

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

***Μελέτη του ρόλου της αλληλεπίδρασης
κυττάρων και εξωκυττάριας μήτρας στην
απόκριση δερματικών ινοβλαστών από τον
TGF-β.***

Τσαντικίδη Αικατερίνη

Ακαδημαϊκό Έτος: 2014-2015

Τριμελής Επιτροπή: Κλέτσας Δημήτρης,

Μπαλατσός Νίκος,

Λεωνίδας Δημήτρης

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

***The role of cell-matrix interaction on the
response of dermal fibroblasts to TGF- β***

Τσαντικήδη Αικατερίνη
Ακαδημαϊκό Έτος: 2014-2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ	7
1.2 ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΩΝ ΠΛΗΓΩΝ	9
1.2.1 Κύτταρα που συμμετέχουν στην επούλωση των πληγών	12
1.2.2 Το φαινόμενο της ινοπλασίας	12
1.2.3 Χαρακτηριστικά και ρόλος του κολλαγόνου στην ομοιοστασία του δέρματος 15	
1.2.4 Μετασχηματίζων αυξητικός παράγων-β (Transforming Growth Factor-β - TGF- β)	17
1.2.5 Ωρίμανση του TGF-β	19
1.2.6 Ισομορφές του TGF-β	21
1.2.7 Πρωτεΐνες Smad.....	22
1.2.8 Δομή των πρωτεϊνών Smad	23
1.2.9 Σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β εκτός των πρωτεϊνών Smad	28
1.2.10 Ρόλος του TGF-β στην ιστική επούλωση	29
1.2.11 Αυξητικός παράγων προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (Platelet-Derived Growth Factor – PDGF)	30
1.2.12 Δομή του PDGF	30
1.2.13 Ο ρόλος του PDGF στην ιστική επούλωση	31
1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGF-Β ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΔΟΤΕΣ	33
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1 Αποστείρωση.....	37
2.2 Καλλιέργειες κυττάρων.....	38
2.3 Μέτρηση αριθμού κυττάρων	39
2.4 Αποθήκευση κυττάρων.....	40
2.5 Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν	43
2.6 Συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων.....	44

2.7	Απομόνωση κολλαγόνου	45
2.8	Παρασκευή gel κολλαγόνου	46
2.9	Διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού σύνθεσης DNA σε καλλιέργειες σε πλαστικές επιφάνειες.....	47
2.10	Διαδικασία προσδιορισμού σύνθεσης DNA σε πήκτωμα κολλαγόνου.....	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		50
3.1	Η διαφορική δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών εμβρύου και ενήλικου είναι ανεξάρτητη των μηχανικών δυνάμεων.	50
3.1.2.	Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών προσώπου.....	55
3.1.3.	Η δράση του TGF-β σε δερματικούς ινοβλάστες από άλλα θηλαστικά.	56
3.1.3.1.	Μελέτη της δράσης του TGF-β δερματικούς ινοβλάστες εμβρύου ποντικού.	57
3.1.3.2.	Μελέτη της δράσης του TGF-β δερματικούς ινοβλάστες ενήλικου ποντικού. ...	58
3.1.3.3.	Μελέτη της δράσης του TGF-β δερματικούς ινοβλάστες ενήλικου αρουραίου.	60
3.1.3.4.	Μελέτη της δράσης του TGF-β δερματικούς ινοβλάστες ενήλικου γουρουνιού.	61
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ		64
4.1	Διαφορετικοί μηχανισμοί ιστικής επούλωσης σε ενήλικες και έμβρυα	64
4.1.1	Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών διαφέρει ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του δότη.	65
4.1.2	Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών είναι ανεξάρτητη των μηχανικών δυνάμεων.	67
4.2	Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών από άνθρωπο όσο και από άλλα θηλαστικά.	68
5 REFERENCES.....		69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επούλωση των πληγών αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό οποίος αποσκοπεί στην επιδιόρθωση και στην ακεραιότητα του ιστού μετά τον τραυματισμό. Ωστόσο εντοπίζονται αρκετές διαφορές κατά την επούλωση των πληγών στα έμβρυα και στους ενήλικες. Σε αντίθεση με τους ενήλικες, οι πληγές στα έμβρυα και συγκεκριμένα κατά τα δυο πρώτα στάδια της κήσης, ιαίνονται χωρίς το σχηματισμό ουλής και απουσία συστολής. Κατά την ιστική επιδιόρθωση τα αιμοπετάλια και τα ανοσοκύτταρα απελευθερώνουν μια πληθώρα αυξητικών παραγόντων τα οποία ρυθμίζουν τα διάφορα στάδια της επιδιόρθωσης του ιστού. Στην παρούσα διπλωματική αποδεικνύεται ότι ο TGF-β έχει διττή δράση στον πολλαπλασιασμό των ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο της προέλευσής τους. Συγκεκριμένα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών εμβρύου ενώ επάγει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών ενηλίκου. Επίσης η δράση του TGF-β είναι ανεξάρτητη από τις συνθήκες καλλιέργειας και τις μηχανικές δυνάμεις. Τέλος, μελετήθηκε η δράση του TGF-β σε δερματικούς ινοβλάστες από άλλα θηλαστικά και βρέθηκε ότι σε όλες αυτές τις περιπτώσεις αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, υποδεικνύοντας μία σημαντική διαφορά των ανθρωπίνων κυττάρων με αυτά από άλλα είδη.

