσμένη από (Brightling et al., 2008)].

1.3.4.3. Η αυξημένη συγκέντρωση του TNF-α στους αεραγωγούς είναι χαρακτηριστική του σοβαρού άσθματος

Ο TNF-α φαίνεται να έχει μεγαλύτερη συσχέτιση με το σοβαρό συγκριτικά με το ήπιο άσθμα. Πρωτεΐνη για τον TNF-α στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, όπως και πρωτεΐνη μαζί και mRNA για τον TNF-α σε βρογχικές βιοψίες παρατηρούνται σε αξιοσημείωτα μεγαλύτερα επίπεδα σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα σε σχέση με εκείνους με ήπιο άσθμα. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση mTNF-α και TNFR1 ανευρίσκεται αποκλειστικά στο περιφερικό αίμα ασθενών με σοβαρό, ανθεκτικό στη θεραπεία άσθμα (Berry et al., 2006). Φαίνεται ότι αυξημένη ρύθμιση του TNF-α παρατηρείται μόνο στο σοβαρό άσθμα και ίσως ο κλινικός αυτός φαινότυπος να είναι εκείνος που «απαντάει» καλύτερα στην αντι-TNF θεραπεία (Desai and Brightling,

2010). Αξιοσημείωτο είναι ότι ο TNF- α συμμετέχει στην επαγωγή ανθεκτικότητας στα κορτικοστεροειδή που παρατηρείται στο σοβαρό άσθμα (Morjaria et al., 2007). Επίσης, ενεργοποιεί την αύξηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες μέσω της έκφρασης του (TGF- β) προάγοντας την ίνωση των αεραγωγών που αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα του σοβαρού άσθματος (Brightling et al., 2008) (εικ. 10).



Εικόνα 10. Ο TNF- α στην παθογένεση του σοβαρού άσθματος : Επαγωγή του TNF- α από αλλεργιογόνο μέσω IgE εξαρτώμενης ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων. Άλλες πηγές παραγωγής TNF- α μπορεί να εμπλέκονται. Ο TNF- α ρυθμίζει τη φλεγμονή των αεραγωγών μέσω ενεργοποίησης και συγκρότησης ποικίλων φλεγμονωδών κυττάρων. Προϊόντα των κυττάρων αυτών επηρεάζουν το βαθμό βρογχικής υπεραπαντητικότητας ασκώντας, εν μέρει, δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η απευθείας δράση του TNF- α στα λεία μυϊκά κύτταρα συντηρεί τη φλεγμονή μέσω επαγωγής της έκκρισης χημειοκινών και κυτοκινών. Ο TNF- α έχει πιθανόν ρόλο στην επαγωγή βρογχικής υπεραπαντητικότητας από αλλεργιογόνο αυξάνοντας την «ευαισθησία» των λείων μυϊκών κυττάρων σε ποικιλία αγωνιστών σύσπασης. Η αντίσταση στα κορτικοστεροειδή, που συχνά απαντάται στο σοβαρό άσθμα, πιθανόν οφείλεται στην επαγωγή αλλαγών της απαντητικότητας των λείων μυϊκών κυττάρων στα κορτικοστεροειδή από τον TNF- α (Προσαρμοσμένη από “Cytokines contributing to the pathogenesis of allergic diseases in the respiratory tract”, σελ. 232, σε “Inflammation and Allergy Drug Design”, 2011, Wiley-Blackwell).

1.3.5. Η σημασία του TNF- α στη συμβολή των λείων μυϊκών κυττάρων στη φλεγμονή και την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών

Η επαγωγή αλλαγών στο φαινότυπο των ΛΜΚ από τον TNF- α διαδραματίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και τη ΒΥΑ που παρατηρούνται στο άσθμα.

1.3.5.1. Ο TNF-α αυξάνει την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών αεραγωγών ως απάντηση σε ποικίλους αγωνιστές σύσπασης

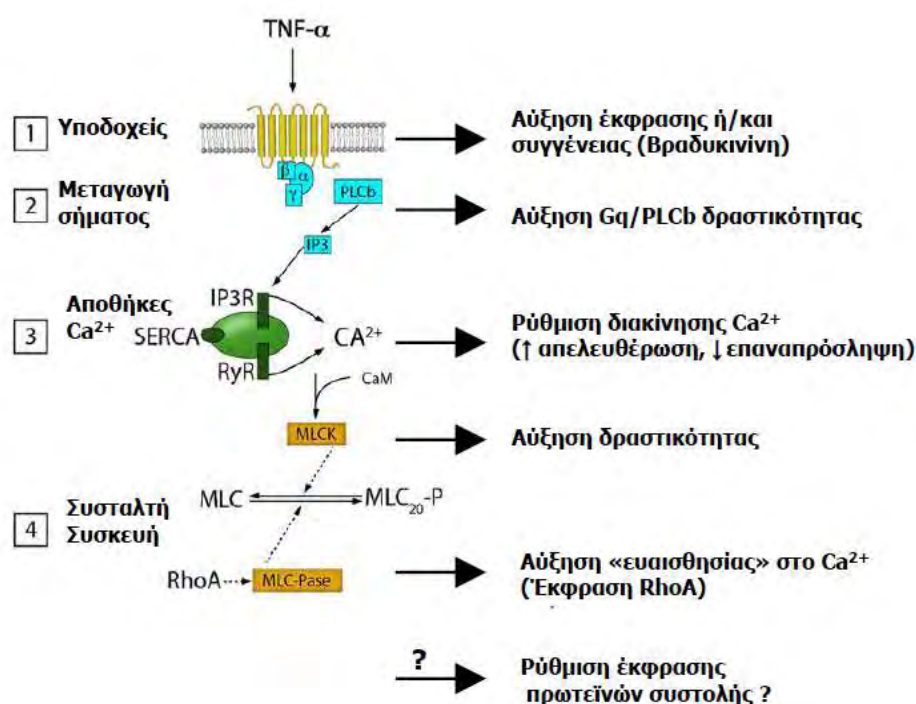
Υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις ότι η επαγωγή BYA στο άσθμα από τον TNF-α είναι συνέπεια της άμεσης δράσης του στα ΛΜΚ. Η επώαση παρασκευασμάτων τραχείας ινδικού χοιριδίου και χοίρου με TNF-α επάγει αύξηση της απάντησης συστολής στην ακετυλοχολίνη (Shore and Moore, 2002). Ομοίως, παρασκευάσματα τραχείας ποντικίου που έχουν εκτεθεί σε TNF-α αναπτύσσουν υπεραπαντητικότητα σε διάφορους αγωνιστές υποδοχέων που συνδέουν G πρωτεΐνες (GPCRs), όπως της καρβαχόλης, της βραδυκινίνης (Jain et al., 2008) και της σεροτονίνης (Adner et al., 2002). Επίσης, ο TNF-α δυσχεραίνει τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών από β-αδρενεργικούς αγωνιστές σε ινδικά χοιρίδια και κουνέλια. Η επώαση ημικρικών τραχείας ανθρώπου με TNF-α ή και IL-1β αυξάνει την απαντητικότητα σε ποικιλία ερεθισμάτων όπως της ισταμίνης, της καρβαχόλης, της νευροκινίνης, της ακετυλοχολίνης και του ηλεκτρικού πεδίου (Sukkar et al., 2001).

1.3.5.1.1. Μηχανισμός επαγωγής βρογχικής υπεραπαντητικότητας από τον TNF-α

Οι μηχανισμοί με τους οποίους ο TNF-α τροποποιεί τη συσταλτικότητα των λείων μυϊκών ινών δεν είναι στην ολότητά τους γνωστοί. Είναι γνωστό ότι ο TNF-α ενισχύει ενδοκυττάρια σήματα Ca^{2+} ποικίλων αγωνιστών και ότι το Ca^{2+} κατέχει κεντρικό ρόλο στη φυσιολογία της μυϊκή συστολής (Chen et al., 2003). Είναι πιθανό ότι η επαγωγή από τον TNF-α αλλαγών στο μηχανισμό ρύθμισης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} τροποποιεί τη συσταλτικότητα των ΛΜΚ. Η ελαττωματική απάντηση σε αγωνιστές χάλασης, η μεταποίηση της κινητοποίησης ενδοκυττάριου Ca^{2+} και οι αλλαγές της απαντητικότητας του συσταλτικού μηχανισμού στο Ca^{2+} είναι οι πιθανοί μηχανισμοί ρύθμισης του τόνου των λείων μυϊκών ινών από τον TNF-α (Brightling et al., 2008).

Η ενίσχυση της μεταγωγής σημάτων Ca^{2+} είναι πιθανόν το αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης ή και λειτουργικότητας υπομονάδων υποδοχέων G πρωτεϊνών (Gaq ή Gai), όπως και της αυξημένης έκφρασης ή και λειτουργικότητας της φωσφολιπάσης Cβ (PLCβ). Η τροποποίηση της δράσης ενζύμων, όπως της 5-φωσφατάσης I και II, που ρυθμίζουν το μεταβολισμό της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3), οι αλλαγές της λειτουργικότητας ή/και της έκφρασης υποδοχέων ρυανοδίνης

(RyR), υποδοχέων της IP3, όπως και διαύλων Ca^{2+} (SERCA) και της καλμοδουλίνης είναι μερικοί ακόμη μηχανισμοί που έχουν προταθεί. Ακόμη, είναι γνωστό ότι η G πρωτεΐνη RhoA ενισχύει τη συσταλτικότητα των λείων μυϊκών ινών αυξάνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης μέσω ενεργοποίησης της Rho κινάσης (ROCK) και καταστολής της MLCP. Έτσι, η αύξηση της απαντητικότητας-«ευαισθησίας» του συσταλτού μηχανισμού στο Ca^{2+} ερμηνεύεται ως αύξηση της έκφρασης ή της ενεργότητας της MLCK ή και της MLCP (Brightling et al., 2008) (εικ. 11).



Εικόνα 11. Μηχανισμοί επαγωγής βρογχικής υπεραπαντητικότητας από τον TNF-α. Τροποποιημένη από (Brightling et al., 2008).

1.3.5.2. Ο TNF-α επάγει τον «συνθετικό/πολλαπλασιαστικό» φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών

Ο TNF-α επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Επιπλέον, ο TNF-α, μόνος ή σε συνδυασμό με IL-1β και INFγ, τροποποιεί τη συνθετική λειτουργία των ΛΜΚ καθώς επάγει την έκκριση ποικίλων προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων και μορίων προσκόλλησης όπως των ICAM-1, VCAM-1 και CD40 (Chung, 2000). Σε μελέτη του εργαστηρίου μας φάνηκε ότι, εκτός των ICAM

και VCAM, ο TNF-α αυξάνει επίσης την έκφραση της IL-6 και του RANTES (Tsapournioti et al., 2013).

1.4. Η απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών στην υποξία και την υποξική φλεγμονή

1.4.1. Σημασία και ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου

Οι μεταβολές στην συγκέντρωση οξυγόνου (O_2) στο κύτταρο μπορεί να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες, είτε λόγω της υπερβολικής έκθεσης όπως σε περιπτώσεις υπεροξίας, είτε λόγω ανεπαρκών ποσοτήτων οξυγόνου όπως σε περιπτώσεις υποξίας. Η ικανότητα των οργανισμών να διατηρούν την ομοιόσταση του O_2 είναι απαραίτητη για την επιβίωση όλων των ασπόνδυλων και σπονδυλωτών ειδών. Στον άνθρωπο, όπως και στα υπόλοιπα σπονδυλωτά, οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις O_2 παραμένουν σταθερές με την ανάπτυξη πολύπλοκων δομών για τη μεταφορά O_2 σε όλα τα κύτταρα, οι οποίες περιλαμβάνουν τους πνεύμονες, την καρδιά, τα αγγεία και τα ερυθροκύτταρα. Η ακριβής ανάπτυξη και η λειτουργική συνεργασία όλων αυτών των φυσιολογικών συστημάτων διασφαλίζει την επαρκή οξυγόνωση του οργανισμού και συμβάλλει στη ρύθμιση της ομοιόστασης του O_2 (Semenza, 2012).

Η μειωμένη παροχή οξυγόνου στους ιστούς (υποξία) κινητοποιεί διάφορους αντιροπιστικούς μηχανισμούς, τόσο κατά την οξεία όσο και κατά τη χρόνια στέρηση οξυγόνου από τα κύτταρα. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί προστασίας συντελούνται στα μιτοχόνδρια, όπου οι αλλαγές που παρατηρούνται στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση αποσκοπούν στην ελάττωση της δημιουργίας ελεύθερων ριζών οξυγόνου και στη διατήρηση χαμηλής συγκέντρωσης κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . Παράλληλα, η ένδεια οξυγόνου κινητοποιεί πιο μόνιμες μεταβολές της λειτουργίας των κυττάρων μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα (Hypoxia Inducible Factor, HIF) (Semenza, 2012).

1.4.1.1. HIF: Ρόλος και ρύθμιση από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου

Οι HIFs (Hypoxia inducible factors 1, 2 και 3) αποτελούν σε μεγάλο βαθμό το σημαντικότερο ρυθμιστή της ομοιόστασης του O_2 καθώς και τους υπεύθυνους μεταγραφικούς παράγοντες για τη μεταγραφή γονιδίων ως απόκριση στην υποξία.

Σχηματίζονται μετά τον ετεροδιμερισμό της αντίστοιχης α και της κοινής β υπομονάδας. Ο HIF-1 και πιο συγκεκριμένα η HIF-1 α υπομονάδα του παραμένει η περισσότερο μελετημένη. Η δραστηριότητά του αυξάνεται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα των μεταζώων, κυρίως μέσω μετα-μεταφραστικών μηχανισμών, ενώ η σημασία του κρίνεται ιδιαίτερα κρίσιμη για την προσαρμογή του καρδιαγγειακού και του αναπνευστικού συστήματος σε υποξικές συνθήκες (Semenza, 2012).

Ο HIF-1 α ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός ευρέος φάσματος γονιδίων (γύρω στα 100), περιλαμβάνοντας γονίδια που σχετίζονται με την αγγειογένεση και την αγγειακή αναδιαμόρφωση, την ερυθροποίηση, τον μεταβολισμό, την απόπτωση, τον έλεγχο της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, τον τόνο των λείων μυών, τη μεταφορά οξυγόνου και τη φλεγμονή (Πίνακας 1).

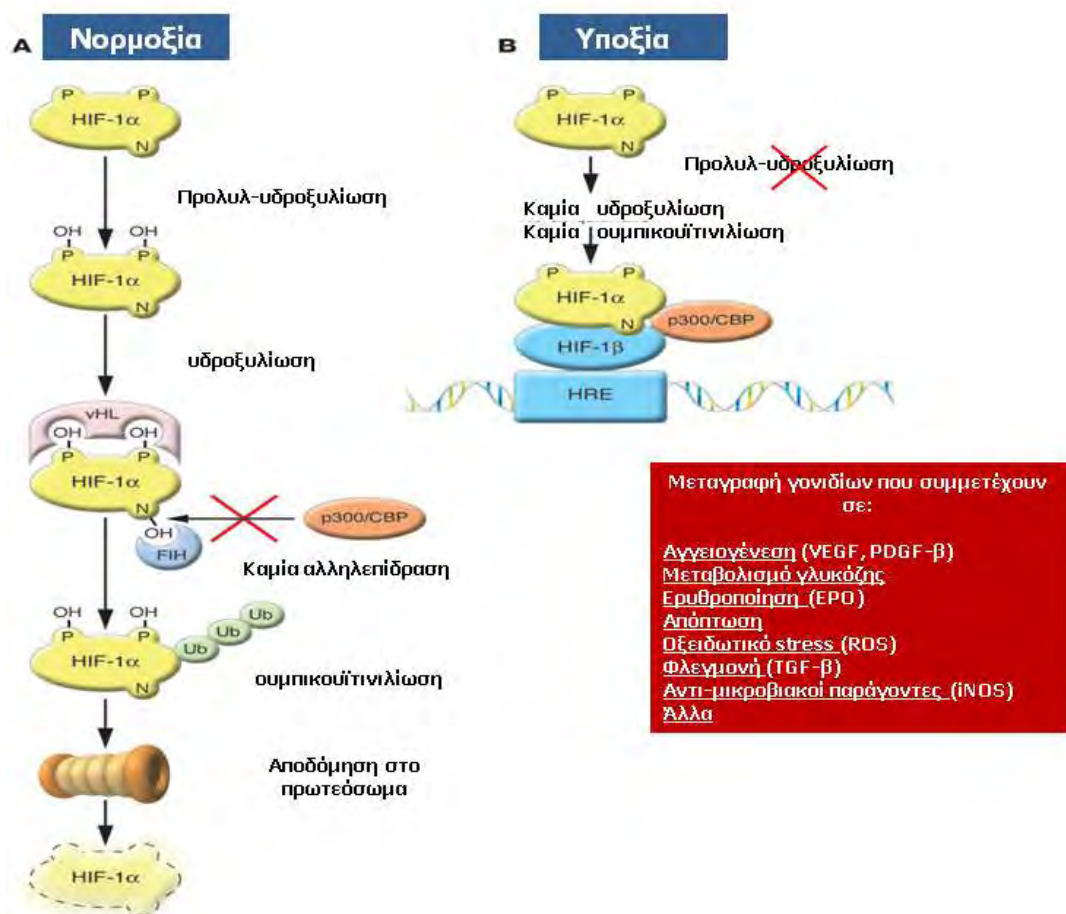
Αδενυλική κυκλάση	Αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης-2 (IGF-2)
α 1B-αδρενεργικοί υποδοχείς	IGF δεσμευτική πρωτεΐνη 1
Αδρεμεντουλίνη	IGF δεσμευτική πρωτεΐνη 3
Αλδολάση A	Γαλακτική δεϋδρογονάση A
Αλδολάση C	Συνθάση του νιτρικού οξειδίου 2 (iNOS-2)
Καρβονική ανυδράση IX	p21
Καρβονική ανυδράση XII	p 35srj
Σερουλοπλασμίνη	Φωσφορροκτοκινάση L
Ενδοθηλίνη-1 (ET-1)	Κινάση της φωσφογλυκεραλδεΐδης 1
Ενολάση 1 (ENO1)	Αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1)
Ερυθροποιητίνη (EPO)	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF-B)
Μεταφορέας γλυκόζης (GLUT-1)	Πυρροβική κινάση M
Δεϋδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης	Υποδοχέας τρανσφερίνης
Οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1)	TGF- α
Εξοκινάση 1	VEGF
Εξοκινάση 2	Flt-1

Πίνακας 1. Γονιδιακοί στόχοι του HIF-1

Ο HIF-1 α τροποποιεί την έκφραση των παραπάνω γονιδίων μέσω διμερισμού με την πρωτεΐνη ARNT ή HIF-1 β και την επακόλουθη σύνδεσή του στις ειδικές περιοχές των αποκρινόμενων στην υποξία γονιδιακών στοιχείων (HREs-Hypoxia Responsive Elements), τα οποία βρίσκονται στην περιοχή των υποκινητών τους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μεταγραφική ενεργοποίηση, η οποία ρυθμίζεται και από τον κινητοποιούμενο συμπαράγοντα p300.

Ο κυριότερος μηχανισμός που συντονίζει τα επίπεδα διαθεσιμότητας και τις επιδράσεις του HIF-1 α στη γονιδιακή έκφραση, περιλαμβάνει μία μετα-μεταφραστική ρύθμιση. Σε συνθήκες φυσιολογικών συγκεντρώσεων οξυγόνου, ο HIF-1 α

υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης από ειδικές προλυλ-υδροξυλάσες (PHDs) με αποτέλεσμα να αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (VHL). Η VHL αποτελεί υπομονάδα του συμπλέγματος της E3 λιγάσης της συμπικουΐτινης. Το σύμπλεγμα αυτό αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και τον καθιστά υποψήφιο για την αποδόμησή του από τα πρωτεώματα. Σε μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου ή όταν προστίθενται χημικά ανάλογα που δρουν άμεσα ή έμμεσα ως ανταγωνιστές της αντίδρασης υδροξυλίωσης (π.χ. ανάλογα 2-οξογλουταράτης, δεσφεροξαμίνη και CoCl_2), η VHL πρωτεΐνη δεν συνδέεται με τον HIF-1α. Ως αποτέλεσμα, αυτός συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Η υπομονάδα $-\beta$, σε αντίθεση με την $-\alpha$, εκφράζεται συνεχώς και ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου στο κύτταρο. Ακολουθούν τροποποιήσεις (φωσφορυλιώσεις, υδροξυλιώσεις, ακετυλιώσεις, αλληλεπίδραση με συμπαράγοντες, κλπ.) που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και τον ετεροδιμερισμό των υπομονάδων και τη δημιουργία του ενεργού μεταγραφικού συμπλόκου (Semenza, 2012) (εικ. 12).



Εικόνα 12. Ρύθμιση της επαγωγής του HIF-1. Τροποποιημένη από (Zarembek and Malech, 2005)

1.4.1.2. Ο HIF-1 συμβάλλει στην αλλεργική φλεγμονή των αεραγωγών και την παθοφυσιολογία του άσθματος

Πρωτεΐνες στόχοι του HIF-1, μεταξύ των οποίων διάφορα ένζυμα της γλυκολυτικής οδού, ανευρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στους πνεύμονες ποντικών πειραματικού μοντέλου άσθματος (Fajardo et al., 2004).

Η έκθεση ευαισθητοποιημένων ποντικών σε αλλεργιογόνο (ωαλβουμίνη) ενισχύει την έκφραση του HIF στους πνεύμονες. Αξιοσημείωτα αυξημένα επίπεδα HIF-1α και HIF-2α παρατηρούνται στους πυρήνες επιθηλιακών κυττάρων, μακροφάγων και λεμφοκυττάρων σε ιστολογικές τομές πνευμόνων ποντικών με αλλεργικό βρογχικό άσθμα μετά από ευαισθητοποίηση και δοκιμασία πρόκλησης με ωαλβουμίνη. Η επαγωγή του HIF-1α από αλλεργιογόνο στα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων εξαρτάται από μεταγωγή ενδοκυττάρου σήματος της PI3K (Kim et al., 2010).

Ο HIF κατέχει ρόλο στην επαγωγή ιστικής αναδιαμόρφωσης και φλεγμονής των αεραγωγών από αλλεργιογόνο. Η ενδοτραχειακή χορήγηση 2-μεθοξυιστραδιόλης (2-Methoxyestradiol, 2-ME), ενός αντι-αγγειακού παράγοντα που αδρανοποιεί τον HIF-1α, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της διήθησης των αεραγωγών από λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα, την μείωση της υπερπλασίας των καλυκοειδών κυττάρων και της παραγωγής βλέννης, όπως και της εναπόθεσης κολλαγόνου τύπου IV σε πειραματικό μοντέλο άσθματος ποντικών. Επιπρόσθετα, εκτός της αρνητικής ρύθμισης στην έκφραση του VEGF, επιφέρει μείωση των επιπέδων των κυκλοφορούντων στον ορό ειδικών IgE αντισωμάτων έναντι του αλλεργιογόνου (ωαλβουμίνη) (Huerta-Yepez et al., 2008). Μείωση της διήθησης των πνευμόνων από ηωσινόφιλα, όπως και αύξηση της έκκρισης INF-γ από ενεργοποιημένα CD4+ T κύτταρα παρατηρείται και σε γενετικώς τροποποιημένα ετεροζυγωτικά για τον HIF-1α ποντίκια (HIF-1α^{+/-}), μετά από δοκιμασία πρόκλησης με αλλεργιογόνο (Guo et al., 2009). Ο HIF-1, μέσω επαγωγής του VEGF, αυξάνει τη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων, τη BYA στη μεταχολίνη και τα επίπεδα των Th2 κυτοκινών, IL-4, IL-5, και IL-13 (Kim et al., 2010). Επιπρόσθετα, η φαρμακολογική αναστολή και του HIF-2α μειώνει τη διήθηση των αεραγωγών από φλεγμονώδη κύτταρα μέσω αρνητικής ρύθμισης του VEGF (Lee and Chung, 2007). Επίσης, η απαλοιφή της έκφρασης της Arnt πρωτεΐνης με μεθόδους γενετικής μηχανικής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης ηωσινοφύλων και λεμφοκυττάρων στους

πνεύμονες, όπως και του αριθμού των κυττάρων με θετική χρώση για τον VEGF, αλλά και τη μείωση του τίτλου των ειδικών για το αλλεργιογόνο IgE και IgG1 αντισωμάτων (Huerta-Yepez et al., 2011). Αντίθετα, η χορήγηση του αναστολέα των προλυλ-υδροξυλασών και ισχυρού επαγωγέα των HIF-1α και HIF-2α, αιθυλ-3,4-διδροξυβενζοϊκού (Ethyl-3,4-dihydroxybenzoate, EDHB) προκαλεί περαιτέρω αύξηση της φλεγμονώδους απάντησης των αεραγωγών στην ωαλβουμίνη (Huerta-Yepez et al., 2011).

Ο HIF-1 φαίνεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αλλεργικής νόσου και στον άνθρωπο. Ο HIF-1 και ο VEGF ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα τόσο σε ιστοτεμάχια πνευμόνων όσο και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με αλλεργικό βρογχικό άσθμα μετά από δοκιμασία πρόκλησης στη γάτα. Ομοίως αυξημένα, παρατηρούνται τα επίπεδα του HIF-1 στο ρινικό έκπλυμα ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα μετά από την ίδια δοκιμασία πρόκλησης (Huerta-Yepez et al., 2011).

Τα μαστοκύτταρα, κύτταρα με κεντρικό ρόλο στην αλλεργική φλεγμονή, ρυθμίζουν την αγγειακή διαπερατότητα σε πειραματικό μοντέλο άσθματος, μέσω μεταγωγής σήματος της PI3K, ενεργοποίησης του HIF-1α και επαγωγής της έκφρασης του VEGF (Lee et al., 2008).

1.4.1.3. Απόκριση λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών στην υποξία

Οι απαντήσεις των λείων μυϊκών κυττάρων στην υποξία διαδραματίζουν ρόλο στις φυσιολογικές τους λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της συστολής. Σε κυτταρικό επίπεδο, η χρόνια υποξία έχει ως αποτέλεσμα την υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων των βρόγχων, αυξημένη «ευαισθησία» αυτών σε χολινεργικούς αγωνιστές, όπως και μείωση της έντασης των απαντήσεων συστολής σε απομονωμένη τραχεία ποντικού (Clayton et al., 1999), η οποία αίρεται μετά από αφαίρεση του επιθηλίου. *In vitro*, τα επίπεδα οξυγόνου φαίνεται ότι ρυθμίζουν την αύξηση των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς η μέτρια υποξία επάγει ενώ η οξεία υποξία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους (Cogo et al., 2003).

Το κοβάλτιο (CoCl₂) επάγει τον HIF-1α στα ΛΜΚ των αεραγωγών, τόσο μέσω της σταθεροποίησης όσο και μέσω της αύξησης της σύνθεσής του. Η παραγωγή και δράση ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) όπως και η ενεργοποίηση της PI3K εμπλέκονται στο μηχανισμό επαγωγής του HIF-1α από το CoCl₂ στα ΛΜΚ αεραγωγών. Επιπλέον, το CoCl₂ επάγει σημαντική μείωση της

έντασης συστολής απομονωμένου παρασκευάσματος τραχείας, ως απάντηση στο KCl αλλά όχι στην ακετυλοχολίνη (ACh). Η τροποποίηση της συσταλτότητας του λείου μυός από τον «μιμητή» υποξίας CoCl_2 , πιθανόν οφείλεται σε ρύθμιση της λειτουργικότητας ταυσεοεξαρτώμενων διαύλων ιόντων από τον HIF-1α (Chachami et al., 2004).

Η έκθεση *in vitro* διαφοροποιημένων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού σε ορό εμβρύου βοός επάγει τον HIF-1α. Η επαγωγή αυτή συνίσταται σε θετική ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης του HIF-1α σε επίπεδο μεταγραφής ή/και μετάφρασης και εξαρτάται από την ενεργοποίηση κυτταρικού μονοπατιού της PI3K. Μάλιστα, ο ορός εμβρύου βοός δρα συνεργικά με το CoCl_2 στην αύξηση των επιπέδων μεταγραφικά ενεργού HIF-1α. Επιπλέον, η ανταποκρισιμότητα παρασκευάσματος τραχείας στην ACh, αλλά όχι στο KCl ή την ενδοθηλίνη, αυξάνει σε συνθήκες υπερέκφρασης HIF-1α (FBS + CoCl_2), υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του HIF-1α στη ρύθμιση του τόνου του λείου μυός (Chachami et al., 2007).

1.4.2. Απόκριση λείων μυϊκών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και φλεγμονής

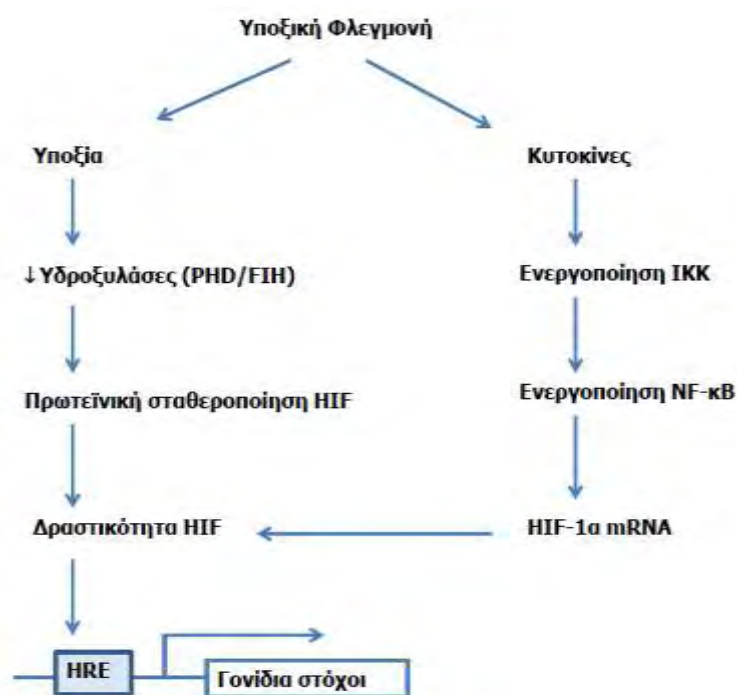
1.4.2.1. Λειτουργική διάδραση (Cross talk) NF-κB και HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και HIF, εκτός της ανεξάρτητης δράσης τους, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε συνθήκες φλεγμονής και υποξίας. Η ιστική φλεγμονή συχνά συνοδεύεται από υποξία καθώς το οίδημα παρεμβαίνει στην τοπική διάχυση του οξυγόνου από το μικροαγγειακό δίκτυο, τα τοπικά δομικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα και η συσσώρευση κυττάρων ανοσίας καταλήγει σε αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου.

Ο HIF-1α είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας του οποίου η ενεργοποίηση εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου αφού, σε αρκετές περιπτώσεις, ενεργές ρίζες οξυγόνου συμβάλλουν στην επαγωγή του. Βέβαια, η κύρια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων της οποίας η μεσολάβηση στις φλεγμονώδεις απαντήσεις του κυττάρου εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου είναι ο NF-κB (Gloire et al., 2006). Ενδεικτικό της εξάρτησης των δύο μεταγραφικών παραγόντων από το οξειδωτικό stress των κυττάρων είναι ότι οι αγωνιστές των πυρηνικών υποδοχέων ενεργοποίησης των υπεροξυσωματίων τύπου γ

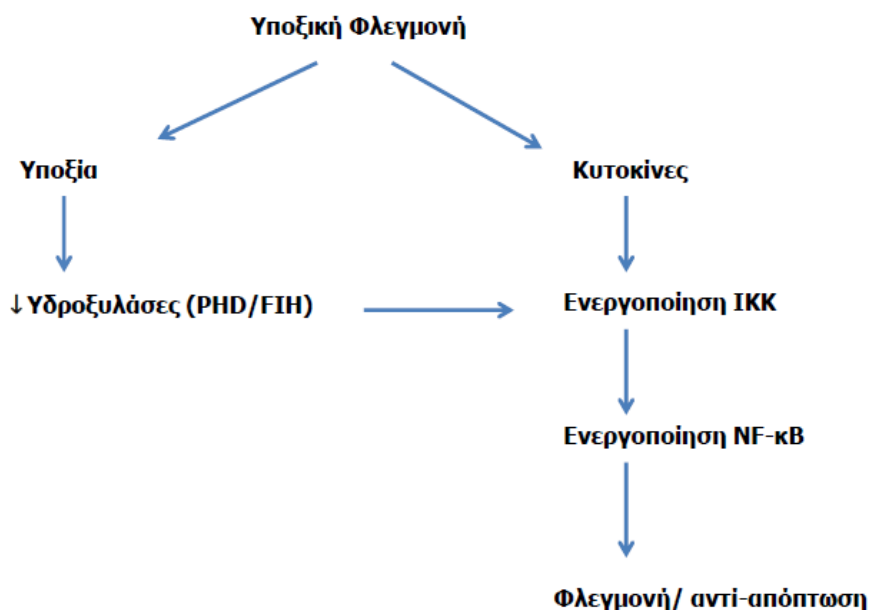
(PPAR γ), μειώνουν την έκφραση T_H2 κυτοκινών, χημειοκινών, μορίων προσκόλλησης και του VEGF, μετά από δοκιμασία πρόκλησης με αλλεργιογόνο σε πειραματικό μοντέλο αλλεργικού άσθματος, μέσω της τροποποίησης ενεργών μορίων οξυγόνου και της ενεργοποίησης του NF- κ B και του HIF-1 α (Lee et al., 2006).

Είναι σήμερα γνωστό ότι ο HIF, εκτός της επαγωγής του στην υποξία, ενεργοποιείται από μία σειρά μη υποξικών παραγόντων, όπως βακτηριακοί λιποσακχαρίτες, η αποδιοργάνωση του κυτταρικού δικτύου των μικροσωληνίσκων, ο TNF- α , ο παράγοντας αύξησης των ηπατοκυττάρων (HGF), η IL-18, η ινσουλίνη και η θρομβίνη. Κοινός παρονομαστής όλων αυτών των νορμοξικών ερεθισμάτων στην ενεργοποίηση του HIF είναι η θετική μεταγραφική ρύθμιση του HIF-1 α από τον NF- κ B (Taylor, 2008). Ο υποκινητής του *HIF-1 α* περιέχει μια ενεργό θέση σύνδεσης για τον NF- κ B (van Uden et al., 2008). Επιπλέον, ο NF- κ B διαδραματίζει ρόλο στην έκφραση των βασικών επιπέδων του mRNA του HIF-1 α *in vitro* (Belaiba et al., 2007) και *in vivo* (Rius et al., 2008). Δεδομένου ότι τα βασικά επίπεδα έκφρασης του HIF-1 α είναι κριτικής σημασίας για την «ετοιμότητα» του κυττάρου να ανταποκρίνεται στην υποξία, φαίνεται ότι ο NF- κ B κατέχει ρόλο στο βαθμό και την ταχύτητα ενεργοποίησης του HIF σε συνθήκες υποξίας (εικ. 13).



Εικόνα 13. Μοντέλο ρύθμισης της κυτταρικής σηματοδότησης του HIF-1 από τον NF- κ B κατά την υποξική φλεγμονή. Τροποποιημένη από (Taylor, 2008).

Επιπρόσθετα, ο HIF ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος από τον NF-κB. Η υποξία συμβάλλει στην ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της επακόλουθης μείωσης της δραστηριότητας των υδροξυλασών που απενεργοποιούν την IKKβ κινάση (Cummins et al., 2006). Η θετική αυτή ρύθμιση της IKKβ κινάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης και αποδόμησης της ανασταλτικής υπομονάδας IκBa (εικ. 14).



Εικόνα 14. Μοντέλο ρύθμισης της κυτταρικής σηματοδότησης του NF-κβ κατά την υποξική φλεγμονή. Τροποποιημένη από (Taylor, 2008).

Η αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων στόχων του NF-κB και η επακόλουθη υπεραπαντητικότητα σε φλεγμονώδη ερεθίσματα, σε κερατινοκύτταρα ποντικών που υπερεκφράζουν τον HIF-1α, είναι χαρακτηριστική της εξάρτησης της μεταγωγής σήματος του NF-κB από τον HIF-1α (Scortegagna et al., 2008).

1.4.2.2. Η απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών στον TNF-α και την υποξία

Η κατεργασία ΛΜΚ αεραγωγών με TNF-α επάγει αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-1α στη νορμοξία και περαιτέρω αύξηση αυτής στην υποξία, μέσω ενεργοποίησης του NF-κβ. Ωστόσο, η θετική αυτή ρύθμιση από τον TNF-α δεν συνοδεύεται και από αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α, αφού δεν παρατηρείται αύξηση

του mRNA γνωστών γονιδιακών στόχων του HIF-1, όπως του VEGF (Tsapournioti et al., 2013).

Ο TNF-α, όπως και η υποξία ρυθμίζουν τη μεταγραφή φλεγμονωδών μορίων στα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών. Συγκεκριμένα, ο TNF-α αυξάνει την έκφραση της IL-6, του RANTES και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM σε σχέση με την υποξία. Η υποξία αυξάνει την έκφραση της IL-6 αλλά δεν τροποποιεί σημαντικά την έκφραση του RANTES, του ICAM και του VCAM. Επιπλέον, η υποξία προκαλεί μείωση της επαγόμενης από τον TNF-α μεταγραφής του VCAM (Tsapournioti et al., 2013).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η έρευνα στην παροχή βελτιωμένων θεραπειών στο άσθμα έχει από καιρό επικεντρωθεί στους παράγοντες που καθορίζουν τη συσταλτικότητα του λείου μυϊκού κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των μηχανικών ιδιοτήτων και της απαντητικότητάς του σε παράγοντες συστολής και χάλασης. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία το πεδίο έρευνας της βιολογίας του λείου μυός έχει διευρυνθεί αρκετά. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εδραιωμένη πλέον πολύ-λειτουργική και δυναμική συμπεριφορά του λείου μυϊκού κυττάρου σχετίζεται στενά τόσο με τη φλεγμονή, που παρατηρείται κατά τις διαδικασίες ιστικής επούλωσης και αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών, όσο και με την υποξία, που συχνά συνοδεύει τη φλεγμονή. Οι απαντήσεις των λείων μυϊκών κυττάρων στην υποξία ή/και σε παράγοντες φλεγμονής διαδραματίζουν ρόλο στις φυσιολογικές τους λειτουργίες.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί σε λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινων βρόγχων η επίδραση της φλεγμονής ή/και της υποξίας στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φαινοτυπική «ωρίμανση» και τη συστολή. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η επίδραση του TNF- α , της υποξίας και του συνδυασμού τους, στην έκφραση των πρωτεϊνών συστολής *SMMHC*, *MLCK*, *α 2 ακτίνης*, *SM22* και *phospho MLC2* σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων διαφοροποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων (HBSMCs, Clonetics).

Τα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Dulbecco's modified Eagle's/Ham's F12 (DMEM:F12, GIBCO) το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός Fetal Bovine Serum-FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100mg/ml στρεπτομυκίνη (διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, PS, Invitrogen). Η επώαση έγινε σε υγρανόμενο επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνονταν κάθε 48-72 ώρες. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 80-90% της επιφάνειας του μέσου καλλιέργειας αποκολλήθηκαν μεταξύ τους όπως και από το υπόστρωμα με θρυψίνη.

Αρχικά, γίνεται μεταφορά της φλάσκας με τα κύτταρα σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου είναι δυνατή η εργασία υπό άσηπτες συνθήκες. Το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας αναρροφάται και τα κύτταρα εκπλένονται με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline, PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄). Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν εναπομείναντα ίχνη ορού τα οποία περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης. Κατόπιν, προστίθεται θρυψίνη (2ml σε κάθε φλάσκα επιφάνειας 75cm²). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 37°C για 5 λεπτά. Με την ενζυμική δράση της θρυψίνης, τα ΛΜΚ αποκολλώνται και αποκτούν σφαιρική μορφή, σε αντίθεση με τη χαρακτηριστική επιμήκη που είχαν προσκολλημένα στο υπόστρωμα της φλάσκας. Έπειτα, προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό (10 ml σε κάθε φλάσκα επιφάνειας 75cm²), τα κύτταρα αναδεύονται και το εναιώρημα μοιράζεται σε 2 ή 3 φλάσκες. Σε κάθε φλάσκα προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό σε τελικό όγκο 12ml/φλάσκα.

3.2. *In vitro* διαφοροποίηση λείων μυϊκών κυττάρων

Τα ΛΜΚ επιστρώνονται σε τρυβλία petri διαμέτρου 10cm και όταν φθάσουν σε πληρότητα 80-100%, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1x δύο φορές. Στη συνέχεια, προστίθεται θρεπτικό υλικό νηστείας (DMEM-F12) εμπλουτισμένο με 100U/ml πενικιλίνη, 100U/ml στρεπτομυκίνη και ITS (5μg/ml ινσουλίνη, 5μg/ml τρανσφερίνη, και 5μg/ml σελήνιο, Sigma-Aldrich Chemie) και οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον

επωαστικό θάλαμο για 3 ημέρες. Η χρήση του θρεπτικού υλικού νηστείας είναι απαραίτητη διότι επάγει το συστατικό φαινότυπο σε πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ. Αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνονταν 1 ώρα πριν την κατεργασία των κυττάρων.

3.3. Κατεργασία των κυττάρων

Μετά το πέρας των 3 ημερών, έγινε η κατεργασία των ΛΜΚ στις 4 συνθήκες της παρούσας μελέτης.

- **Συνθήκη «TNF-α»:** Προσθήκη TNF-α (Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Germany) σε τελική συγκέντρωση 10 ng/ml ανά καλλιέργεια και τοποθέτηση στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες (κατεργασία με TNF-α σε συνθήκες νορμοξίας).
- **Συνθήκη «Υποξία»:** Επώαση σε υποξία (1% O₂, 94% N₂ και 5%CO₂) σε θάλαμο INVIVO2 200 (Ruskin Life Sciences) για 24 ώρες χωρίς ειδική κατεργασία.
- **Συνθήκη «TNF-α + Υποξία»:** Προσθήκη TNF-α σε τελική συγκέντρωση 10 ng/ml ανά καλλιέργεια και τοποθέτηση στον θάλαμο υποξίας για 24 ώρες (κατεργασία με TNF-α σε συνθήκες υποξίας).
- **Συνθήκη «control»:** Παραμονή των καλλιεργειών σε συνθήκες νορμοξίας για 24 ώρες.

3.4. Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση RNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου PureZOL της Biorad και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το PureZOL είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης κατάλληλο για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς. Διατηρεί την ακεραιότητα του RNA ενώ λύει τις μεμβράνες και τα ενδοκυττάρια συστατικά κατά την ομογενοποίηση των κυττάρων.

Αρχικά γίνεται αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου, προσθήκη 1ml διαλύματος PureZOL σε κάθε πιάτο καλλιέργειας και σάρωση των κυττάρων με χρήση ειδικής ξύστρας. Τα ομογενοποιημένα μεταφέρονται σε σωληνάρια τύπου eppendorf απαλλαγμένα από RNAάσες και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάσταση των συμπλεγμάτων νουκλεοπρωτεΐνης. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση σε 10.000 x g σε θερμοκρασία 4°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων στερεών κυτταρικών θραυσμάτων. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο όπου προστίθενται 0,2ml χλωροφορμίου.

Ακολουθεί αναδιάλυση με δυνατή ανακίνηση των φιαλιδίων. Τα φιαλίδια επωάζονται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται σε 12.000 x g για 15 λεπτά. Το χλωροφόρμιο συμβάλλει στον αποτελεσματικό διαχωρισμό του μίγματος σε δύο διακριτές φάσεις: μιας υδατικής υπερκείμενης που περιέχει το RNA και μιας οργανικής υποκείμενης που περιέχει πρωτεΐνες, το PureZOL και το χλωροφόρμιο. Ενδιάμεσα βρίσκεται το DNA. Μετά τη φυγοκέντρηση η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια στα οποία προστίθενται 500 μl ισοπροπυλικής αλκοόλης. Ακολουθεί καλή ανάμειξη, τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται σε 12.000 x g για 10 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται και 1 ml αιθυλικής αλκοόλης 75% προστίθεται στο ίζημα. Ακολουθεί καλή αναδιάλυση και τα δείγματα επαναφυγοκεντρώνται σε 10.000 x g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αποξηραίνεται στον αέρα προτού ανασυσταθεί σε 60 μl H₂O ελεύθερου RNAσών. Πέντε (5)μl από κάθε δείγμα φυλάσσονται σε νέο eppendorf για ποσοτικό προσδιορισμό του RNA με φωτομέτρηση.