ABSTRACT

Wound healing is a homeostatic mechanism aiming at the restoration of the tissues's structural and functional integrity after injury. However, several differences in wound healing in embryos and adults are identified. In contrast to adult wounds, fetuses and in particular during the first two stages of pregnancy, are healed without scarring and shrinkage. After wound, formation, platelets and other immunocytes release a plethora of growth factors that regulate the various stages of the repair process. In this thesis is demonstrated that TGF- β has a dual effect on the proliferation of human dermal fibroblasts depending on the developmental stage. It inhibits the proliferation of fetal fibroblasts and stimulate the proliferation of adults' fibroblasts .Furthermore, the action of TGF- β is independent of the culture conditions and the presence of mechanical forces .Finally, the effect of TGF- β was studied on fibroblasts from different species and was found that in all cases it inhibits cell proliferation, indicating a major difference between these cells and human dermal fibroblasts.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ

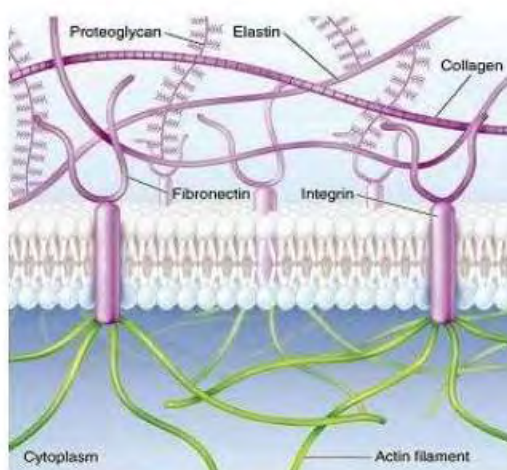
Η πλειονότητα των κυττάρων των διαφόρων ιστών και των οργάνων στους πολυκύτταρους οργανισμούς περιβάλλεται από ένα πολύπλοκο οργανωμένο δίκτυο μακρομορίων, το οποίο είναι γνωστό ως εξωκυττάριος χώρος ή μήτρα. Το εξωκυττάριο δίκτυο δεν είναι σημαντικό μόνο για την αρχιτεκτονική των ιστών, αλλά είναι υπεύθυνο και για τη ρύθμιση αρκετών κυτταρικών δραστηριοτήτων και φυσιολογικών λειτουργιών.