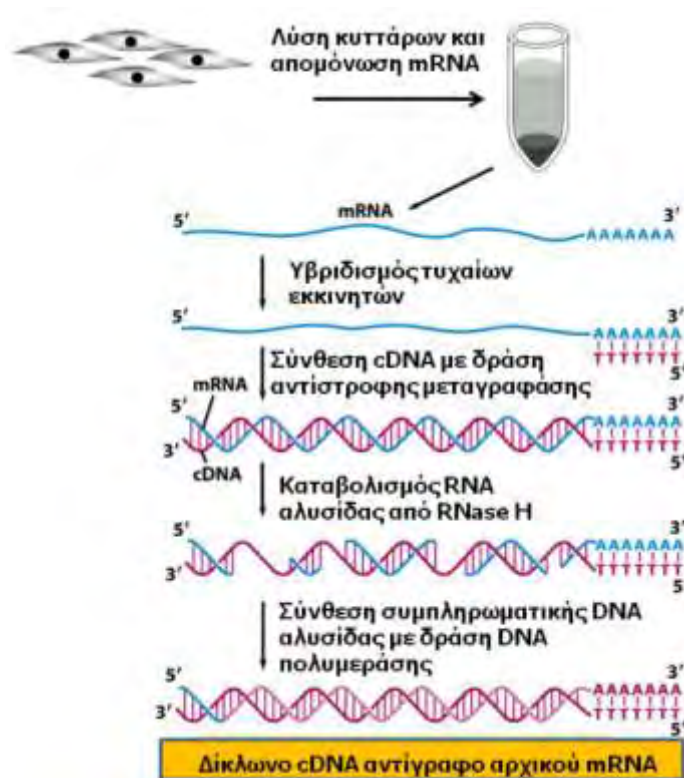
3.5. Εκτίμηση της συγκέντρωσης του RNA

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA (C_{RNA}) γίνεται με φωτομέτρηση των δειγμάτων σε 2 διαφορετικά μήκη κύματος του υπεριώδους φωτός (UV), στα 260 nm, και στα 280nm. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν το υπεριώδες στα 260nm, ενώ οι πρωτεΐνες απορροφούν το υπεριώδες στα 280nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA βασίζεται στη γνώση ότι διάλυμα RNA συγκέντρωσης 40ng/μl έχει απορρόφηση ίση με 1 στα 260nm. Ο λόγος της οπτικής απορρόφησης στα 260nm προς την οπτική απορρόφηση στα 280nm (Optical Density, OD) είναι ένας δείκτης εκτίμησης της καθαρότητας του δείγματος. Διαλύματα RNA με λόγο OD 260/280 που κυμαίνεται μεταξύ 1.7 και 2 θεωρούνται αποδεκτά.

3.6. Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) είναι η διαδικασία εκείνη κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA). Η αντίδραση καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση, ένζυμο που προέρχεται από ρετροϊούς. Προκειμένου να συντεθεί το cDNA χρησιμοποιούνται ως εκκινητές εξαμερή των τεσσάρων τριφωσφοδοξυριβονουκλεοτιδίων με τυχαίες και

διαφορετικές αλληλουχίες. Όταν αυτά προσδεθούν στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, παρουσία τριφωσφοδεοξυριβονουκλεοτιδίων, συνθέτει το συμπληρωματικό κλώνο. Το cDNA του υβριδίου cDNA-RNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας από την DNA πολυμεράση, αφού πρώτα η αλυσίδα RNA έχει αποσυντεθεί από την RNάση H (εικ. 15).



Εικόνα 15. Σύνθεση cDNA [τροποποιημένη από *Molecular Biology of the Cell 5/e* (© Garland Science 2008)].

Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο High-capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Κάθε μίγμα αντίδρασης περιείχε:

- 1 μg ολικού RNA,
- 0,8 μl τριφωσφοδεοξυριβονουκλεοτιδίων (25x dNTPs),
- 2 μl τυχαίων εκκινήτων (10x Random primers),
- 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης
- 2 μl 10x RT buffer [200Mm Tris-HCL (pH 8.4), 500Mm KCl], όπως και
- H₂O απαλλαγμένο από RNAάσες έως τον τελικό όγκο των 20 μl.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα που περιείχε μίγμα ολικού RNA από τις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, στο οποίο δεν προστέθηκε αντίστροφη μεταγραφάση (αντίδραση RT-).

Τα δείγματα, αφού φυγοκεντρήθηκαν ταχέως, επώαστηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα :

25°C για 10min,

37°C για 120min,

85°C για 5sec.

Ψύξη στους 4°C.

Τα προϊόντα της αντίδρασης φυγοκεντρήθηκαν και προστέθηκαν 80 μl H₂O απαλλαγμένο από RNAάσες (τελικός όγκος δείγματος: 100μl). Οι αντιδράσεις αποθηκεύθηκαν στους -20°C.

3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

3.7.1. Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια *in vitro* ενζυμική μέθοδο σύνθεσης και πολλαπλασιασμού DNA. Χρησιμοποιείται για να ενισχύσει ένα συγκεκριμένο τμήμα δίκλωνου DNA, ή συμπληρωματικού DNA (cDNA, complementary-DNA), το οποίο είναι εντοπισμένο ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας βάσεων εκατέρωθεν της διπλής έλικας. Δύο ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά της αλληλουχίας στόχου, χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (primers) για μια σειρά συνθετικών αντιδράσεων που καταλύονται από τη DNA πολυμεράση.

Μία τυπική αντίδραση PCR βασίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου που περιλαμβάνει τα παρακάτω 3 διαδοχικά στάδια:

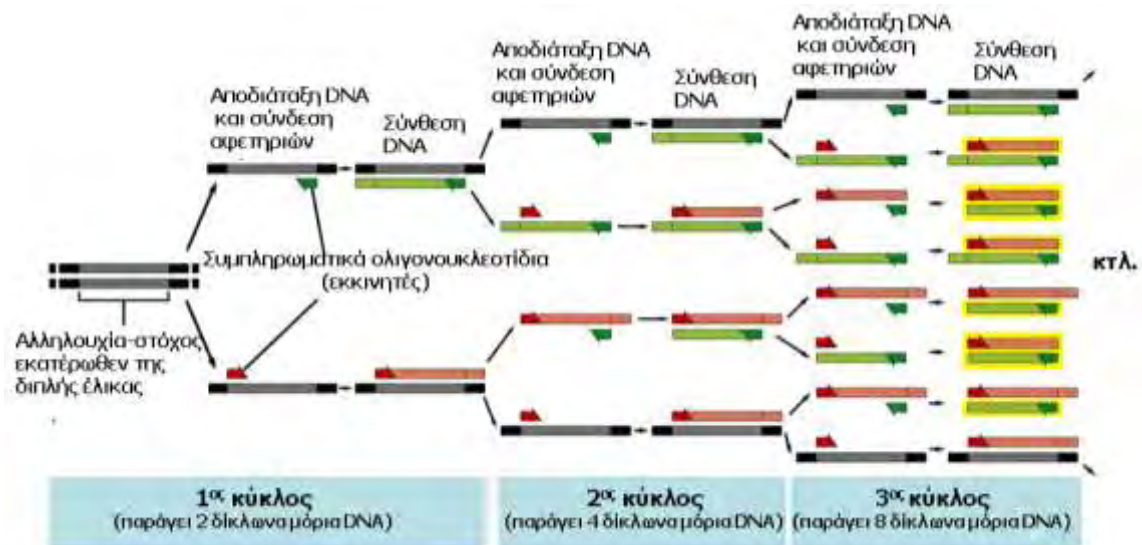
1. Αποδιάταξη (**Denaturation**) των αλυσίδων του δίκλωνου τμήματος DNA-στόχου με επώαση σε θερμοκρασία κατάλληλη για την χρησιμοποιηθείσα DNA πολυμεράση (συνήθως στους 94 °C).
2. Σύνδεση αφετηριών (**Annealing**). Οι εκκινητές ενώνονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες κάθε κλώνου σε κατάλληλη για αυτούς θερμοκρασία [5 °C κάτω από τη θερμοκρασία τήξης τους (T_m), συνήθως στους 50-60 °C].

3. Επιμήκυνση των εκκινητών (**Extension**) με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο τους και σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων της αλληλουχίας στόχου. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70-72 °C προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης (Real-Time PCR: from theory to practice-Invitrogen) (εικ. 16).



Εικόνα 16. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): Αρχή της μεθόδου [προσαρμοσμένη από *Molecular Biology of the Cell 5/e* (© Garland Science 2008)]

Το τελευταίο άκρο του μεγαλύτερου προϊόντος της PCR ορίζεται από το 5'-τελικό άκρο των εκκινητών και το μήκος του είναι η απόσταση ανάμεσα στους εκκινητές. Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου χρησιμεύουν ως μητρικά μόρια για τα επόμενα, κάθε κύκλος διπλασιάζει το ποσό του επιθυμητού προϊόντος (Saiki et al., 1988) (εικ. 17).



Εικόνα 17. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): Αρχή της μεθόδου [προσαρμοσμένη από *Molecular Biology of the Cell 5/e* (© Garland Science 2008)]

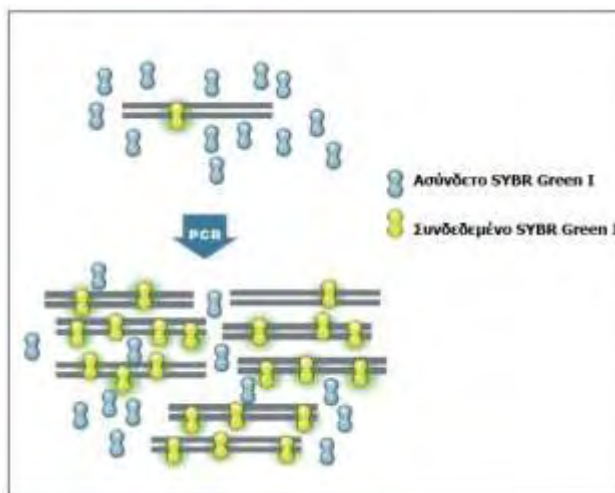
3.7.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Στη συμβατική PCR, το ενισχυμένο προϊόν ή αμπλικόνιο ανιχνεύεται με «ανάλυση τελικού σημείου». Απαιτείται δηλαδή η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης μετά το πέρας της αντίδρασης για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δεδομένων. Αντιθέτως, η Real-Time PCR επιτρέπει την ανίχνευση και μέτρηση του αμπλικονίου καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, δηλαδή σε «πραγματικό χρόνο». Η ανίχνευση και παρακολούθηση των προϊόντων εν τη γενέσει τους επιτυγχάνεται με τη χρήση σημασμένων μορίων εκκινητών (ειδική σήμανση) ή φθορίζοντων μορίων που δεσμεύονται στην επιθυμητή αλληλουχία (μη ειδική σήμανση). Τα μόρια-σημαντές παράγουν φθορίζον σήμα, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος που ενισχύεται με την αντίδραση. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της Real Time PCR, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές (TaqMan), τα ειδικά δίκλινα μόρια DNA που βασίζονται στη μεταφορά ενέργειας με απορρόφηση ενέργειας (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) και οι μη ειδικές παρεμβαλλόμενες φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. FAM, SYBR Green 1, HEX, TET, Cal Gold 540 και VIC) (Kubista et al., 2006).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των παρεμβαλλόμενων φθορίζουσών χρωστικών. Η μέθοδος αυτή είναι εύχρηστη, αφού μπορεί να προστεθεί απλά στο υπόλοιπο μίγμα της αντίδρασης, όπως και φθηνή αφού δεν χρειάζεται να σχεδιαστούν καινούριοι, ειδικοί εκκινητές. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί ακριβώς το γεγονός ότι δεν είναι ειδική. Οι παρεμβαλλόμενες χρωστικές μπορούν να συνδεθούν σε οποιοδήποτε δίκλινο DNA. Έτσι, η παρουσία μη ειδικών προϊόντων στην αντίδραση ενίσχυσης συνεισφέρει στο συνολικό σήμα φθορισμού επηρεάζοντας την ακρίβεια των δεδομένων. Ωστόσο, με τη μέθοδο αυτή επιτρέπεται η ανάλυση με τήξη των προϊόντων μετά το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή η ανάλυση με χρήση της καμπύλης τήξης (melt curve analysis).

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. Το SYBR Green I δεσμεύεται στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA και μπορεί να διεγερθεί στο κυανό με μήκος κύματος 480nm. Η χρωστική ελεύθερη εκπέμπει ασθενές σήμα, αλλά ο φθορισμός ενισχύεται όταν δεσμεύεται στο δίκλινο μόριο. Η ένταση του φθορισμού της δεσμευμένης χρωστικής είναι περισσότερο από 1000

φορές υψηλότερη από εκείνη της ελεύθερης. Καθώς το DNA στόχος επιμηκώνεται κατά τη διάρκεια της PCR, η χρωστική δεσμεύεται στα προϊόντα και η εκπομπή σήματος αυξάνεται. Πολλαπλά μόρια χρωστικής μπορούν να δεσμευθούν στο προϊόν, ανάλογα με το μήκος του. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία που προκύπτει από την αποδιέγερση του SYBR Green I ανιχνεύεται από κατάλληλα φίλτρα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με μια κάμερα, επιτρέποντας την άμεση παρατήρηση του φθορισμού. (Real Time PCR Applications Guide, Bio-rad) (εικ. 18).



Εικόνα 18. Μέθοδος των παρεμβαλλόμενων χρωστικών στη Real Time PCR. Ο φθορισμός αυξάνει δραματικά όταν τα μόρια του SYBR Green I συνδέονται στη διπλή έλικα του DNA (προσαρμοσμένη από Real Time PCR Applications Guide, Bio-rad).

3.7.2.1. Συνθήκες αντίδρασης

Οι αντιδράσεις ενίσχυσης των γονιδίων *β-actin*, *actin α2*, *total SMMHC*, *SM22-α* και *MLCK* πραγματοποιήθηκαν στο mini opticon Real-Time PCR σύστημα της εταιρείας Biorad. Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιούνται πλαστικές πλατφόρμες 48 θέσεων (εικ.19).

	1	2	3	4	5	6
A	Usk SM22 308	Usk SM22 309	Usk MLCK 309	Usk MLCK 309		
B	Usk SM22 310	Usk SM22 310	Usk MLCK 310	Usk MLCK 310		
C	Usk SM22 311	Usk SM22 311	Usk MLCK 311	Usk MLCK 311		
D	Usk SM22 312	Usk SM22 312	Usk MLCK 312	Usk MLCK 312		
E	NTC SM22 318	NTC SM22	NTC MLCK 318	NTC MLCK		
F						
G						
H						

Εικόνα 19. Διάταξη της πλατφόρμας των 48 θέσεων του λογισμικού προγράμματος του mini opticon της Bio-rad και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις ενίσχυσης της SM22 και της MLCK

Το υπόστρωμα των αντιδράσεων ήταν cDNA από διαφοροποιημένα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων που καλλιεργήθηκαν στις 4 συνθήκες του πρωτοκόλλου της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ 5μl cDNA (σε αραίωση 1:5),
- ✓ 10μl SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen),
- ✓ 1μl από κάθε (Sens και AS) αντίστοιχο εκκινητή (0,5Mol/ul),
- ✓ και RNAase free H₂O μέχρι τελικού όγκου 20μl.

Το SYBR Green qPCR SuperMix-UDG περιέχει SYBR Green I φθορίζουσα χρωστική, *Taq* DNA πολυμεράση, Mg⁺⁺, κατάλληλους σταθεροποιητές, το ένζυμο γλυκοσιλάση της DNA-ουρακίλης (uracil-DNA glycosylase, UDG), και dNTPs που περιέχουν ουρακίλη (dUTPs) αντί για θυμίνη (dTTPs). Η UDG απομακρύνει κατάλοιπα ουρακίλης από μονόκλινα και δίκλινα μόρια DNA. Ενεργοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και καταστρέφει τυχόν εναπομείναντα προϊόντα προηγούμενων αντιδράσεων ελαχιστοποιώντας τις διασταυρούμενες επιμολύνσεις. Απενεργοποιείται στις υψηλές θερμοκρασίες επιτρέποντας την ενίσχυση των επιλεγμένων ακολουθιών.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Βιβλιογραφική αναφορά
Actin a2 Sens	GTGTGTGACAATGGCTCTGG	(Leguillette et al., 2009)
Actin a2 AS	TTTGCTCTGTGCTTCGTCAC	(Leguillette et al., 2009)
Total SMMHC Sens	GACCAGGATCTCATCCTCCA	(Leguillette et al., 2009)
Total SMMHC AS	AGCAGCTACAGGCTGAAAGG	(Leguillette et al., 2009)
SM22 Sens	AAGAATGATGGGCACTACCG	(Leguillette et al., 2009)
SM22 AS	ATGACATGCTTCCCTCCTG	(Leguillette et al., 2009)
MLCK Sens	TCATCCAGTTCCTGAGGAC	(Leguillette et al., 2009)
MLCK AS	TTCTCGCTGTTCTCCACCTT	(Leguillette et al., 2009)
β Actin Sens	CCAACCGCGAGAAGATGA	(Tsapournioti et al., 2013)
β actin AS	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	(Tsapournioti et al., 2013)

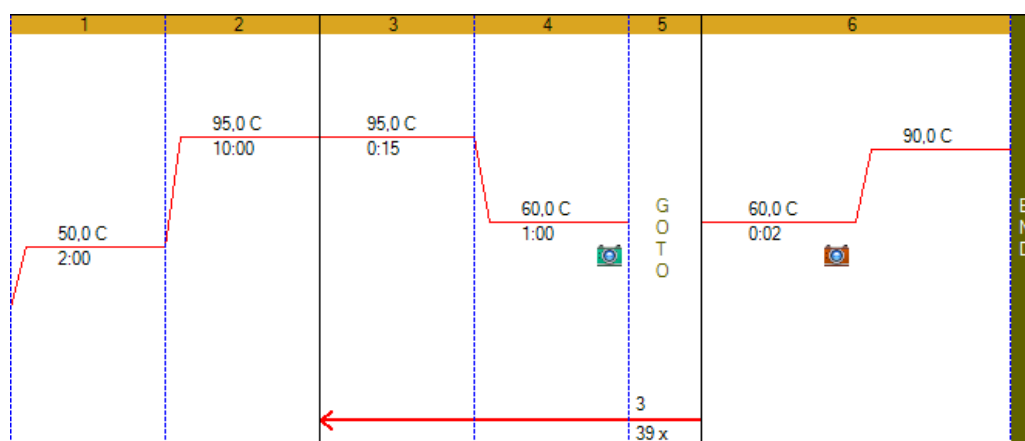
Πίνακας 2. Αλληλουχίες εκκινητών

Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις για κάθε δείγμα προκειμένου να αποφευχθούν οι συνέπειες πιθανού λανθασμένου φορτώματος. Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τιμών των δύο διαφορετικών αντιδράσεων κάθε δείγματος. Επίσης, έγινε χρήση δύο δειγμάτων αρνητικού ελέγχου. Συγκεκριμένα, σε κάθε πείραμα και για κάθε ζεύγος εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε δείγμα το οποίο προέκυψε από την αντίδραση στην οποία δεν προστέθηκε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, οπότε σε αυτό δεν έχει παραχθεί cDNA (RT-), όπως και δείγμα το οποίο, αντί για cDNA, περιείχε H₂O (No Template Control, NTC).

Οι συνθήκες των αντιδράσεων ενίσχυσης στο θερμοκυκλοποιητή, όπως φαίνεται διαγραμματικά στην εικόνα 20, ήταν:

1. 50 °C για 2 min, ενεργοποίηση της UDG
2. 95 °C για 10 min, ενεργοποίηση της *Taq* DNA πολυμεράσης
3. 95 °C για 15 sec, αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA
4. 60 °C για 1 min, σύνδεση αφετηριών και επιμήκυνση εκκινητών
5. Οι συνθήκες 3 και 4 επαναλαμβάνονται 39 φορές
6. 60 °C έως 90 °C μέχρι τερματισμού της αντίδρασης, αποδιάταξη («τήξη») των προϊόντων

Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται στο τέλος κάθε κύκλου (βήμα 4) και κατά τη διάρκεια του βήματος 6.

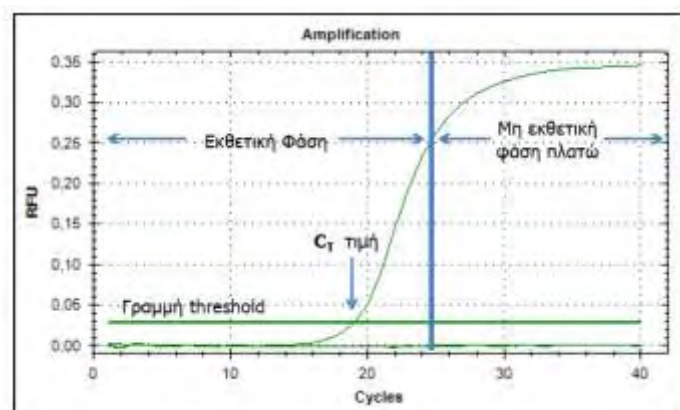


Εικόνα 20. Συνθήκες αντιδράσεων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

3.7.2.2. Διάγραμμα ενίσχυσης: threshold και C_T value, δύο χρήσιμοι όροι

Η εικόνα 21 αποτελεί ένα παράδειγμα διαγράμματος ενίσχυσης PCR. Στο διάγραμμα αυτό ο αριθμός κύκλου της PCR παρίσταται στο x άξονα και το σήμα

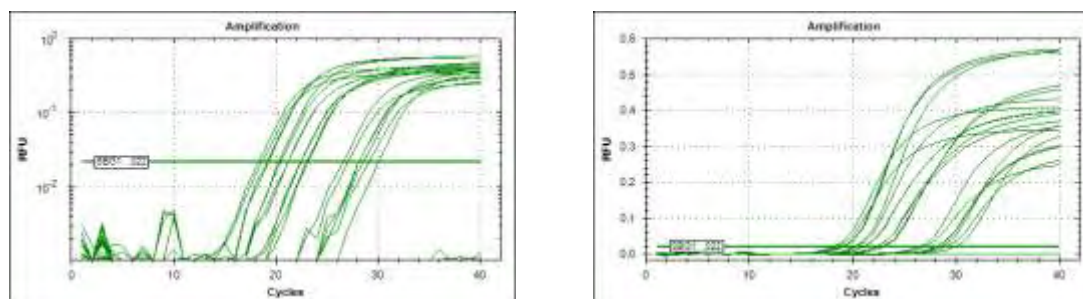
φθορισμού από την αντίδραση ενίσχυσης, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του αμπλικονίου, παρίσταται στον y άξονα.



Εικόνα 21. Παράδειγμα διαγράμματος ενίσχυσης PCR. Παρουσιάζεται η καμπύλη ενίσχυσης της *SM22* σε pool cDNA. Η τιμή C_T είναι 19.2 κύκλοι.

Το διάγραμμα ενίσχυσης παρουσιάζει δύο κύριες φάσεις, μία εκθετική και μία δεύτερη μη εκθετική φάση πλατώ. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, το ποσό του αμπλικονίου θεωρητικά διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Ωστόσο, καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, τα συστατικά της αντίδρασης καταναλώνονται, και τελικά ένα ή περισσότερα από αυτά εκλείπει. Στο σημείο αυτό, η αντίδραση επιβραδύνεται και εισέρχεται σε φάση πλατώ.

Αρχικά, το σήμα φθορισμού παραμένει σε επίπεδα φόντου και οι όποιες αυξήσεις του δεν ανιχνεύονται (κύκλοι 1-16 στην εικ. 21) παρά την εκθετική συσσώρευση του αμπλικονίου. Τελικά, παράγεται ποσότητα αμπλικονίου ικανή να δώσει ειδικό σήμα φθορισμού. Ο αριθμός κύκλου κατά τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ο **threshold cycle**, ή **C_T value** (τιμή C_T) και στο συγκεκριμένο παράδειγμα ενίσχυσης της *SM22* αντιστοιχεί στην τιμή 19.2. Πρακτικά, η τιμή C_T ορίζεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης, έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το μη ειδικό σήμα φθορισμού και στο κατώτερο σημείο που οι καμπύλες για όλα τα δείγματα είναι παράλληλες μεταξύ τους (Livak and Schmittgen, 2001) (εικ. 22).



Εικόνα 22. Προσδιορισμός του κύκλου threshold ή τιμής C_T (0.022).

Η φάση όπου βασίζεται η εφαρμογή της RT- qPCR είναι η 1η φάση, δηλαδή η εκθετική. Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ευθέως ανάλογη με την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου μόνο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης της αντίδρασης. Δεδομένου ότι η τιμή του C_T μετριέται κατά την εκθετική φάση, όπου τα συστατικά της αντίδρασης δεν είναι σε περιορισμένο αριθμό, η RT- qPCR μπορεί να υπολογίσει με ακρίβεια και αξιοπιστία την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου (Kubista et al., 2006).

Η τιμή C_T εξαρτάται από την ποσότητα αλληλουχίας στόχου στην έναρξη της αντίδρασης ενίσχυσης. Σχετικά λίγοι κύκλοι ενίσχυσης απαιτούνται για τη συσσώρευση προϊόντος ικανού να δώσει σήμα φθορισμού πάνω από του φόντου, εφόσον μεγάλη ποσότητα αλληλουχίας στόχου είναι παρούσα στην έναρξη της αντίδρασης. Έτσι, η αντίδραση θα έχει ένα χαμηλό, ή πρώιμο C_T . Αντίθετα, εάν μικρή ποσότητα αλληλουχίας στόχου είναι παρούσα στην αρχή της αντίδρασης, περισσότεροι κύκλοι ενίσχυσης θα απαιτηθούν ώστε το σήμα φθορισμού να ξεπεράσει εκείνο του φόντου. Έτσι, η αντίδραση θα έχει υψηλό, ή όψιμο C_T . Η σχέση αυτή, αρχικής ποσότητας αλληλουχίας στόχου και C_T , συνιστά τη βάση για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων της real time PCR (Wong and Medrano, 2005).

3.7.2.3. Έλεγχος βελτιστότητας αντιδράσεων ενίσχυσης

Δεδομένου ότι η ποσοτικοποίηση σε «πραγματικό χρόνο» βασίζεται στη σχέση ανάμεσα στην αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου και την τιμή C_T κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης, μια βέλτιστη αντίδραση PCR είναι απολύτως απαραίτητη για την ακριβή και επαναλήψιμη ποσοτικοποίηση του δείγματος. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα βέλτιστης αντίδρασης PCR αποτελούν:

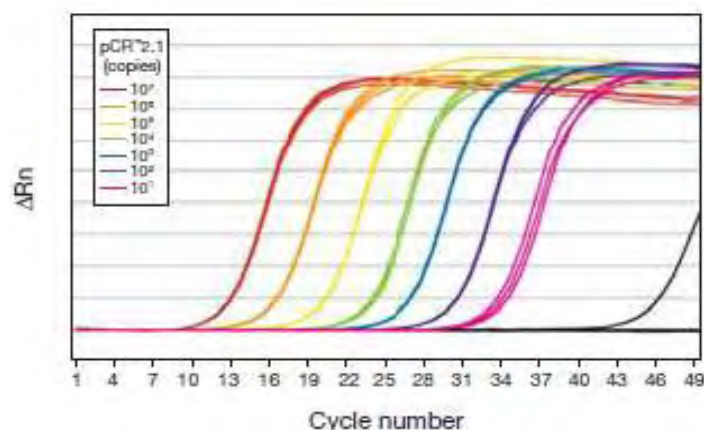
- Γραμμική πρότυπη καμπύλη ($R^2 > 0.980$ ή $r > |-0.990|$)
- Υψηλή απόδοση ενίσχυσης (Amplification efficiency, E) (90-105%)
- Σταθερότητα στις επαναληπτικές αντιδράσεις (Real Time PCR Applications Guide, Bio-rad)

Η ανάλυση των παραγόντων βελτιστότητας των αντιδράσεων PCR έγινε με χρήση του λογισμικού προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad CFX Manager Version 1.5.

3.7.2.3.1. Πρότυπη καμπύλη (Standard Curve)

Ένας αποτελεσματικός τρόπος ελέγχου της βελτιστότητας της PCR αποτελεί η διενέργεια αντιδράσεων σειριακών αραιώσεων αρχικής ποσότητας δείγματος στόχου και η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων στη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Το δείγμα στόχος για το σκοπό αυτό μπορεί να είναι γνωστής συγκέντρωσης (π.χ. νανογραμμάρια γενωμικού DNA ή αντίγραφα πλασμιδιακού DNA) ή δείγμα άγνωστης ποσότητας (π.χ. cDNA). Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται αλληλουχίζοντας το λογάριθμο της αρχικής ποσότητας του δείγματος στόχου, ή του συντελεστή αραιώσης για άγνωστες ποσότητες, με την τιμή C_T της αντίδρασης για κάθε αραιώση. Η εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης μαζί με το συντελεστή συσχέτισης (R^2) όπως και την απόδοση ενίσχυσης της αντίδρασης (E) χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση της βελτιστότητας της αντίδρασης qPCR (Real Time PCR Applications Guide, Bio-rad).

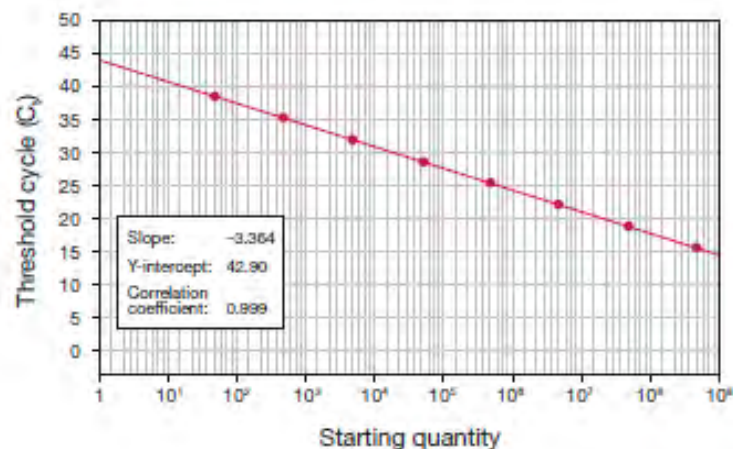
Οι διαδοχικές αραιώσεις αρχικού δείγματος σε ιδανικές συνθήκες παράγουν καμπύλες ενίσχυσης με όμοια μεσοδιαστήματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23. Διάγραμμα ενίσχυσης PCR για σειριακές 10πλάσιες αραιώσεις αρχικού δείγματος στόχου. Ο αριθμός κύκλου στον οποίο λαμβάνεται σημαντικό σήμα φθορισμού (τιμή C_T) αυξάνεται καθώς μειώνεται η αρχική ποσότητα υποστρώματος της αντίδρασης (από Real-Time PCR: from theory to practice-Invitrogen)

Τα μεσοδιαστήματα των καμπυλών ενίσχυσης καθορίζονται από την εξίσωση $2^n = \text{συντελεστής αραιώσης}$, όπου n είναι η διαφορά των κύκλων μεταξύ των καμπυλών ενίσχυσης (με άλλα λόγια η διαφορά των τιμών C_T), εφόσον επιτυγχάνεται διπλασιασμός του αμπλικονίου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης PCR. Για παράδειγμα, για δεκαπλάσια αραιώση της αρχικού δείγματος DNA, $2^n=10$. Έτσι, $n=3.32$ και οι τιμές C_T διαδοχικών καμπυλών θα πρέπει να έχουν διαφορά 3.32 κύκλων. Όμοια μεσοδιαστήματα μεταξύ των καμπυλών ενίσχυσης αποδίδουν γραμμική πρότυπη

καμπύλη της αντίδρασης PCR (Real Time PCR Applications Guide, Bio-rad (εικόνα 24)).



Εικόνα 24. Παράδειγμα ιδανικής καμπύλης αναφοράς. Η ιδανική τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R^2 , correlation coefficient) είναι 1. Πρακτικά τιμή $R^2=0.999$ είναι η μέγιστη που παρατηρείται (από Real-Time PCR: from theory to practice-Invitrogen).

3.7.2.3.2. Απόδοση ενίσχυσης E

Η απόδοση ενίσχυσης της αντίδρασης PCR υπολογίζεται από την κλίση (slope) της πρότυπης καμπύλης με βάση τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο:

$$E=10^{-1/\text{slope}}$$

Σε ιδανικές συνθήκες, η ποσότητα του αμπλικονίου θα διπλασιαστεί μετά από κάθε κύκλο της εκθετικής φάσης, δηλαδή θα παρατηρηθεί διπλάσια αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μετά από κάθε κύκλο. Το γεγονός αυτό μεταφράζεται σε μια απόδοση της αντίδρασης ίση με 2. Αντικαθιστώντας τη βέλτιστη E στην προαναφερθείσα εξίσωση, $2=10^{-1/\text{slope}}$, προκύπτει ότι η βέλτιστη κλίση της πρότυπης καμπύλης είναι ίση με -3.32. Η απόλυτη αυτή τιμή είναι πανομοιότυπη με το μεσοδιάστημα των 3.32 κύκλων των καμπυλών του διαγράμματος ενίσχυσης της PCR που παρατηρείται σε ιδανικές συνθήκες.

Αποδόσεις ενίσχυσης $E >100\%$ υποδεικνύουν πιθανά τεχνικά λάθη κατά τις σειριακές αραιώσεις (πραγματικός συντελεστής αραιώσης μικρότερος του 2), ή κατά το φόρτωμα των δειγμάτων, όπως και πιθανή συνενίσχυση μη ειδικών προϊόντων, για παράδειγμα διμερών των εκκινητών, αλληλουχιών μη στόχων (mispriming), ή μη εξαλειφθέντος γενωμικού DNA. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος των σειριακών αραιώσεων, η παρουσία αναστολέων μπορεί να επιφέρει εμφανή αύξηση της E. Αυτό συμβαίνει διότι δείγματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αναστολέων, με αποτέλεσμα μια όψιμη τιμή C_T , ενώ δείγματα με

μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος στόχου περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα αναστολέων, με αποτέλεσμα λιγότερο όσημη τιμή C_T . Τελικά, η απόλυτη τιμή της κλίσης της αντίδρασης μειώνεται και η απόδοση ενίσχυσης της αντίδρασης εμφανίζεται αυξημένη. Αν και μια απόδοση ενίσχυσης κοντά στο 100% είναι ο καλύτερος δείκτης μιας αξιόπιστης και επαναλήψιμης αντίδρασης PCR, τιμές απόδοσης 90-105% είναι αυτές που κατά το βέλτιστο μπορούν να επιτευχθούν στην πράξη. Τιμές απόδοσης μεγαλύτερες του 105% είναι ενδεικτικές λανθασμένου σχεδιασμού των εκκινήτων, ενώ τιμές μικρότερες του 90% υποδεικνύουν επίσης πιθανό λανθασμένο σχεδιασμό των εκκινήτων ή/και υπολειμματικές συνθήκες αντίδρασης (συγκέντρωση της χρωστικής, των εκκινήτων και του $MgCl_2$, θερμοκρασίες και χρόνοι βημάτων αντίδρασης) (Real Time PCR Applications Guide, Bio-rad).

3.7.2.4. Ανάλυση καμπύλης τήξης (melt curve analysis)

Ο ποιοτικός έλεγχος των προϊόντων στο τέλος του πειράματος είναι εφικτός μέσω της ανάλυσης της καμπύλης τήξης. Κατά τη διάρκεια της καμπύλης τήξης μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται, καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης αποδιατάσσονται θερμαινόμενα από θερμοκρασία χαμηλότερη του σημείου τήξης τους (T_m) μέχρι θερμοκρασίας μεγαλύτερης του T_m τους. Το θερμοκρασιακό εύρος το θέτει ο ερευνητής (60→90°C στην παρούσα μελέτη, βλ. εικ) και εξαρτάται κυρίως από το μήκος και το περιεχόμενο των προϊόντων σε γουανίνη και κυτοσίνη (G/C). Καθώς το δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης ενίσχυσης αποδιατάσσεται («τήκεται»), το σήμα φθορισμού μειώνεται. Μία χαρακτηριστική κορυφή στη θερμοκρασία τήξης (T_m , η θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί), το διακρίνει από άλλα μη ειδικά προϊόντα που «τήκονται» σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην καμπύλη τήξης αντιστοιχούν στα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί και είναι ανάλογες των ζωνών στην απλή ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

3.7.2.5. Ποσοτικοποίηση έκφρασης mRNA

Με την τεχνική της Real Time PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό.

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τις αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς το οποίο είναι κοινό για όλα τα δείγματα. Ένα από τα δείγματα, συνήθως αυτό που δεν έχει υποστεί κατεργασία, επιλέγεται ως δείγμα αναφοράς (calibrator sample) και η έκφραση του γονιδίου στόχου εκφράζεται ως αύξηση ή μείωση σε σχέση με το δείγμα αυτό. Έτσι, για τη σχετική ποσοτικοποίηση ενός γονιδίου στόχου είναι απαραίτητο να καθοριστούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου, όπως και του γονιδίου αναφοράς τόσο στο δείγμα ελέγχου όσο και στο δείγμα αναφοράς. Πρέπει δηλαδή να καθοριστούν οι τιμές C_T των γονιδίων αυτών.

Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου έχουν εφαρμοσθεί δυο μαθηματικά μοντέλα: α) η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001) και β) το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl.

Στην παρούσα μελέτη η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Η μέθοδος αυτή, που έχει και την πιο ευρεία χρήση, είναι κατάλληλη για αντιδράσεις με παρεμφερή τιμή απόδοσης (efficiency, E), καθώς δεν περιλαμβάνει εξομάλυνση των αποδόσεων. Προϋποθέτει ότι τόσο το γονίδιο στόχος όσο και το γονίδιο αναφοράς ενισχύονται με αποδόσεις ενίσχυσης κοντά στο 100% και με εύρος διαφοράς μικρότερο του 5%. Οι λόγοι έκφρασης (R, Ratio) υπολογίζονται από την εξίσωση:

$$R = 2^{-(\Delta C_T \text{ ελέγχου} - \Delta C_T \text{ αναφοράς})}$$

Αφού πρώτα εξασφαλίστηκε ότι οι αντιδράσεις ενίσχυσης για τα γονίδια στόχους και το γονίδιο αναφοράς έχουν παρεμφερή απόδοση και κοντά στο 100%, υπολογίστηκε η σχετική διαφορά έκφρασης των γονιδίων στόχων στις 4 συνθήκες της παρούσας μελέτης ακολουθώντας τα ακόλουθα βήματα:

Αρχικά, γίνεται κανονικοποίηση της τιμής C_T του γονιδίου στόχου με εκείνη του γονιδίου αναφοράς, τόσο για το δείγμα ελέγχου όσο και για το δείγμα αναφοράς.

$$\Delta C_{T(\text{ελέγχου})} = C_{T(\text{γονιδίου στόχου, δείγματος ελέγχου})} - C_{T(\text{γονιδίου αναφοράς, δείγματος ελέγχου})}$$

$$\Delta C_{T(\text{αναφοράς})} = C_{T(\text{γονιδίου στόχου, δείγματος αναφοράς})} - C_{T(\text{γονιδίου αναφοράς, δείγματος αναφοράς})}$$

Κατόπιν, γίνεται κανονικοποίηση της ΔC_T ελέγχου με τη ΔC_T αναφοράς:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{ελέγχου})} - \Delta C_{T(\text{αναφοράς})}$$

Τελικά, γίνεται υπολογισμός του λόγου έκφρασης:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{κανονικοποιημένος λόγος έκφρασης}$$

Το αποτέλεσμα εκφράζει πόσες φορές αυξάνεται ή μειώνεται η έκφραση mRNA του γονιδίου στόχου στο δείγμα ελέγχου σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Το αποτέλεσμα αυτό είναι κανονικοποιημένο ως προς την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς, γεγονός που ομαλοποιεί το σφάλμα που οφείλεται στις διαφορές των συγκεντρώσεων mRNA μεταξύ των δειγμάτων.

3.7.2.6. Επιλογή κατάλληλου ενδογενούς γονιδίου ελέγχου

Προκειμένου η εξίσωση $\Delta\Delta C_T$ να είναι ακριβής είναι απαραίτητη η χρήση ενός κατάλληλου ενδογενούς γονιδίου, το οποίο πρέπει να τηρεί κάποιες προϋποθέσεις. Καταρχάς, το γονίδιο αυτό θα πρέπει να παρουσιάζει σταθερή και συνεχή έκφραση σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα και στο δείγμα αναφοράς. Επιπλέον, καλό είναι το ενδογενές γονίδιο να παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά του γονιδίου-στόχου. Ακόμη, δεν πρέπει να επηρεάζεται από τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες, καθώς θετική ή αρνητική ρύθμισή του οδηγεί σε λανθασμένη κανονικοποίηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Τα γονίδια τα οποία συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες (housekeeping genes) θεωρείται ότι εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (π.χ. β-ακτίνη, τουμπουλίνη), πρωτεΐνες-στοιχεία του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (π.χ. β-μικροσφαιρίνη), ένζυμα της γλυκολυτικής οδού (π.χ. αφυδρογονάση της 3 φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, GAPDH) και ριβοσωμικό RNA (18S rRNA και 28S rRNA). Αν και τα γονίδια αυτά θεωρείται ότι εκπληρώνουν τις απαραίτητες συνθήκες για την χρήση τους ως γονιδίων-ελέγχου, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα λόγω πειραματικών χειρισμών, η έκφρασή τους μεταβάλλεται.

Η αξιολόγηση της έκφρασης των υποψήφιων για χρήση ενδογενών γονιδίων-ελέγχου στα ανθρώπινα ΛΜΚ αεραγωγών και στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες έγινε στα πλαίσια άλλης ερευνητικής μελέτης του εργαστηρίου. Η β-ακτίνη θεωρήθηκε κατάλληλο γονίδιο-αναφοράς.

3.7.2.7. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Sigmaplot 12.0 (Systat). Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ 2 ομάδων δεδομένων υπολογίσθηκαν με το στατιστικό κριτήριο t. Η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

3.8. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα αρχικά υπόκεινται, μέσω κατάλληλης κατεργασίας, σε μονιμοποίηση και διαπερατοποίηση. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη αφενός μεν για να μονιμοποιηθεί η εσωτερική οργάνωση των κυττάρων και να σταθεροποιηθούν οι τυχόν δομές οι οποίες σχηματίζουν ή οργανώνουν ή στις οποίες συμμετέχουν οι προς παρατήρηση πρωτεΐνες, αφετέρου δε για να γίνουν οι κυτταρικές μεμβράνες διαπερατές για τα αντίστοιχα αντισώματα. Οι πρωτεΐνες αναγνωρίζονται στα κύτταρα από τα αντίστοιχα αντισώματα. Αυτά ακολούθως αναγνωρίζονται από αντίστοιχα δεύτερα αντισώματα προσημασμένα με κάποια φθορίζουσα ουσία. Το σύμπλοκο πλέον πρωτεΐνη-αντίσωμα—δευτερογενές αντίσωμα-φθορίζουσα ουσία, μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στο υπεριώδες, εκπέμπει μέσω της φθορίζουσας ουσίας σε άλλο μήκος κύματος, στο ορατό. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτός ο εντοπισμός των θέσεων των πρωτεϊνών στα κύτταρα (εικ. 25).



Εικόνα 25. Εντοπισμός πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό [προσαρμοσμένη από *Molecular Biology of the Cell 5/e* (© Garland Science 2008)].

Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία στα οποία έχουν τοποθετηθεί αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm. Τα κύτταρα προσκολλώνται στις καλυπτρίδες και επωάζονται στις κατάλληλες συνθήκες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και οι καλυπτρίδες εκπλένονται με διάλυμα PBS 1x. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα PBS1x-φορμαλδεΰδη 3% σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Αφού αφαιρεθεί το διάλυμα φορμαλδεΰδης και γίνει νέα έκπλυση με PBS 1x, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα PBS 1x -Triton X-100 1% στους 4°C για 15 λεπτά, έτσι ώστε οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές. Έπειτα, γίνεται επώαση με διάλυμα κορεσμού (blocking) PBS 1x-Tween 20 0,1% -BSA 3% στους 4°C για 1 ώρα με στόχο τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων στις οποίες θα μπορούσε να συνδεθεί το αντίσωμα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα, σε κατάλληλη αραιώση διαλύματος PBS 1x-Tween 20 0,1% -BSA 1%, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, αφού πρώτα μεταφερθούν σε πιάτο 24 θέσεων και υγρό περιβάλλον. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις με διάλυμα PBS 1x-Tween 20 0,1%-BSA 1%. Κατόπιν, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία, σε κατάλληλη αραιώση διαλύματος PBS 1x-Tween 20 0,1%-BSA 1% και οι καλυπτρίδες επωάζονται προστατευμένες από το φως σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Τα κύτταρα εκπλένονται και πάλι 3 φορές από 5 λεπτά με διάλυμα PBS 1x-Tween 20 0,1%-BSA 1%. Ακολουθεί τοποθέτηση της κάθε καλυπτρίδας σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε 2μl vectashield (Vector Laboratories), το οποίο περιέχει χρωστική DAPI (20μg/ml) για χρώση των πυρήνων των κυττάρων, με τέτοιο τρόπο ώστε ανάμεσα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και την καλυπτρίδα να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Τέλος, οι καλυπτρίδες σφραγίζονται περιμετρικά με διάφανο βερνίκι και τα παρασκευάσματα μπορούν να μεταφερθούν στους -20°C για μετέπειτα χρήση ή να παρατηρηθούν άμεσα στο μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA). Η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων έγινε με ειδική ψηφιακή φωτογραφική κάμερα (Leica DFC 480, Leica cameras, Solms, Germany).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών και οι αραιώσεις τους παρατίθενται στον πίνακα 3.