Τα κύρια τμήματα του εξωκυτταρίου χώρου είναι η βασική μεμβράνη, ένα πυκνό στρώμα ύλης που διαχωρίζει την επιφάνεια του επιθηλιακού κυττάρου από το υπερκείμενο μεσέγχυμα και το ενδιάμεσο στρώμα του οποίου η δομή καθορίζει τα κύρια συστατικά του ιστού. Η βασική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, νιδογόνο περλεκάνη και πρωτεογλυκάνες. Ο ρόλος της βασικής μεμβράνης δεν είναι μόνο η στήριξη των κυττάρων αλλά λειτουργεί και ως ένας φραγμός κατά των ξένων αντικειμένων ή καρκινικών κυττάρων εμποδίζοντας την είσοδό τους στον υπερκείμενο συνδετικό ιστό. Το ενδιάμεσο στρώμα συνιστάται από ινώση συστατικά δηλαδή το κολλαγόνο και η ελαστίνη, και από πρωτεογλυκάνες, γλυκοζαμινογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες.

Η σύσταση του εξωκυτταρίου χώρου κάθε ιστού είναι μοναδική γεγονός που αντικατοπτρίζεται από τις διαφορετικές φυσικές ιδιότητες και λειτουργίες των διαφόρων συνδετικών ιστών. Ωστόσο δυο είναι οι

κύριες κατηγορίες βιομορίων που συνθέτουν τον εξωκυττάριο χώρο: οι ινώδεις πρωτεΐνες και οι πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου περιλαμβάνουν το κολλαγόνο και την ελαστίνη που έχουν δομικό ρόλο καθώς και τις μη κολλαγονούχες γλυκοπρωτεΐνες, ινονεκτίνη και λαμινίνη οι οποίες εμπλέκονται σε διεργασίες προσκόλλησης.

Thinking Outside the Cell = Extracellular Matrix (ECM)



Εικόνα 1: Τα κυριότερα συστατικά του εξωκυττάριου χώρου

Ο εξωκυττάριος χώρος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο καθώς συμμετέχει στην οικοδόμηση του υποστρώματος για την ανάπτυξη των κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας πολλών ιστών, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως βιολογικός ηθμός και ρυθμίζει την εκλεκτική διαπερατότητα διαμέσου αυτού μακρομορίων. Επιπλέον, μέσω της αλληλεπίδρασης των συστατικών του με τους κατάλληλους υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων,

προάγει και ρυθμίζει διάφορες λειτουργίες ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, όπως η μετανάστευση, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός τους. Σε πολλούς υποδοχείς του εξωκυττάρου χώρου προσδένονται αυξητικοί παράγοντες με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγωγής του σήματος κατευθύνοντας έτσι, την απαραίτητη μορφολογική οργάνωση του ιστού.

1.2 ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΩΝ ΠΛΗΓΩΝ

Με τον όρο επούλωση εννοούμε τη φυσική αντίδραση αποκατάστασης στο τραύμα. Πρόκειται για μια αλληλουχία πολύπλοκων χημικών και κυτταρικών γεγονότων που έχουν σκοπό τόσο την αποκατάσταση της επιφάνειας, όσο και την επανασύσταση των τραυματισμένων ιστών.