Πρώτο αντίσωμα	αραίωση	Δεύτερο αντίσωμα	αραίωση	Πρωτεΐνη που ανιχνεύεται
Mouse anti-myosin (SIGMA)	1:50	Anti-mouse IgG– συζευγμένο με CY3	1:100	Βαρεία αλυσίδα μυοσίνης λείου μύος (SM-1 και SM-2)
Mouse anti-Phospho-Myosin Light Chain 2 (Ser19) (Cell Signaling)	1:50	Anti-mouse IgG– συζευγμένο με CY3	1:100	Φωσφορυλιωμένη ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης λείου μύος
Mouse anti-α Smooth muscle actin (SIGMA)	1:50	Anti-mouse IgG– συζευγμένο με CY3	1:100	α-ακτίνη λείου μύος

Πίνακας 3. Αντισώματα έμμεσου ανοσοφθορισμού

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης mRNA πρωτεϊνών συστολής των λείων μυϊκών κυττάρων με RT-qPCR

Διαφοροποιημένα ΛΜΚ αεραγωγών επώαστηκαν για 24 ώρες υπό την επίδραση TNF- α , υποξίας ή του συνδυασμού τους. Από τα εκχυλίσματα των κυττάρων έγινε απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για να προσδιοριστεί με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου η επίδραση των παραπάνω συνθηκών στην έκφραση του mRNA των πρωτεϊνών συστολής.

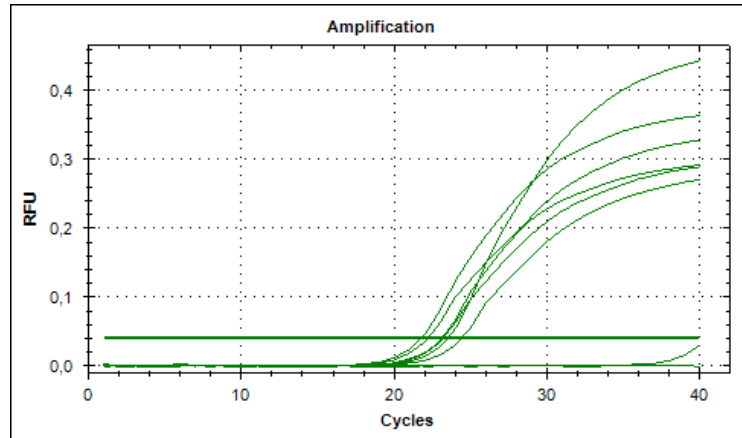
4.1.1. Πρότυπες καμπύλες και έλεγχος της απόδοσης ενίσχυσης E των αντιδράσεων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για την έκφραση των mRNA των πρωτεϊνών συστολής των ΛΜΚ αεραγωγών

Στο ξεκίνημα των πειραμάτων ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης των παραγόντων φλεγμονής της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απόδοσης των αντιδράσεων PCR με καθένα από τα ζεύγη εκκινητών.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (1:1, 1:2 και 1:4) pool cDNA που προέκυψε από την ανάστροφη μεταγραφή μείγματος RNA από κύτταρα που επώαστηκαν στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Η κάθε συγκέντρωση ελέγχθηκε εις διπλούν. Σε κάθε περίπτωση ελέγχθηκαν η γραμμικότητα και η κλίση της πρότυπης καμπύλης, όπως και η απόδοση της αντίδρασης E.

4.1.1.1. Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της $\alpha 2$ ακτίνης

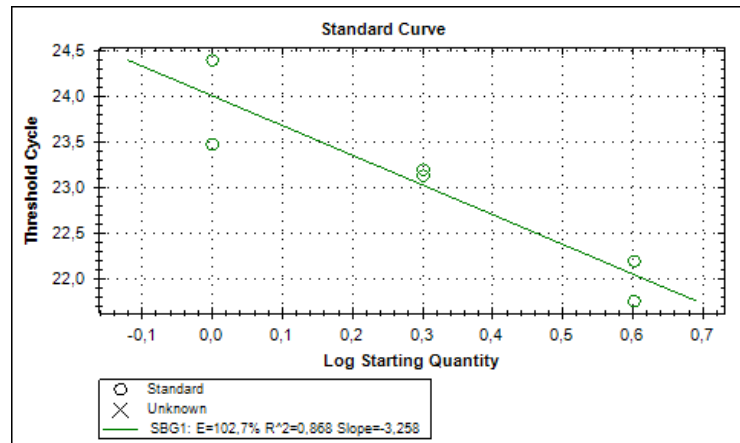
Στην εικόνα 26, τον πίνακα 4 και την εικόνα 27 παρουσιάζονται αντίστοιχα το διάγραμμα ενίσχυσης, οι τιμές C_T και η πρότυπη καμπύλη με σημειούμενες τις τιμές E, R^2 και κλίσης για το γονίδιο της $\alpha 2$ ακτίνης.



Εικόνα 26. Διάγραμμα ενίσχυσης της α2 ακτίνης

Γονίδιο	Δείγμα	Συγκέντρωση δείγματος cDNA	Τιμή Ct
α2 ακτίνη	std	0.25x	24,32
α2 ακτίνη	std	0.25x	23,40
α2 ακτίνη	std	0.5x	23,06
α2 ακτίνη	std	0.5x	23,13
α2 ακτίνη	std	1.0x	21,66
α2 ακτίνη	std	1.0x	22,12
α2 ακτίνη	NRT		N/A
α2 ακτίνη	NTC		N/A

Πίνακας 4. Οι τιμές C_T των αντιδράσεων ενίσχυσης για την α2 ακτίνη σε καθένα από τα εις διπλούν δείγματα στόχου.



Εικόνα 27. Πρότυπη καμπύλη της α2 ακτίνης. Απόδοση ενίσχυσης $E=102.7\%$, Συντελεστής συσχέτισης $R^2=0.868$, Κλίση καμπύλης $=-3.258$.

Η κλίση της πρότυπης καμπύλης της α2 ακτίνης είναι -3.258 και η απόδοση ενίσχυσης E όπως προκύπτει από αυτήν είναι:

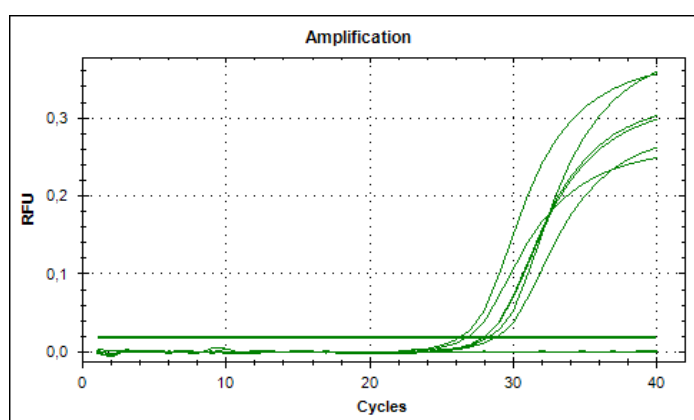
$$E = 10^{-(1/-3.258)} = 2.027$$

$$\text{ή } \% E = (2.027-1) \times 100 = 102.7\%,$$

που σημαίνει ότι ο αριθμός αντιγράφων του αμπλικονίου αυξήθηκε κατά 2.027 φορές, ή 102,7% του υποστρώματος αντιγράφηκε, στο τέλος κάθε κύκλου της PCR κατά την εκθετική φάση ενίσχυσης της αντίδρασης.

4.1.1.2. Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της *SMMHC*

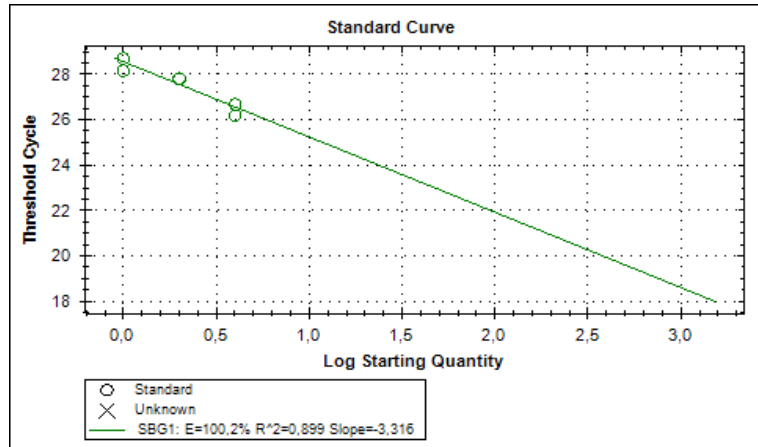
Στην εικόνα 28, τον πίνακα 5 και την εικόνα 29 παρουσιάζονται αντίστοιχα το διάγραμμα ενίσχυσης, οι τιμές C_T και η πρότυπη καμπύλη με σημειούμενες τις τιμές E, R^2 και κλίσης για την *SMMHC*.



Εικόνα 28. Διάγραμμα ενίσχυσης της *SMMHC*.

Γονίδιο	Δείγμα	Συγκέντρωση δείγματος cDNA	Τιμή Ct
SMMHC	std	0.25x	28,69
SMMHC	std	0.25x	28,16
SMMHC	std	0.5x	27,81
SMMHC	std	0.5x	27,79
SMMHC	std	1.0x	26,67
SMMHC	std	1.0x	26,19
SMMHC	NRT		N/A
SMMHC	NTC		N/A

Πίνακας 5. Οι τιμές C_T των αντιδράσεων ενίσχυσης για την *SMMHC* σε καθένα από τα εις διπλούν δείγματα στόχου.



Εικόνα 29. Πρότυπη καμπύλη της *SMMHC*. Απόδοση ενίσχυσης E=100.2%, Συντελεστής συσχέτισης R²=0.899, Κλίση καμπύλης = -3.316.

Η κλίση της πρότυπης καμπύλης της *SMMHC* είναι -3.316 και η απόδοση ενίσχυσης E όπως προκύπτει από αυτήν είναι:

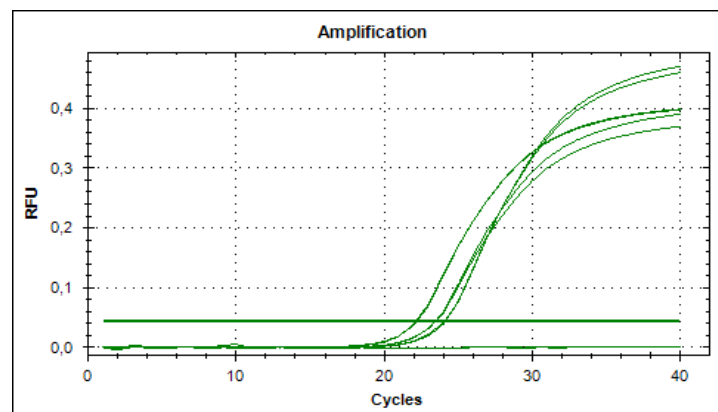
$$E = 10^{-(1/-3.316)} = 2.002$$

$$\text{ή } \% E = (2.002 - 1) \times 100 = 100.2\%$$

που σημαίνει ότι ο αριθμός αντιγράφων του αμπλικονίου αυξήθηκε κατά 2.002 φορές, ή 100,2% του υποστρώματος αντιγράφηκε, στο τέλος κάθε κύκλου της PCR κατά την εκθετική φάση ενίσχυσης της αντίδρασης.

4.1.1.3. Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της *MLCK*

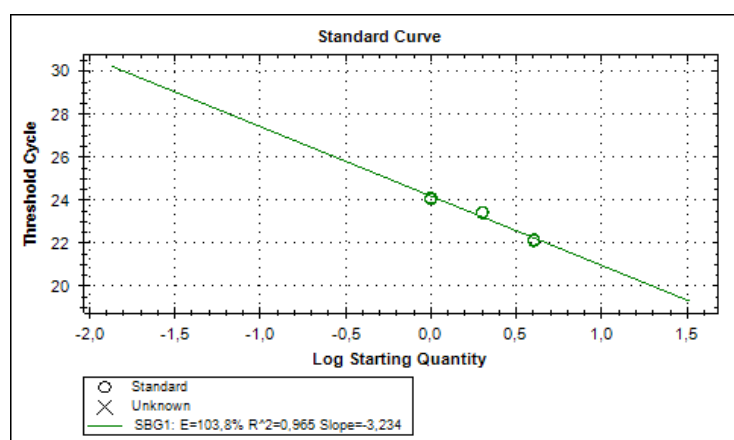
Στην εικόνα 30, τον πίνακα 6 και την εικόνα 31 παρουσιάζονται αντίστοιχα το διάγραμμα ενίσχυσης, οι τιμές C_T και η πρότυπη καμπύλη με σημειούμενες τις τιμές E, R² και κλίσης για την *MLCK*.



Εικόνα 30. Διάγραμμα ενίσχυσης της *MLCK*

Γονίδιο	Δείγμα	Συγκέντρωση δείγματος cDNA	Τιμή Ct
MLCK	std	0.25x	24,12
MLCK	std	0.25x	24,05
MLCK	std	0.5x	23,45
MLCK	std	0.5x	23,41
MLCK	std	1.0x	22,11
MLCK	std	1.0x	22,17
MLCK	NRT		N/A
MLCK	NTC		N/A

Πίνακας 6. Οι τιμές C_T των αντιδράσεων ενίσχυσης για την *MLCK* σε καθένα από τα εις διπλούν δείγματα στόχου.



Εικόνα 31. Πρότυπη καμπύλη της *MLCK*. Απόδοση ενίσχυσης $E=103.8\%$, Συντελεστής συσχέτισης $R^2=0.965$, Κλίση καμπύλης = -3.234 .

Η κλίση της πρότυπης καμπύλης της *MLCK* είναι -3.234 και η απόδοση ενίσχυσης E όπως προκύπτει από αυτήν είναι:

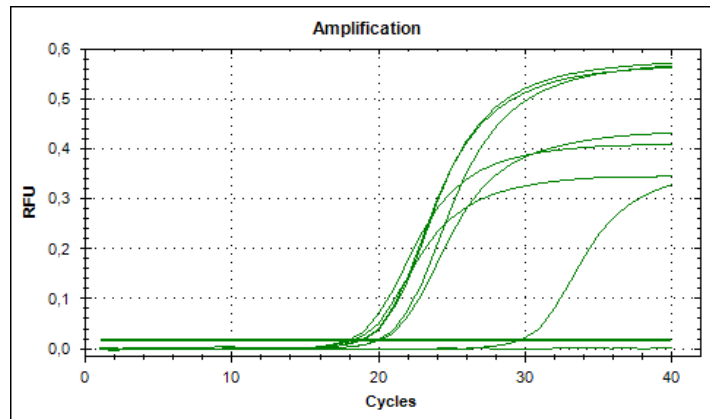
$$E = 10^{-(1/-3.234)} = 2.038$$

$$\text{ή } \% E = (2.038-1) \times 100 = 103.8\%$$

που σημαίνει ότι ο αριθμός αντιγράφων του αμπλικονίου αυξήθηκε κατά 2.038 φορές, ή 103.8% του υποστρώματος αντιγράφηκε, στο τέλος κάθε κύκλου της PCR κατά την εκθετική φάση ενίσχυσης της αντίδρασης.

4.1.1.4. Πρότυπη καμπύλη και απόδοση ενίσχυσης E των αντιδράσεων προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA της *SM22*

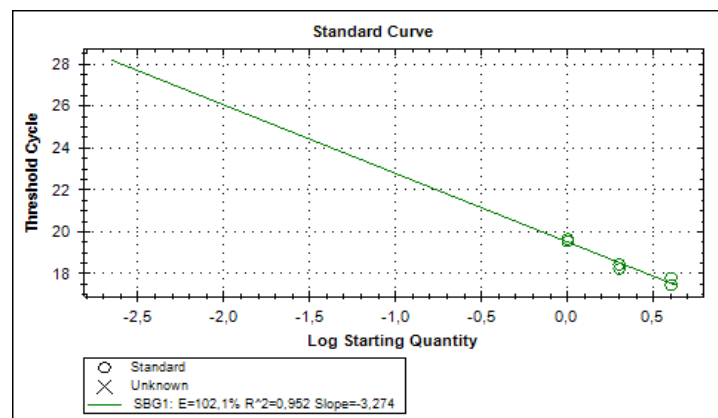
Στην εικόνα 32, τον πίνακα 7 και την εικόνα 33 παρουσιάζονται αντίστοιχα το διάγραμμα ενίσχυσης, οι τιμές C_T και η πρότυπη καμπύλη με σημειούμενες τις τιμές E , R^2 και κλίσης για την *SM22*.



Εικόνα 32. Διάγραμμα ενίσχυσης της SM22.

Γονίδιο	Δείγμα	Συγκέντρωση δείγματος cDNA	Τιμή Ct
SM22	std	0.25x	19,55
SM22	std	0.25x	19,65
SM22	std	0.5x	18,44
SM22	std	0.5x	18,23
SM22	std	1.0x	17,81
SM22	std	1.0x	17,45
SM22	NRT		N/A
SM22	NTC		29,23

Πίνακας 7. Οι τιμές C_T των αντιδράσεων ενίσχυσης για την SM22 σε καθένα από τα εις διπλούν δείγματα στόχου.



Εικόνα 33. Πρότυπη καμπύλη της SM22. Απόδοση ενίσχυσης $E=102.1\%$, Συντελεστής συσχέτισης $R^2=0.952$, Κλίση καμπύλης = -3.274.

Η κλίση της πρότυπης καμπύλης της SM22 είναι -3.274 και η απόδοση ενίσχυσης E όπως προκύπτει από αυτήν είναι:

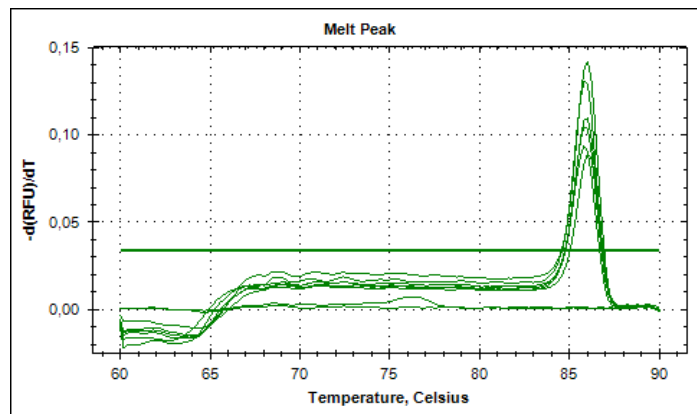
$$E = 10^{-(1/-3.274)} = 2.021$$

$$\eta \quad \% E = (2.021-1) \times 100 = 102.1\%$$

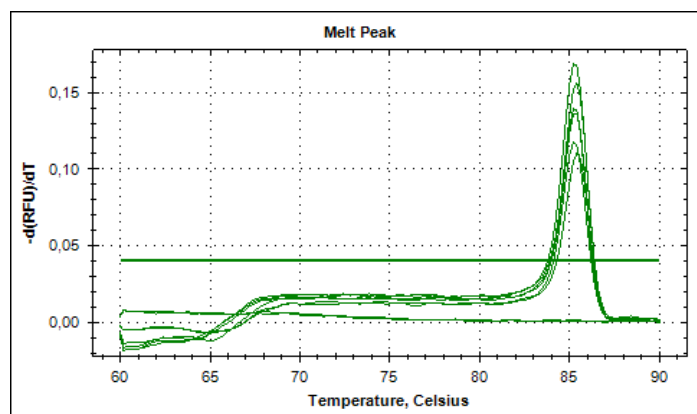
που σημαίνει ότι ο αριθμός αντιγράφων του αμπλικονίου αυξήθηκε κατά 2.021 φορές, ή 102.1% του υποστρώματος αντιγράφηκε, στο τέλος κάθε κύκλου της PCR κατά την εκθετική φάση ενίσχυσης της αντίδρασης.

4.1.2. Καμπύλες Τήξης

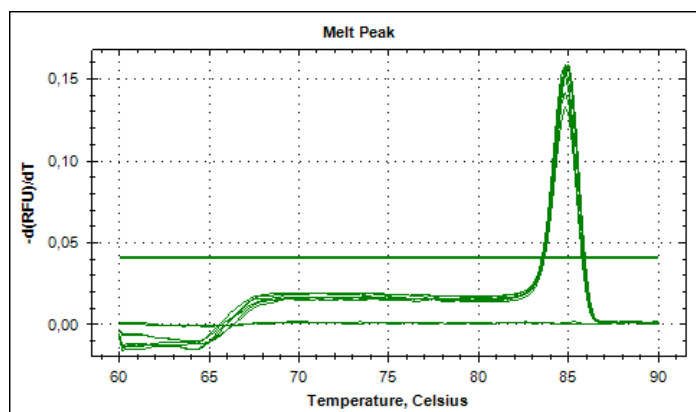
Στις εικόνες 34 έως 37 παρουσιάζονται αντίστοιχα οι καμπύλες τήξης των αντιδράσεων ελέγχου της απόδοσης ενίσχυσης E των γονιδίων *a2 ακτίνης*, *SMMHC*, *MLCK* και *SM22*. Η ύπαρξη μίας κορυφής (T_m) σε κάθε καμπύλη μαρτυρά την ενίσχυση ειδικού προϊόντος.



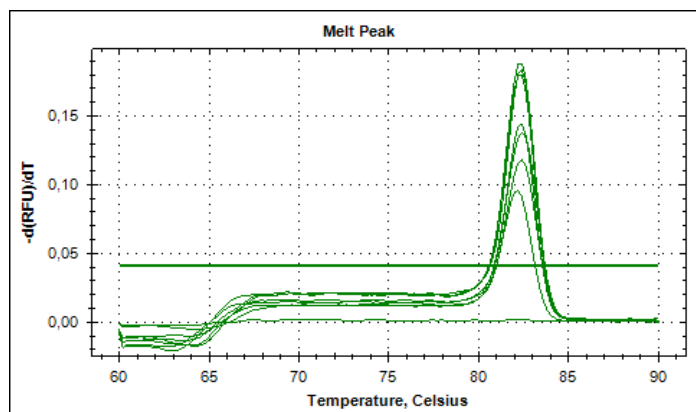
Εικόνα 34. Καμπύλες τήξης των αντιδράσεων ενίσχυσης της *a2 ακτίνης* για τον προσδιορισμό της απόδοσης E



Εικόνα 35. Καμπύλες τήξης των αντιδράσεων ενίσχυσης της *SMMHC* για τον προσδιορισμό της απόδοσης E



Εικόνα 36. Καμπύλες τήξης των αντιδράσεων ενίσχυσης της *MLCK* για τον προσδιορισμό της απόδοσης E



Εικόνα 37. Καμπύλες τήξης των αντιδράσεων ενίσχυσης της *SM22* για τον προσδιορισμό της απόδοσης E

4.1.3. Ποσοτικοποίηση έκφρασης mRNA πρωτεϊνών συστολής

Τα γονίδια *SMMHC*, *Actin a2*, *MLCK* και *SM22* ενισχύθηκαν με RT-qPCR σε δείγματα cDNA των 4 συνθηκών της παρούσας μελέτης. Επίσης, το γονίδιο αναφοράς *β-actin* ενισχύθηκε στα ίδια δείγματα. Η ενίσχυση των γονιδίων στόχων και αναφοράς έγινε εις διπλούν για κάθε δείγμα και για τον υπολογισμό των λόγων έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών C_T .

4.1.3.1. Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της *SMMHC*

Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *SMMHC*, η μέση τιμή C_T κανονικοποιήθηκε ως προς τη μέση τιμή C_T του γονιδίου αναφοράς τόσο στο

δείγμα ελέγχου όσο και στο δείγμα αναφοράς για κάθε πειραματική συνθήκη. Στους πίνακες 8, 9 και 10 παρουσιάζονται οι λόγοι έκφρασης της *SMMHC* για κάθε πειραματική συνθήκη 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Δείγμα	C _T <i>SMMHC</i>	C _T β-actin	ΔC _T (ελέγχου)	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}
control	28,61	15,61	13	-0,47	1,385109
control	29	15,06	13,94	0,47	0,721965
MO	28,805	15,335	13,47	0	1
TNF-α	23,58	14,24	9,34	-4,13	17,5087
TNF-α	23,23	14,6	8,63	-4,84	28,6408
MO	23,405	14,42	8,985	-4,485	22,39337
Υποξία	28,5	15,1	13,4	-0,07	1,049717
Υποξία	28,97	15,01	13,96	0,49	0,712025
MO	28,735	15,055	13,68	0,21	0,864537
TNF-α + Υποξία	23,18	13,83	9,35	-4,12	17,38776
TNF-α + Υποξία	23,67	13,62	10,05	-3,42	10,70342
MO	23,425	13,725	9,7	-3,77	13,64216

Πίνακας 8. Λόγοι έκφρασης της *SMMHC* σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF-α, υποξίας και συνδυασμού TNF-α και υποξίας (Πείραμα 1). MO = μέσος όρος.

Δείγμα	C _T <i>SMMHC</i>	C _T β-actin	ΔC _T (ελέγχου)	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}
control	25,87	14,18	11,69	-0,02	1,013959
control	25,99	14,26	11,73	0,02	0,986233
MO	25,93	14,22	11,71	0	1
TNF-α	20,84	13,42	7,42	-4,29	19,56224
TNF-α	20,72	13,08	7,64	-4,07	16,79547
MO	20,78	13,25	7,53	-4,18	18,12614
Υποξία	27,17	13,43	13,74	2,03	0,244855
Υποξία	27,11	13,72	13,39	1,68	0,312083
MO	27,14	13,575	13,565	1,855	0,276433
TNF-α + Υποξία	21,19	13,47	7,72	-3,99	15,88948
TNF-α + Υποξία	21,3	13,67	7,63	-4,08	16,91229
MO	21,245	13,57	7,675	-4,035	16,39291

Πίνακας 9. Λόγοι έκφρασης της *SMMHC* σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF-α, υποξίας και συνδυασμού TNF-α και υποξίας (Πείραμα 2). MO = μέσος όρος.

Δείγμα	C _T <i>SMMHC</i>	C _T β-actin	ΔC _T (ελέγχου)	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}
control	26,79	15,01	11,78	-0,19	1,140764
control	26,56	14,4	12,16	0,19	0,876606
MO	26,675	14,705	11,97	0	1
TNF-α	22	13,4	8,6	-3,37	10,33882
TNF-α	21,79	13,45	8,34	-3,63	12,38052
MO	21,895	13,425	8,47	-3,5	11,31371
Υποξία	26,89	15,23	11,66	-0,31	1,239708
Υποξία	26,99	14,72	12,27	0,3	0,812252
MO	26,94	14,975	11,965	-0,005	1,003472
TNF-α + Υποξία	23,2	14,13	9,07	-2,9	7,464264
TNF-α + Υποξία	23,72	13,84	9,88	-2,09	4,257481
MO	23,46	13,985	9,475	-2,495	5,637283

Πίνακας 10. Λόγοι έκφρασης της *SMMHC* σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF-α, υποξίας και συνδυασμού TNF-α και υποξίας (Πείραμα 3). MO = μέσος όρος.

Έγινε ποσοτικοποίηση με RT-qPCR της έκφρασης mRNA της *SMMHC* διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων σε συνθήκες «TNF- α », υποξίας και «TNF- α + υποξία» σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς για κάθε ανεξάρτητο πείραμα. Η ποσοτικοποίηση ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της *β -actin* (πίνακας 11).

<i>SMMHC</i>	1ο πείραμα	2ο πείραμα	3ο πείραμα
Δείγμα	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
control	1,385109	1,013959	1,140764
control	0,721965	0,986233	0,876606
MO	1	1	1
TNF- α	17,5087	19,56224	10,33882
TNF- α	28,6408	16,79547	12,38052
MO	22,39337	18,12614	11,31371
Υποξία	1,049717	0,244855	1,239708
Υποξία	0,712025	0,312083	0,812252
MO	0,864537	0,276433	1,003472
TNF- α + Υποξία	17,38776	15,88948	7,464264
TNF- α + Υποξία	10,70342	16,91229	4,257481
MO	13,64216	16,39291	5,637283

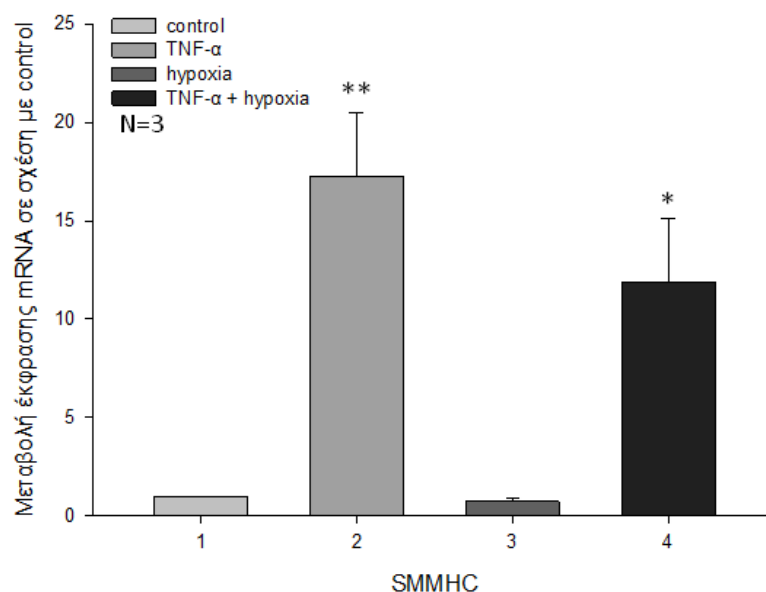
Πίνακας 11. Λόγοι έκφρασης του mRNA της *SMMHC* σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF- α , υποξίας και συνδυασμού TNF- α και υποξίας σε 3 ανεξάρτητα πειράματα. MO = μέσος όρος.

Έγινε ανάλυση των 3 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλότυπων δειγμάτων και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές (πίνακας 12).

<i>SMMHC</i>	control	TNF- α	Υποξία	TNF- α + Υπ.
MO	1,000	17,278	0,715	11,891
SE	0,000	3,226	0,223	3,226

Πίνακας 12. Μέσοι όροι (MO) λόγω έκφρασης της *SMMHC* 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. SE = standard error (τυπικό σφάλμα).

Ο TNF- α αύξησε αξιοσημείωτα την έκφραση mRNA της *SMMHC* τόσο στη νορμοξία («TNF- α » / control : $17,278 \pm 3,226$ SE, $P < 0.01$) όσο και στην υποξία («TNF- α + hypoxia» / control : $11,891 \pm 3,226$ SE, $P < 0.05$). Αντίθετα, η έκφραση mRNA της *SMMHC* στην υποξία παρουσίασε μη στατιστικά σημαντική μείωση («hypoxia» / control : $0,715 \pm 0,223$ SE) (Εικ. 38).



Εικόνα 38. Ποσοτικοποίηση mRNA της *SMMHC* διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF-α, και σε υποξία, με ή χωρίς TNF-α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (N) διπλότυπων δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση είναι ομαλοποιημένη ως προς τα επίπεδα mRNA της *β-actin* (** : $P < 0,01$, * : $P < 0,05$).

4.1.3.2. Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της *a2 Actin*

Τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης της έκφρασης mRNA της *a2 Actin* σε καθένα από τα 3 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 15.

<i>a2 Actin</i>	1ο πείραμα	2ο πείραμα	3ο πείραμα
Δείγμα	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
control	0,99654	0,891929	1,189207
control	0,739694	1,121166	0,840896
MO	1	1	1
TNF-α	0,662044	2,353813	1,028114
TNF-α	0,588453	2,077718	0,852635
MO	0,624165	2,211461	0,936272
Υποξία	0,904379	0,600818	1,197479
Υποξία	0,949342	0,82645	0,97942
MO	0,926588	0,70466	1,082975
TNF-α + Υποξία	0,879649	2,020903	1,310393
TNF-α + Υποξία	1,333299	2,006943	0,952638
MO	1,082975	2,013911	1,117287

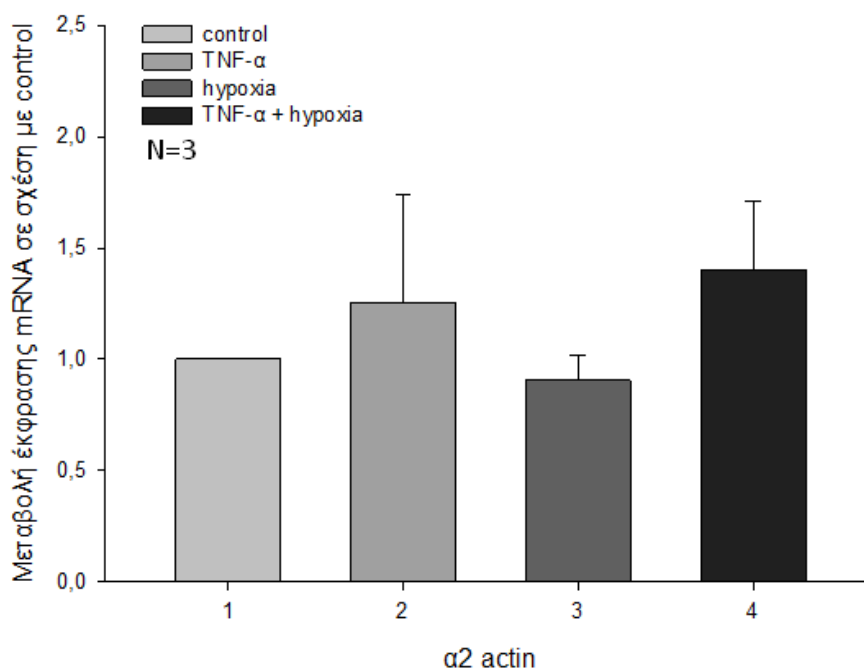
Πίνακας 15. Λόγοι έκφρασης του mRNA της *a2 Actin* σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF-α, υποξίας και συνδυασμού TNF-α και υποξίας σε 3 ανεξάρτητα πειράματα. MO = μέσος όρος.

Οι μέσοι όροι και το τυπικό σφάλμα των λόγων έκφρασης της *Actin a2* των 3 ανεξάρτητων πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 16.

<i>a2 Actin</i>	control	TNF- α	Υποξία	TNF- α + Υπ.
MO	1,000	1,257	0,905	1,405
SE	0,000	0,486	0,110	1,311

Πίνακας 16. Μέσοι όροι (MO) λόγων έκφρασης της *a2 Actin* 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. SE = standard error (τυπικό σφάλμα).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τόσο ο TNF- α όσο και η υποξία δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων έκφρασης mRNA της *a2 Actin* («TNF- α » / control : $1,257 \pm 0,486$ SE, «hypoxia» / control : $0,905 \pm 0,110$ SE, «TNF- α + hypoxia» / control : $1,405 \pm 0,305$ SE) (εικ. 39).



Εικόνα 39. Ποσοτικοποίηση mRNA της *a2 Actin* διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF- α , και σε υποξία, με ή χωρίς TNF- α . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (N) διπλότυπων δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση είναι ομαλοποιημένη ως προς τα επίπεδα mRNA της β -actin.

4.1.3.3. Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της SM22

Στους πίνακα 17 και 18 παρουσιάζεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων σχετικής ποσοτικοποίησης mRNA της SM22.

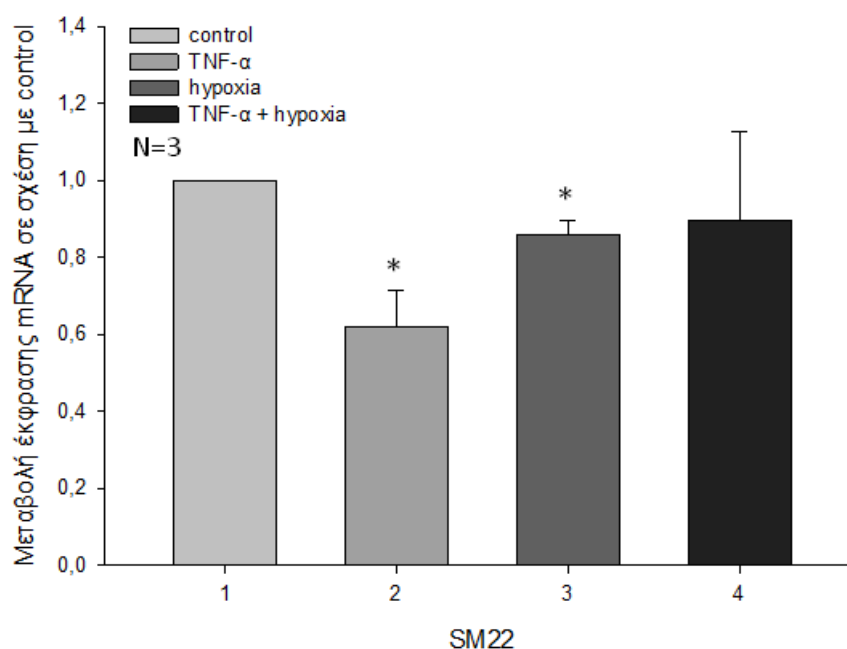
SM22	1ο πείραμα	2ο πείραμα	3ο πείραμα
Δείγμα	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
control	1,205808	4,301978	1,274561
control	0,82932	5,836081	0,784584
MO	1	1	1
TNF- α	0,376312	0,82932	0,5
TNF- α	0,673617	0,790041	0,602904
MO	0,503478	0,809442	0,549046
Υποξία	0,726986	1,042466	1,021012
Υποξία	0,852635	0,76313	0,790041
MO	0,787308	0,891929	0,898132
TNF- α + Υποξία	0,817902	1,265757	0,447513
TNF- α + Υποξία	0,888843	1,375542	0,598739
MO	0,852635	1,319508	0,517632

Πίνακας 17. Λόγοι έκφρασης του mRNA της SM22 σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF- α , υποξίας και συνδυασμού TNF- α και υποξίας σε 3 ανεξάρτητα πειράματα. MO = μέσος όρος.

SM22	control	TNF- α	Υποξία	TNF- α + Υπ.
MO	1,000	0,621	0,859	0,897
SE	0,000	0,0953	0,0360	0,233

Πίνακας 18. Μέσοι όροι (MO) λόγω έκφρασης της SM22 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. SE = standard error (τυπικό σφάλμα).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο TNF- α προκάλεσε ήπια μείωση της έκφρασης mRNA της SM22 στη νορμοξία («TNF- α » / control : $0,621 \pm 0,0953$ SE, $P < 0,05$) και ηπιότερη στην υποξία («TNF- α + hypoxia» / control : $0,897 \pm 0,233$ SE). Η υποξία προκάλεσε επίσης μικρή μείωση της έκφρασης mRNA της SM22 («hypoxia» / control : $0,859 \pm 0,0360$ SE, $P < 0,05$) (εικ. 40).



Εικόνα 40. Ποσοτικοποίηση mRNA της *SM22* διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF- α , και σε υποξία, με ή χωρίς TNF- α . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (N) διπλότυπων δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση είναι ομαλοποιημένη ως προς τα επίπεδα mRNA της β -actin (* : $P < 0,05$).

4.1.3.4. Σχετική ποσοτικοποίηση mRNA της *MLCK*

Στους πίνακες 19 και 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης mRNA της *MLCK*.

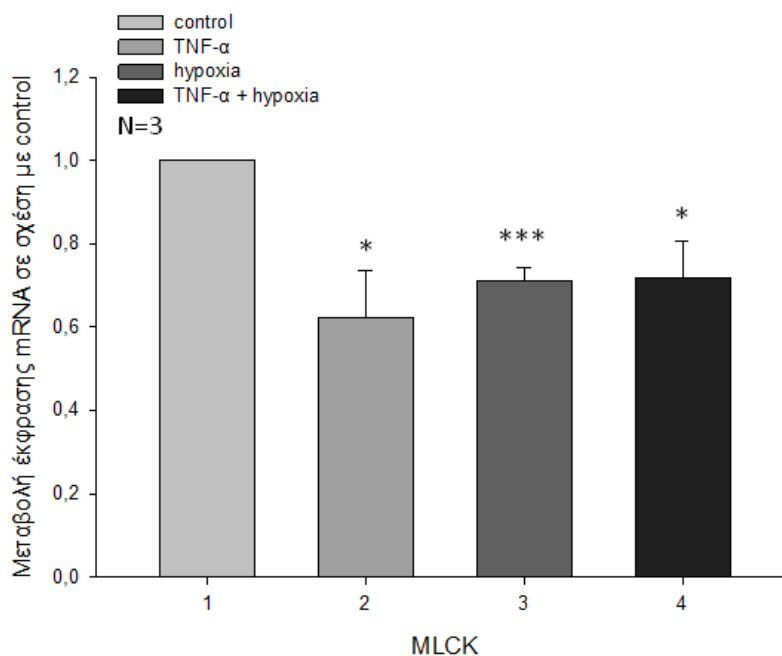
<i>MLCK</i>	1ο πείραμα	2ο πείραμα	3ο πείραμα
Δείγμα	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
control	1,469169	0,939523	1,235419
control	0,680657	1,06437	0,809442
MO	1	1	1
TNF- α	0,367292	0,939523	0,564482
TNF- α	0,694959	0,768438	0,468136
MO	0,505226	0,849685	0,514057
Υποξία	455,0875	0,959264	0,739694
Υποξία	515,5612	0,624165	0,604997
MO	0,694959	0,773782	0,668964
TNF- α + Υπ.	0,898132	0,460094	0,82645
TNF- α + Υπ.	0,484645	0,790041	0,962594
MO	0,659754	0,602904	0,891929

Πίνακας 19. Λόγοι έκφρασης του mRNA της *MLCK* σε συνθήκες αναφοράς (control), TNF- α , υποξίας και συνδυασμού TNF- α και υποξίας σε 3 ανεξάρτητα πειράματα. MO = μέσος όρος

<i>MLCK</i>	control	TNF- α	Υποξία	TNF- α + Υπ.
MO	1,000	0,623	0,713	0,718
SE	0,000	0,113	0,0315	0,0884

Πίνακας 20. Μέσοι όροι (MO) λόγω έκφρασης της *MLCK* 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. SE = standard error (τυπικό σφάλμα).

Ο TNF- α μείωσε την έκφραση mRNA της *MLCK* τόσο στην νορμοξία («TNF- α » / control: $0,623 \pm 0,113$ SE, $P < 0.05$) όσο και στην υποξία («TNF- α + hypoxia» / control: $0,718 \pm 0,0884$ SE, $P < 0.05$). Η υποξία μείωσε επίσης την έκφραση mRNA της *MLCK* («hypoxia» / control : $0,713 \pm 0,0315$ SE, $P = 0.0008$) (εικ. 41).



Εικόνα 41. Ποσοτικοποίηση mRNA της *MLCK* διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF- α , και σε υποξία, με ή χωρίς TNF- α . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (N) διπλότυπων δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση είναι ομαλοποιημένη ως προς τα επίπεδα mRNA της β -actin (* : $P < 0.05$, *** : $P < 0.001$).

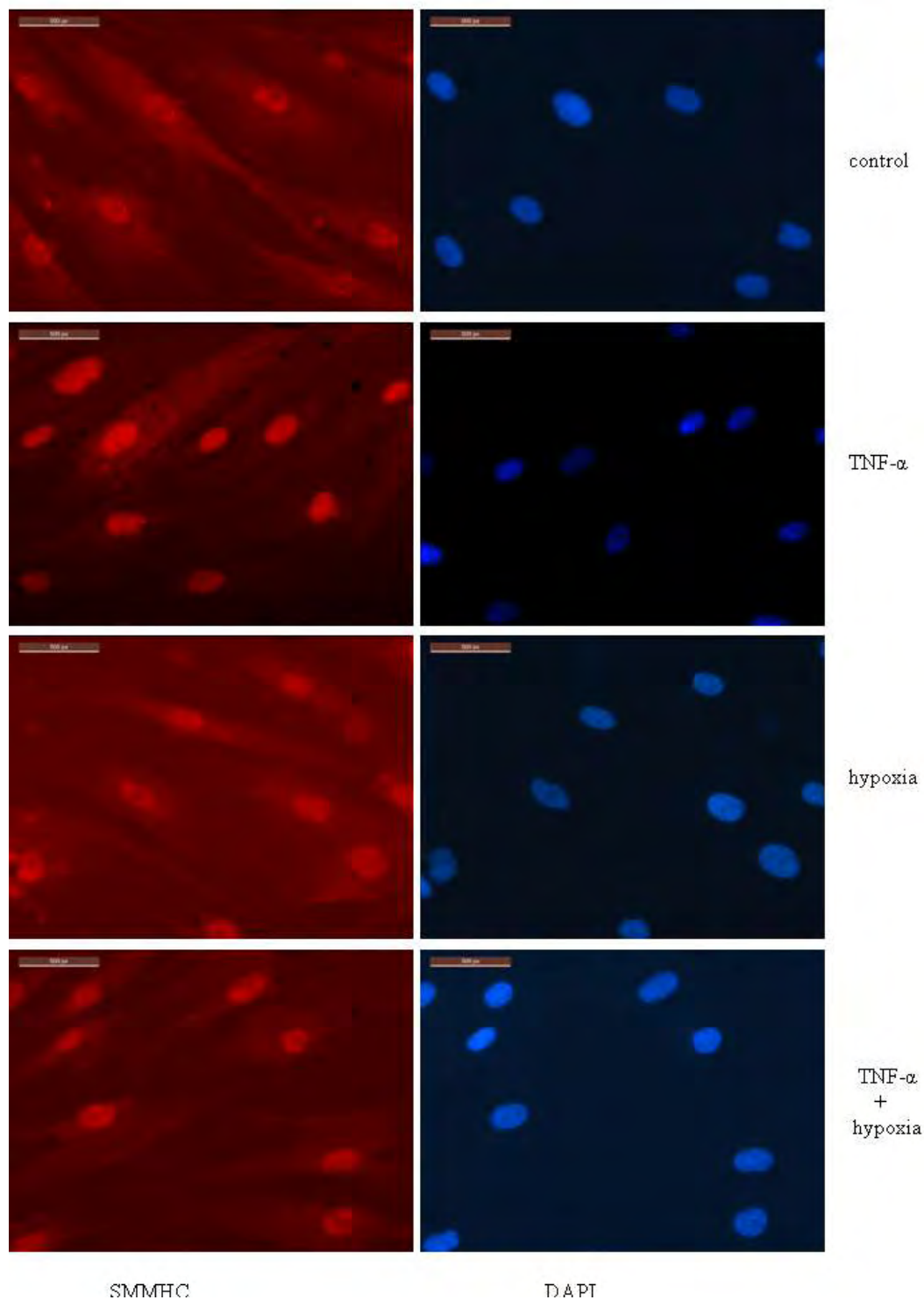
4.2. Έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών συστολής

4.2.1. Ανίχνευση των πρωτεϊνών συστολής με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Διαφοροποιημένα ΛΜΚ αεραγωγών επώαστηκαν για 24 ώρες υπό την επίδραση TNF- α , υποξίας ή του συνδυασμού τους. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανίχνευση των πρωτεϊνών συστολής SMMHC, Phospho-MLC2 και Actin $\alpha 2$ με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

4.2.1.1. Ανίχνευση της SMMHC

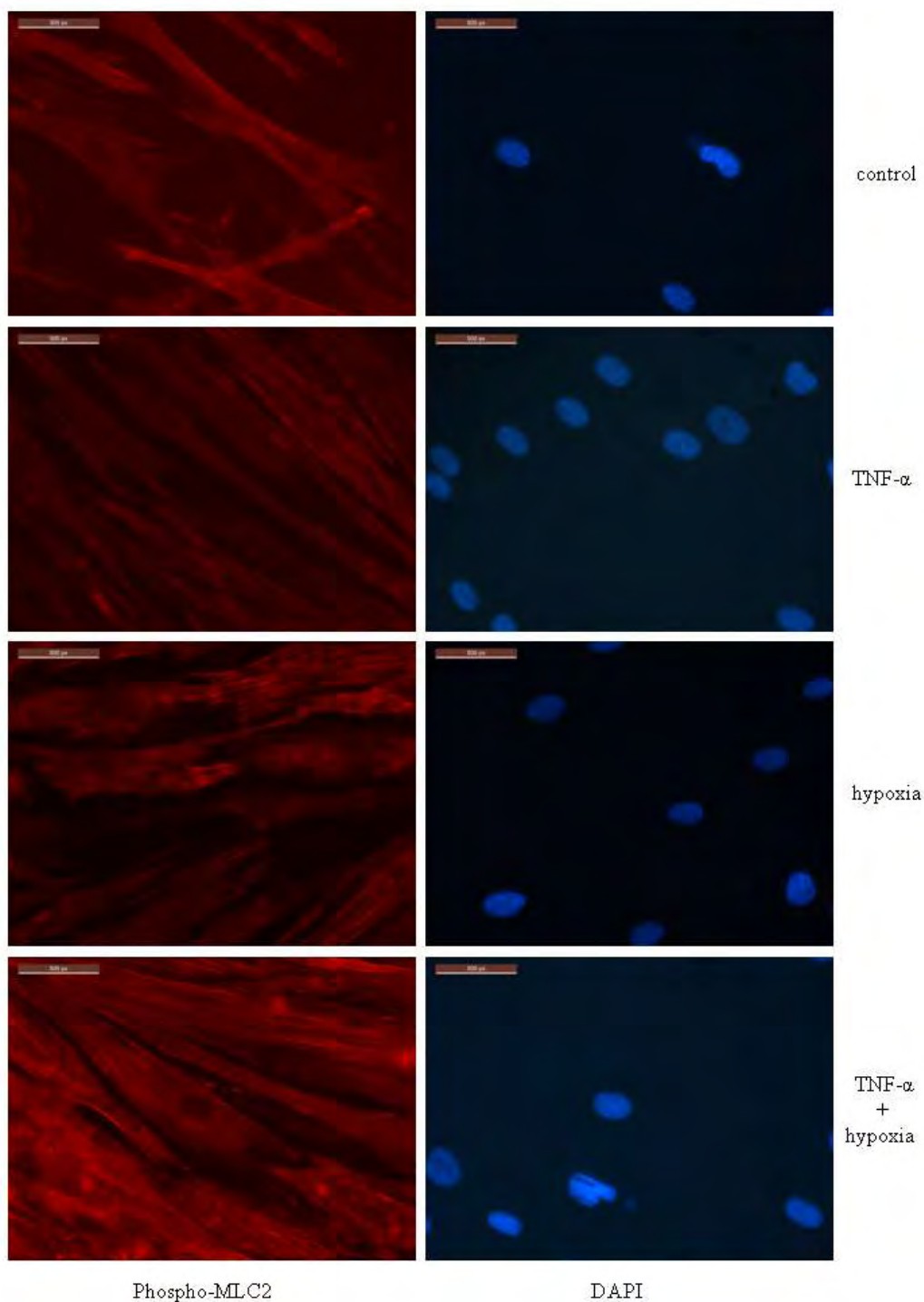
Το σήμα για την SMMHC που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα που είχαν κατεργαστεί με TNF- α , σε συνθήκες νορμοξίας κυρίως αλλά και υποξίας, ήταν πιο έντονο σε σχέση με αυτό που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (εικ. 42).



Εικόνα 42. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της SMMHC σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων, μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF- α , και σε υποξία, με ή χωρίς TNF- α . Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

4.2.1.2. Ανίχνευση της Phospho-MLC2

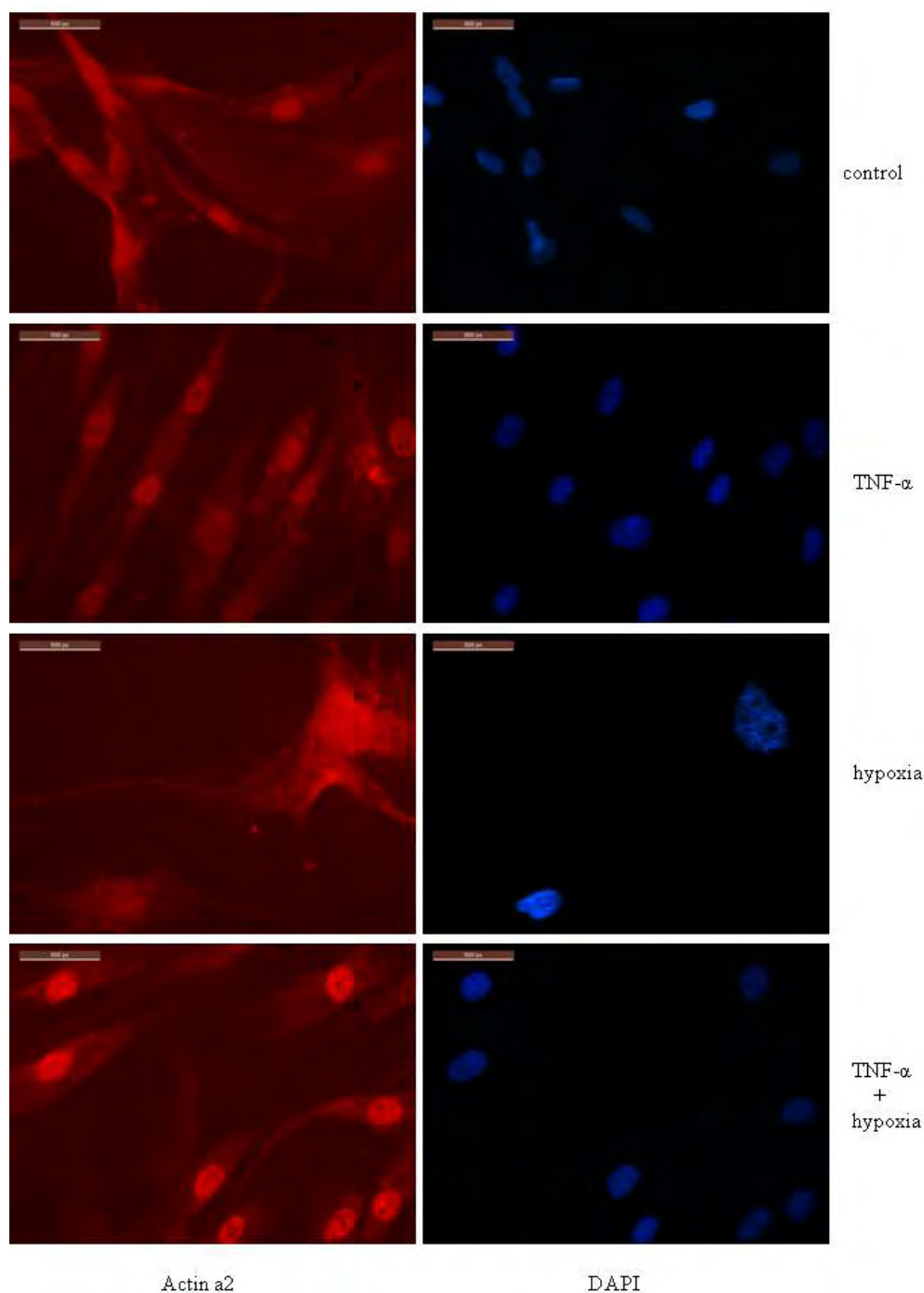
Για να καθορίσουμε τη δραστικότητα της MLCK θελήσαμε να προσδιορίσουμε τα επίπεδα του υποστρώματός της phospho-MLC2. Παρατηρήθηκε ότι η κατεργασία των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, απουσία ή παρουσία TNF- α , προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής της MLC2 (εικ. 43).



Εικόνα 43. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της Phospho-MLC2 σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων, μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF- α , και σε υποξία, με ή χωρίς TNF- α . Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

4.2.1.3. Ανίχνευση της $\alpha 2$ ακτίνης

Η ανίχνευση της $\alpha 2$ ακτίνης με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων, μετά από 24ωρη επώαση σε νορμοξία με ή χωρίς κατεργασία με TNF- α , όπως και στην υποξία με ή χωρίς κατεργασία με TNF- α , παρουσιάζεται στην εικόνα 44. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ένταση σήματος.



Εικόνα 44. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της $\alpha 2$ ακτίνης σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων, μετά από 24h επώαση σε νορμοξία, με ή χωρίς TNF α , και σε υποξία, με ή χωρίς TNF α . Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρωτογενείς καλλιέργειες διαφοροποιημένων ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων χρησιμοποιήθηκαν ως *in vitro* μοντέλο φαινοτυπικά «ώριμων» ΛΜΚ με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του TNF- α , της υποξίας, όπως και του συνδυασμού τους στην έκφραση των *SMMHC*, *MLCK*, *Actin a2*, *SM22* και *phospho MLC2*.

Είναι γνωστό ότι ο TNF- α συμμετέχει στη ρύθμιση των φαινοτυπικών αλλαγών των ΛΜΚ των αεραγωγών. Η επαγωγή συνθετικού/πολλαπλασιαστικού φαινοτύπου μέσω της σύνθεσης και έκκρισης κυτοκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης, όπως και η επαγωγή συσταλτού φαινοτύπου μέσω της ευόδωσης ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών συστολής από τον TNF- α , συμβάλλουν στη φλεγμονή, την ιστική αναδιαμόρφωση αλλά και τη βρογχική υπεραπαντητικότητα που παρατηρούνται στο άσθμα. Αυτό που δεν είναι γνωστό είναι αν ο TNF- α επιπρόσθετα ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φαινοτυπική «ωρίμανση» αλλά και την ίδια τη συστολή. Επιπλέον, η φλεγμονή και η υποξία συνυπάρχουν στο άσθμα και συχνά ενεργοποιούν κοινά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια στην επαγωγή κυτταρικών απαντήσεων.

Παρατηρήσαμε μικρή μείωση της έκφρασης mRNA της *MLCK* κατά την κατεργασία με TNF- α τόσο στη νορμοξία όσο και την υποξία, ενώ εντοπίσαμε μικρή αύξηση της έκφρασης της *phospho MLC2* κάτω από συνθήκες υποξίας, παρουσία ή απουσία TNF- α . Η *MLCK* αποτελεί ένζυμο με ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της συστολής του λείου μυός. Η ποσότητα αλλά και η ενεργότητά του εξαρτούν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της *MLC2*. Αυξημένα επίπεδα της *phospho MLC2* έχουν συσχετιστεί με αυξημένη ενδογενή υπεραπαντητικότητα του λείου μυός (Gil et al., 2006), αν και η συσχέτισή τους με αύξηση της V_{max} είναι αντιφατική (Blanc et al., 2003; Hai and Murphy, 1988; Merkel et al., 1990).

Δεν έχει μελετηθεί έως τώρα η άμεση επίδραση του TNF- α στη ρύθμιση της έκφρασης της *MLCK*. Ωστόσο, είναι αρκετοί οι ερευνητές που έχουν αναφέρει αύξηση της έκφρασης της *MLCK* στο άσθμα. Αυξημένη πρωτεΐνη για την *MLCK* έχει βρεθεί σε ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων που ευαισθητοποιήθηκαν *ex vivo* με εκχύλισμα μείζονων αλλεργιογόνων (Ammit et al., 2000), όπως και σε ΛΜΚ τραχείας και βρόγχων σκύλων που είχαν ευαισθητοποιηθεί στην αμβροσία (ragweed) (Jiang et al., 1992). Αν και σε καμία από τις δύο μελέτες δεν διερευνάται ο ρόλος του

TNF-α στην ρύθμιση της έκφρασης της MLCK, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στη μελέτη των Jiang και συνεργατών οι μετρήσεις mRNA της MLCK έδειξαν ότι το αυξημένο περιεχόμενο σε πρωτεΐνη στα ευαισθητοποιημένα υποκείμενα ήταν μάλλον αποτέλεσμα θετικής μεταφραστικής ή/και μετα-μεταφραστικής ρύθμισης και όχι μεταγραφικής. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι ο TNF-α επάγεται σε μαστοκύτταρα (Jiang et al., 1992) και μακροφάγα μέσω IgE μηχανισμού μετά από ευαισθητοποίηση/έκθεση σε αλλεργιογόνο (Ohkawara et al., 1992) αλλά και ότι αυξημένα επίπεδα TNF-α ανευρίσκονται στους αεραγωγούς ασθματικών ασθενών ως απάντηση σε τοπική δοκιμασία πρόκλησης με αλλεργιογόνο (Cazzola and Polosa, 2006). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αλλά και το γεγονός ότι παραδοσιακά τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της MLC2 έχουν συσχετιστεί με αυξημένο περιεχόμενο σε MLCK (Jiang et al., 1992; Ma et al., 1998), μπορεί να υποτεθεί ότι η αυξημένη μεταφραστική ή και μετα-μεταφραστική και όχι μεταγραφική ρύθμιση της MLCK από τον TNF-α αποτελεί μια πιθανή ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας. Είναι βέβαιο ότι η υπόθεση αυτή μένει να επιβεβαιωθεί στο εργαστήριο.

Αντίθετα με την παρατηρήσεις μας, αυξημένη έκφραση mRNA για την MLCK έχει αναφερθεί σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Leguillette et al., 2009) αλλά και σε απομονωμένα ΛΜΚ (Ma et al., 2002) βιοπτικού υλικού βρόγχων ασθματικών ασθενών. Στις περιπτώσεις αυτές, αφενός η γονιδιακή ρύθμιση είναι πολυπαραγοντική στο *in vivo* περιβάλλον, αφετέρου τα δείγματα απομονώθηκαν από ασθενείς με ήπιο άσθμα. Η συγκέντρωση του TNF-α τόσο στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα όσο και στο υλικό βιοψίας βρόγχων έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα αλλά όχι σε ασθενείς με ήπιο άσθμα, σε σχέση με υγιείς εθελοντές (Howarth et al., 2005). Επιπλέον, η ανίχνευση αυξημένης ολικής MLCK σε βιοπτικό υλικό χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία της δεδομένου ότι διάφορες ισομορφές της MLCK, μυϊκής και μη μυϊκής προέλευσης, κωδικοποιούνται από ένα και μόνο γονίδιο (Hong et al., 2011).

Ακόμη, αν και παραδοσιακά τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης της MLC έχουν συσχετιστεί με υψηλά επίπεδα της MLCK, αρκετοί ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον στην αναστολή της MLCP, έναν μηχανισμό γνωστό ως «ευαισθητοποίηση στο Ca^{2+} » και ρυθμιζόμενο από τη ROCK και την PKC (Sanderson et al., 2008). Η ROCK επάγει αύξηση της απάντησης συστολής των ΛΜΚ σε διάφορους αγωνιστές αυξάνοντας τα επίπεδα της phospho-MLC μετά από καταστολή της MLCP (Amrani and Panettieri, 2002). Σχετικά πρόσφατες μελέτες

έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα phospho-MLC όπως και αυξημένη συσταλτότητα του λείου μυός σε μοντέλα βρογχικής υπεραπαντητικότητας λόγω του μηχανισμού αυτού (Chiba and Misawa, 2004; Sakai et al., 2006). Είναι αξιοσημείωτο ότι η «ευαισθητοποίηση στο Ca^{2+} » μέσω ενεργοποίησης της ROCK επάγεται από τον TNF- α σε ΛΜΚ αεραγωγών ινδικού χοιριδίου (Parris et al., 1999) αλλά και ανθρώπου (Hunter et al., 2003) με αποτέλεσμα την αναστολή της MLCP και αύξηση των επιπέδων της phospho-MLC. Με βάση όλες τις παραπάνω ενδείξεις, εκτός της θετικής μεταφραστικής ή/και μετα-μεταφραστικής ρύθμισης της MLCK, η αναστολή της MLCP από τον TNF- α ή/και την υποξία αποτελεί μια ακόμη πιθανή ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας, που επίσης μένει να επιβεβαιωθεί στο εργαστήριο. Πάντως, στα ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων επάγεται αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης για την MLCK όπως και της φωσφορυλίωσης της MLC σε συνθήκες υποξίας, μέσω ενεργοποίησης του HIF-1 α (Qi et al., 2011).

Παρατηρήσαμε αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης mRNA της SMMHC κατά την κατεργασία με TNF- α , κυρίως στην νορμοξία αλλά και στην υποξία. Επίσης, αυξημένο σήμα στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε κατά την ανίχνευση της SMMHC με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η αύξηση της SMMHC αποτελεί σημαντικό δείκτη κυτταρικής υπερτροφίας και αντανακλά πιθανόν την αύξηση της μάζας του στρώματος των ΛΜΚ των αεραγωγών που παρατηρείται στο άσθμα. Δεν έχει μελετηθεί αλλού η επίδραση του TNF- α στην έκφραση της SMMHC. Είναι γνωστό, ωστόσο, ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής υφίσταται ρύθμιση στο άσθμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Έχει αναφερθεί η ήπια αύξηση (Leguillette et al., 2009) αλλά και η σταθερή έκφραση (Ma et al., 2002; Woodruff et al., 2004) mRNA για την SMMHC σε βιοπτικό υλικό βρόγχων ασθματικών σε σχέση με υγιείς εθελοντές. Σε κάθε περίπτωση πάντως, τα ΛΜΚ είχαν απομονωθεί από ασθενείς με ήπιο έως μέτριο άσθμα, κλινικούς φαινοτύπους δηλαδή στους οποίους ο TNF- α φαίνεται πως δεν επάγεται (Howarth et al., 2005). Σε μελέτη του εργαστηρίου μας έχει φανεί ότι η 24ωρη κατεργασία διαφοροποιημένων ΛΜΚ αεραγωγών σε υποξία επαγόμενη από $CoCl_2$ δεν επάγει σημαντική διαφορά στον αριθμό των κυττάρων με έντονη σήμανση για την SMMHC σε σχέση με τη νορμοξία (Chachami et al., 2007). Η παρατήρηση αυτή φάνηκε να ισχύει και στην παρούσα μελέτη αν και η επανάληψη των πειραμάτων κρίνεται σκόπιμη για την επιβεβαίωσή της.

Παρατηρήσαμε ότι ο TNF- α και η υποξία, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, προκάλεσαν ήπια μείωση της έκφρασης mRNA της SM22. Δεν έχει μελετηθεί αλλού

η άμεση επίδραση του TNF-α στην έκφραση της SM22 σε ΛΜΚ αεραγωγών είτε *in vitro* είτε *in vivo*. Έχει παρατηρηθεί διπλάσια έκφραση mRNA της πρωτεΐνης αυτής σε βιοπτικό υλικό βρόγχων ασθενών με ήπιο άσθμα σε σχέση με υγιείς εθελοντές (Leguillette et al., 2009). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή δεν να μπορεί να διευκρινιστεί η κυτταρική προέλευση του mRNA δεδομένου ότι η SM22 εκφράζεται στους ινοβλάστες (Lawson et al., 1997) και στα επιθηλιακά κύτταρα. Πάντως, αύξηση των επιπέδων της SM22 στην υποξία έχει παρατηρηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (A549 NSCLC cells). Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από κυτταρική υπερτροφία και είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησης του HIF-1α (Kim et al., 2012). Αν και έχουν περάσει περίπου 2 δεκαετίες από την απομόνωση της SM22 στα ΛΜΚ, ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής παραμένει άγνωστος. Δεδομένης της ιδιότητάς της SM22 να συνδέει την ακτίνη, έχει υποτεθεί ότι η ρύθμιση της έκφρασής της επηρεάζει το ρυθμό σύνδεσης των εγκάρσιων γεφυρών, ή τη δραστηριότητα της μυοσίνης ως ATPάσης, ή την αναδιαμόρφωση των ινιδίων ακτίνης (Leguillette et al., 2009). Έτσι, μπορεί να υποτεθεί ότι οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης της SM22 παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη βρογχικής υπεραπαντητικότητας.

Παρατηρήσαμε περιορισμένες αλλαγές των επιπέδων mRNA, όπως και μη εμφανείς αλλαγές των επιπέδων πρωτεΐνης της α2 ακτίνης, τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία, παρουσία ή απουσία TNF-α. Δεν υπάρχουν δεδομένα της άμεσης επίδρασης του TNF-α ή/και της υποξίας στην έκφραση της α2 ακτίνης στα ΛΜΚ των αεραγωγών. Πάντως, ο TNF-α επάγει μείωση της μεταγραφής του γονιδίου της α-ακτίνης λείου μυός (α-SMA) σε ινοβλάστες δέρματος κατά τη διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες (Goldberg et al., 2007), ενώ η υποξία επάγει αύξηση της μεταγραφής του ίδιου γονιδίου σε ινοβλάστες του χιτώνα της πνευμονικής αρτηρίας βούς (Short et al., 2004). Όσον αφορά στα ΛΜΚ αεραγωγών, δεδομένου ότι ο TNF-α επάγεται μετά από ευαισθητοποίηση αλλά και δοκιμασία πρόκλησης με αλλεργιογόνο, αξίζει να σημειωθεί ότι η βρογχική πρόκληση ευαισθητοποιημένων πειραματόζωων είτε με ωαλβουμίνη (Plant et al., 2012) είτε με ακάρεα οικιακής σκόνης (Ogawa et al., 2011) επάγει αύξηση της έκφρασης της α2 ακτίνης. Ο ρόλος της α2 ακτίνης έχει συζητηθεί. Μεταβολές της έκφρασής της επιδρούν άμεσα στην κυτταρική υπερτροφία αλλά και την αντίσταση των αεραγωγών (Plant et al., 2012).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο TNF-α και η υποξία επιδρούν στην έκφραση γονιδίων συστολής ρυθμίζοντας την φαινοτυπική διαφοροποίηση των ΛΜΚ αεραγωγών. Η περαιτέρω διερεύνηση με επανάληψη των πειραμάτων, έλεγχο της

γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως και έλεγχο των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών αλληλουχιών με χρήση κατάλληλων αναστολέων κρίνεται αναγκαία για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά στο βαθμό και τελική κατεύθυνση της φαινοτυπικής διαφοροποίησης αλλά και τη σχέση φλεγμονής και υποξίας στη διαφοροποίηση αυτή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adner, M., Rose, A.C., Zhang, Y., Sward, K., Benson, M., Uddman, R., Shankley, N.P., and Cardell, L.O. (2002). An assay to evaluate the long-term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNF α up-regulates 5-HT(2A)-mediated contraction. *Br J Pharmacol* 137, 971-982.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.
- Al-Muhsen, S., Johnson, J.R., and Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128, 451-462; quiz 463-454.
- Ammit, A.J., Armour, C.L., and Black, J.L. (2000). Smooth-muscle myosin light-chain kinase content is increased in human sensitized airways. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 257-263.
- Amrani, Y., Chen, H., and Panettieri, R.A., Jr. (2000). Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? *Respir Res* 1, 49-53.
- Amrani, Y., and Panettieri, R.A., Jr. (2002). Modulation of calcium homeostasis as a mechanism for altering smooth muscle responsiveness in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2, 39-45.
- Assinder, S.J., Stanton, J.A., and Prasad, P.D. (2009). Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 482-486.
- Avner, B.P., Delongo, J., Wilson, S., and Ladman, A.J. (1981). A method for culturing canine tracheal smooth muscle cells in vitro: morphologic and pharmacologic observations. *Anat Rec* 200, 357-370.
- Bai, T.R., Bates, J.H., Brusasco, V., Camoretti-Mercado, B., Chitano, P., Deng, L.H., Dowell, M., Fabry, B., Ford, L.E., Fredberg, J.J., *et al.* (2004). On the terminology for describing the length-force relationship and its changes in airway smooth muscle. *J Appl Physiol* 97, 2029-2034.
- Belaiba, R.S., Bonello, S., Zahringer, C., Schmidt, S., Hess, J., Kietzmann, T., and Gorch, A. (2007). Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 18, 4691-4697.
- Bentley, J.K., and Hershenson, M.B. (2008). Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc* 5, 89-96.
- Berry, M.A., Hargadon, B., Shelley, M., Parker, D., Shaw, D.E., Green, R.H., Bradding, P., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J., and Pavord, I.D. (2006). Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 354, 697-708.
- Black, J.L., Panettieri, R.A., Jr., Banerjee, A., and Berger, P. (2012). Airway smooth muscle in asthma: just a target for bronchodilation? *Clin Chest Med* 33, 543-558.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.

- Blanc, F.X., Coirault, C., Salmeron, S., Chemla, D., and Lecarpentier, Y. (2003). Mechanics and crossbridge kinetics of tracheal smooth muscle in two inbred rat strains. *Eur Respir J* 22, 227-234.
- Borchers, M.T., Biechele, T., Justice, J.P., Ansay, T., Cormier, S., Mancino, V., Wilkie, T.M., Simon, M.I., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2003). Methacholine-induced airway hyperresponsiveness is dependent on Galphaq signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L114-120.
- Brightling, C., Berry, M., and Amrani, Y. (2008). Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121, 5-10; quiz 11-12.
- Burgess, J.K., Ge, Q., Boustany, S., Black, J.L., and Johnson, P.R. (2004). Increased sensitivity of asthmatic airway smooth muscle cells to prostaglandin E2 might be mediated by increased numbers of E-prostanoid receptors. *J Allergy Clin Immunol* 113, 876-881.
- Camoretti-Mercado, B., Liu, H.W., Halayko, A.J., Forsythe, S.M., Kyle, J.W., Li, B., Fu, Y., McConville, J., Kogut, P., Vieira, J.E., *et al.* (2000). Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *J Biol Chem* 275, 30387-30393.
- Cazzola, M., and Polosa, R. (2006). Anti-TNF-alpha and Th1 cytokine-directed therapies for the treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6, 43-50.
- Chachami, G., Hatziefthimiou, A., Liakos, P., Ioannou, M.G., Koukoulis, G.K., Bonanou, S., Molyvdas, P.-A., Simos, G., and Paraskeva, E. (2007). Exposure of differentiated airway smooth muscle cells to serum stimulates both induction of hypoxia-inducible factor-1 α and airway responsiveness to ACh. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 293, L913-L922.
- Chachami, G., Simos, G., Hatziefthimiou, A., Bonanou, S., Molyvdas, P.A., and Paraskeva, E. (2004). Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 544-551.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G.R., and Ross, R. (1979). The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59, 1-61.
- Chen, H., Tliba, O., Van Besien, C.R., Panettieri, R.A., Jr., and Amrani, Y. (2003). TNF-[alpha] modulates murine tracheal rings responsiveness to G-protein-coupled receptor agonists and KCl. *J Appl Physiol* 95, 864-872; discussion 863.
- Chiba, Y., and Misawa, M. (2004). The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *J Smooth Muscle Res* 40, 155-167.
- Chung, K.F. (2000). Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 15, 961-968.
- Clayton, R.A., Nally, J.E., MacLean, M.R., Thomson, N.C., and McGrath, J.C. (1999). Chronic exposure to hypoxia attenuates contractile responses in rat airways in vitro: a possible role for nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 385, 29-37.
- Cogo, A., Napolitano, G., Michoud, M.C., Barbon, D.R., Ward, M., and Martin, J.G. (2003). Effects of hypoxia on rat airway smooth muscle cell proliferation. *J Appl Physiol* 94, 1403-1409.

- Coward, W.R., Okayama, Y., Sagara, H., Wilson, S.J., Holgate, S.T., and Church, M.K. (2002). NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? *J Immunol* *169*, 5287-5293.
- Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., *et al.* (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18154-18159.
- Dekkers, B.G., Schaafsma, D., Nelemans, S.A., Zaagsma, J., and Meurs, H. (2007). Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *292*, L1405-1413.
- Desai, D., and Brightling, C. (2010). TNF-alpha antagonism in severe asthma? *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* *4*, 193-200.
- Fajardo, I., Svensson, L., Bucht, A., and Pejler, G. (2004). Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* *170*, 477-484.
- Gerthoffer, W.T., Schaafsma, D., Sharma, P., Ghavami, S., and Halayko, A.J. (2011). Motility, Survival, and Proliferation. In *Comprehensive Physiology* (John Wiley & Sons, Inc.).
- Gil, F.R., Zitouni, N.B., Azoulay, E., Maghni, K., and Lauzon, A.M. (2006). Smooth muscle myosin isoform expression and LC20 phosphorylation in innate rat airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *291*, L932-940.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* *72*, 1493-1505.
- Goldberg, M.T., Han, Y.P., Yan, C., Shaw, M.C., and Garner, W.L. (2007). TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* *127*, 2645-2655.
- Goldsmith, A.M., Bentley, J.K., Zhou, L., Jia, Y., Bitar, K.N., Fingar, D.C., and Hershenson, M.B. (2006). Transforming growth factor-beta induces airway smooth muscle hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol* *34*, 247-254.
- Gosens, R., Stelmack, G.L., Dueck, G., Mutawe, M.M., Hinton, M., McNeill, K.D., Paulson, A., Dakshinamurti, S., Gerthoffer, W.T., Thliveris, J.A., *et al.* (2007). Caveolae facilitate muscarinic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ mobilization and contraction in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *293*, L1406-1418.
- Guo, J., Lu, W., Shimoda, L.A., Semenza, G.L., and Georas, S.N. (2009). Enhanced interferon-gamma gene expression in T Cells and reduced ovalbumin-dependent lung eosinophilia in hypoxia-inducible factor-1-alpha-deficient mice. *Int Arch Allergy Immunol* *149*, 98-102.
- Hai, C.M., and Murphy, R.A. (1988). Regulation of shortening velocity by cross-bridge phosphorylation in smooth muscle. *Am J Physiol* *255*, C86-94.
- Halayko, A.J., and Amrani, Y. (2003). Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* *137*, 209-222.
- Halayko, A.J., Camoretti-Mercado, B., Forsythe, S.M., Vieira, J.E., Mitchell, R.W., Wylam, M.E., Hershenson, M.B., and Solway, J. (1999). Divergent

- differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol* 276, L197-206.
- Halayko, A.J., Kartha, S., Stelmack, G.L., McConville, J., Tam, J., Camoretti-Mercado, B., Forsythe, S.M., Hershenson, M.B., and Solway, J. (2004). Phosphatidylinositol-3 kinase/mammalian target of rapamycin/p70S6K regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 266-275.
- Halayko, A.J., Salari, H., MA, X., and Stephens, N.L. (1996). Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 270, L1040-L1051.
- Halayko, A.J., and Solway, J. (2001). Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 90, 358-368.
- Halayko, A.J., Tran, T., and Gosens, R. (2008). Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proc Am Thorac Soc* 5, 80-88.
- Halayko, A.J., Tran, T., Ji, S.Y., Yamasaki, A., and Gosens, R. (2006). Airway smooth muscle phenotype and function: interactions with current asthma therapies. *Curr Drug Targets* 7, 525-540.
- Hirota, J.A., Nguyen, T.T., Schaafsma, D., Sharma, P., and Tran, T. (2009). Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulm Pharmacol Ther* 22, 370-378.
- Hong, F., Haldeman, B.D., Jackson, D., Carter, M., Baker, J.E., and Cremo, C.R. (2011). Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys* 510, 135-146.
- Howarth, P.H., Babu, K.S., Arshad, H.S., Lau, L., Buckley, M., McConnell, W., Beckett, P., Al Ali, M., Chauhan, A., Wilson, S.J., *et al.* (2005). Tumour necrosis factor (TNF α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 60, 1012-1018.
- Huerta-Yepez, S., Baay-Guzman, G.J., Bebenek, I.G., Hernandez-Pando, R., Vega, M.I., Chi, L., Riedl, M., Diaz-Sanchez, D., Kleerup, E., Tashkin, D.P., *et al.* (2011). Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 66, 909-918.
- Huerta-Yepez, S., Baay-Guzman, G.J., Garcia-Zepeda, R., Hernandez-Pando, R., Vega, M.I., Gonzalez-Bonilla, C., and Bonavida, B. (2008). 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clinical Immunology* 129, 313-324.
- Hunter, I., Cobban, H.J., Vandenabeele, P., MacEwan, D.J., and Nixon, G.F. (2003). Tumor necrosis factor- α -induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the Ca²⁺ sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol* 63, 714-721.
- Iwasaki, M., Saito, K., Takemura, M., Sekikawa, K., Fujii, H., Yamada, Y., Wada, H., Mizuta, K., Seishima, M., and Ito, Y. (2003). TNF- α contributes to the development of allergic rhinitis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 112, 134-140.
- Jain, D., Keslacy, S., Tliba, O., Cao, Y., Kierstein, S., Amin, K., Panettieri, R.A., Jr., Haczku, A., and Amrani, Y. (2008). Essential role of IFN β and CD38 in TNF α -induced airway smooth muscle hyper-responsiveness. *Immunobiology* 213, 499-509.

- Janssen, L.J. (2002). Ionic mechanisms and Ca²⁺ regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 282, L1161-L1178.
- Jiang, H., Rao, K., Halayko, A.J., Liu, X., and Stephens, N.L. (1992). Ragweed sensitization-induced increase of myosin light chain kinase content in canine airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 567-573.
- Johnson, P.R., Roth, M., Tamm, M., Hughes, M., Ge, Q., King, G., Burgess, J.K., and Black, J.L. (2001). Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 474-477.
- Jones, E.Y., Stuart, D.I., and Walker, N.P.C. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, 225-228.
- Kanehiro, A., Lahn, M., Makela, M.J., Dakhama, A., Joetham, A., Rha, Y.H., Born, W., and Gelfand, E.W. (2002). Requirement for the p75 TNF-alpha receptor 2 in the regulation of airway hyperresponsiveness by gamma delta T cells. *J Immunol* 169, 4190-4197.
- Kim, S.R., Lee, K.S., Park, H.S., Park, S.J., Min, K.H., Moon, H., Puri, K.D., and Lee, Y.C. (2010). HIF-1alpha inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium. *Eur J Immunol* 40, 2858-2869.
- Kim, T.R., Cho, E.W., Paik, S.G., and Kim, I.G. (2012). Hypoxia-induced SM22alpha in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy. *FEBS Lett* 586, 303-309.
- Knox, A.J., Corbett, L., Stocks, J., Holland, E., Zhu, Y.M., and Pang, L. (2001). Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism. *FASEB J* 15, 2480-2488.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., *et al.* (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125.
- Lawson, D., Harrison, M., and Shapland, C. (1997). Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil Cytoskeleton* 38, 250-257.
- Lazaar, A.L., and Panettieri, R.A., Jr. (2001). Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell: a new target for pharmacotherapy? *Curr Opin Pharmacol* 1, 259-264.
- Lee, K.S., Kim, S.R., Park, S.J., Min, K.H., Lee, K.Y., Choe, Y.H., Park, S.Y., Chai, O.H., Zhang, X., Song, C.H., *et al.* (2008). Mast Cells Can Mediate Vascular Permeability through Regulation of the PI3K-HIF-1 α -VEGF Axis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178, 787-797.
- Lee, K.S., Kim, S.R., Park, S.J., Park, H.S., Min, K.H., Jin, S.M., Lee, M.K., Kim, U.H., and Lee, Y.C. (2006). Peroxisome proliferator activated receptor-gamma modulates reactive oxygen species generation and activation of nuclear factor-kappaB and hypoxia-inducible factor 1alpha in allergic airway disease of mice. *J Allergy Clin Immunol* 118, 120-127.
- Lee, S.Y., and Chung, S.M. (2007). Neovastat (AE-941) inhibits the airway inflammation via VEGF and HIF-2 alpha suppression. *Vascul Pharmacol* 47, 313-318.
- Léguillette, R., and Lauzon, A.-M. (2008). Molecular Mechanics of Smooth Muscle Contractile Proteins in Airway Hyperresponsiveness and Asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5, 40-46.

- Leguillette, R., Laviolette, M., Bergeron, C., Zitouni, N., Kogut, P., Solway, J., Kachmar, L., Hamid, Q., and Lauzon, A.M. (2009). Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 194-204.
- Liu, H.W., Halayko, A.J., Fernandes, D.J., Harmon, G.S., McCauley, J.A., Kocieniewski, P., McConville, J., Fu, Y., Forsythe, S.M., Kogut, P., *et al.* (2003). The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 39-47.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Ma, X., Cheng, Z., Kong, H., Wang, Y., Unruh, H., Stephens, N.L., and Laviolette, M. (2002). Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L1181-1189.
- Ma, X., Li, W., and Stephens, N.L. (1997). Heterogeneity of airway smooth muscle at tissue and cellular levels. *Can J Physiol Pharmacol* 75, 930-935.
- Ma, X., Wang, Y., and Stephens, N.L. (1998). Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 274, C1206-C1214.
- Matheson, J.M., Lemus, R., Lange, R.W., Karol, M.H., and Luster, M.I. (2002). Role of tumor necrosis factor in toluene diisocyanate asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 396-405.
- Merkel, L., Gerthoffer, W.T., and Torphy, T.J. (1990). Dissociation between myosin phosphorylation and shortening velocity in canine trachea. *Am J Physiol* 258, C524-532.
- Mitchell, R.W., Halayko, A.J., Kahraman, S., Solway, J., and Wylam, M.E. (2000). Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M(3) receptors in contractile cultured airway myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L1091-1100.
- Morgan, K.G., and Gangopadhyay, S.S. (2001). Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J Appl Physiol* 91, 953-962.
- Morjaria, J.B., Babu, K.S., Polosa, R., and Holgate, S.T. (2007). Tumor necrosis factor-alpha in severe corticosteroid-refractory asthma. *Expert Rev Respir Med* 1, 51-63.
- Ogawa, H., Azuma, M., Muto, S., Nishioka, Y., Honjo, A., Tezuka, T., Uehara, H., Izumi, K., Itai, A., and Sone, S. (2011). IkappaB kinase beta inhibitor IMD-0354 suppresses airway remodelling in a *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitized mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 41, 104-115.
- Ohkawara, Y., Yamauchi, K., Tanno, Y., Tamura, G., Ohtani, H., Nagura, H., Ohkuda, K., and Takishima, T. (1992). Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor-alpha in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 385-392.
- Panettieri, R.A., Murray, R.K., DePalo, L.R., Yadvish, P.A., and Kotlikoff, M.I. (1989). A human airway smooth muscle cell line that retains physiological responsiveness. *Am J Physiol* 256, C329-335.
- Parris, J.R., Cobban, H.J., Littlejohn, A.F., MacEwan, D.J., and Nixon, G.F. (1999). Tumour necrosis factor-alpha activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. *J Physiol* 518 (Pt 2), 561-569.

- Plant, P.J., North, M.L., Ward, A., Ward, M., Khanna, N., Correa, J., Scott, J.A., and Batt, J. (2012). Hypertrophic Airway Smooth Muscle Mass Correlates with Increased Airway Responsiveness in a Murine Model of Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46, 532-540.
- Qi, H., Wang, P., Liu, C., Li, M., Wang, S., Huang, Y., and Wang, F. (2011). Involvement of HIF-1alpha in MLCK-dependent endothelial barrier dysfunction in hypoxia. *Cell Physiol Biochem* 27, 251-262.
- Redhu, N.S., Saleh, A., Shan, L., Gerthoffer, W.T., Kung, S.K., Halayko, A.J., Lamkhioued, B., and Gounni, A.S. (2009). Proinflammatory and Th2 cytokines regulate the high affinity IgE receptor (FcepsilonRI) and IgE-dependant activation of human airway smooth muscle cells. *PLoS One* 4, e6153.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G., and Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453, 807-811.
- Russo, C., and Polosa, R. (2005). TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)* 109, 135-142.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakai, H., Chiba, Y., and Misawa, M. (2006). Augmentation of endothelin-1-induced phosphorylation of CPI-17 and myosin light chain in bronchial smooth muscle from airway hyperresponsive rats. *Biol Pharm Bull* 29, 1897-1899.
- Sanderson, M.J., Delmotte, P., Bai, Y., and Perez-Zogbi, J.F. (2008). Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Contractility by Ca²⁺ Signaling and Sensitivity. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5, 23-31.
- Schaafsma, D., McNeill, K.D., Stelmack, G.L., Gosens, R., Baarsma, H.A., Dekkers, B.G., Frohwerk, E., Penninks, J.M., Sharma, P., Ens, K.M., *et al.* (2007). Insulin increases the expression of contractile phenotypic markers in airway smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C429-439.
- Scortegagna, M., Cataisson, C., Martin, R.J., Hicklin, D.J., Schreiber, R.D., Yuspa, S.H., and Arbeit, J.M. (2008). HIF-1alpha regulates epithelial inflammation by cell autonomous NFkappaB activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* 111, 3343-3354.
- Semenza, Gregg L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399-408.
- Seow, C.Y. (2005). Myosin filament assembly in an ever-changing myofilament lattice of smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1363-1368.
- Sharma, P., Tran, T., Stelmack, G.L., McNeill, K., Gosens, R., Mutawe, M.M., Unruh, H., Gerthoffer, W.T., and Halayko, A.J. (2008). Expression of the dystrophin-glycoprotein complex is a marker for human airway smooth muscle phenotype maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L57-68.
- Shore, S.A., and Moore, P.E. (2002). Effects of cytokines on contractile and dilator responses of airway smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 859-866.
- Short, M., Nemenoff, R.A., Zawada, W.M., Stenmark, K.R., and Das, M. (2004). Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C416-425.

- Sukkar, M.B., Hughes, J.M., Armour, C.L., and Johnson, P.R. (2001). Tumour necrosis factor-alpha potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology* 6, 199-203.
- Taylor, C.T. (2008). Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol* 586, 4055-4059.
- Thomas, P.S., and Heywood, G. (2002). Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax* 57, 774-778.
- Thomas, P.S., Yates, D.H., and Barnes, P.J. (1995). Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 76-80.
- Tran, T., Ens-Blackie, K., Rector, E.S., Stelmack, G.L., McNeill, K.D., Tarone, G., Gerthoffer, W.T., Unruh, H., and Halayko, A.J. (2007). Laminin-binding integrin alpha7 is required for contractile phenotype expression by human airway myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 668-680.
- Tran, T., McNeill, K.D., Gerthoffer, W.T., Unruh, H., and Halayko, A.J. (2006). Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation. *Respir Res* 7, 117.
- Tsapournioti, S., Mylonis, I., Hatziefthimiou, A., Ioannou, M.G., Stamatiou, R., Koukoulis, G.K., Simos, G., Molyvdas, P.A., and Paraskeva, E. (2013). TNFalpha induces expression of HIF-1alpha mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol*.
- Twort, C.H., and van Breemen, C. (1989). Human airway smooth muscle in cell culture: control of the intracellular calcium store. *Pulm Pharmacol* 2, 45-53.
- van Uden, P., Kenneth, N.S., and Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* 412, 477-484.
- Walker, J.K., Gainetdinov, R.R., Feldman, D.S., McFawn, P.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Premont, R.T., and Fisher, J.T. (2004). G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L312-319.
- Wissler, R.W. (1967). The arterial medial cell, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme? *Circulation* 36, 1-4.
- Wong, M.L., and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75-85.
- Woodruff, P.G., Dolganov, G.M., Ferrando, R.E., Donnelly, S., Hays, S.R., Solberg, O.D., Carter, R., Wong, H.H., Cadbury, P.S., and Fahy, J.V. (2004). Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 1001-1006.
- Zarembek, K.A., and Malech, H.L. (2005). HIF-1 α : a master regulator of innate host defenses? *The Journal of Clinical Investigation* 115, 1702-1704.
- Zhou, L., Goldsmith, A.M., Bentley, J.K., Jia, Y., Rodriguez, M.L., Abe, M.K., Fingar, D.C., and Hershenov, M.B. (2005). 4E-binding protein phosphorylation and eukaryotic initiation factor-4E release are required for airway smooth muscle hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 195-202.