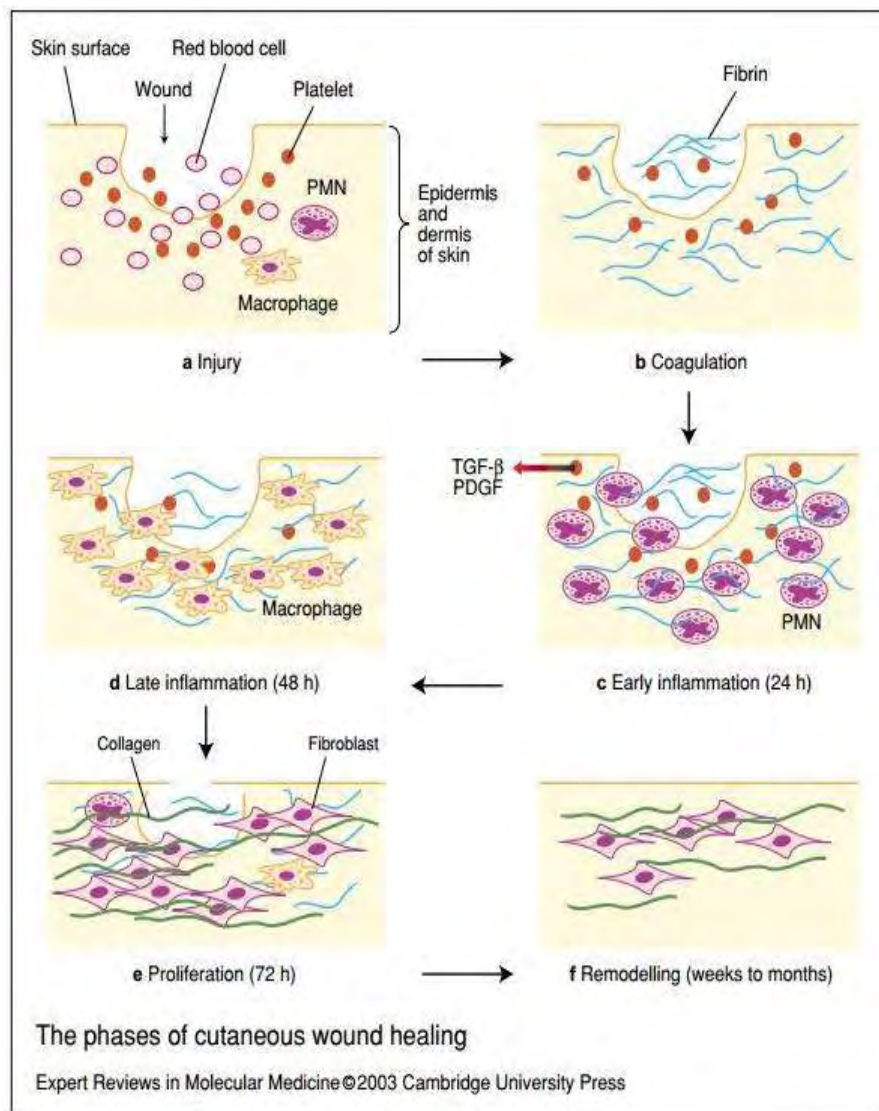
Τα τελευταία χρόνια έχει συντελεσθεί μεγάλη πρόοδος στην προσπάθεια να γίνει κατανοητή η διαδικασία επούλωσης του τραύματος. Τα διαδοχικά βήματα και οι ειδικές διαδικασίες δεν έχει γίνει κατορθωτό, μέχρι στιγμής, να ταυτοποιηθούν πλήρως. Ωστόσο, έχει καθοριστεί το είδος των κυττάρων και η σειρά με την οποία εμφανίζονται στο τραύμα. Επίσης έχει αποσαφηνιστεί και ο ρόλος πολλών αυξητικών παραγόντων και οι λειτουργίες αυτών.

Η επουλωτική διαδικασία του τραύματος αποτελεί μια διαδικασία η οποία διακρίνεται σε 6 φάσεις

- 1) Αρχικά παρατηρείται το φαινόμενο της φλεγμονής. Αμέσως μετά τον τραυματισμό του δέρματος, στοιχεία του αίματος και αγγειοδραστικές αμίνες εξαγγειώνονται από τοπικά κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία της δερμίδας. Η διαπερατότητα των αγγείων αυξάνεται παροδικά ώστε να επιτραπεί η διείσδυση ουδετερόφιλων, αιμοπεταλίων και πρωτεϊνών του πλάσματος στο εσωτερικό του τραύματος. Ακολουθεί αγγειοσυστολή για τον έλεγχο της αιμορραγίας. Σκοπός της φάσης αυτής είναι ο σχηματισμός του θρόμβου, η αποδόμηση καθώς και η απομάκρυνση από τα φλεγμονώδη κύτταρα, των νεκρωμένων ιστών.
- 2) Παρατηρείται πήξη του αίματος ως αποτέλεσμα της δημιουργίας συσσωματωμάτων των αιμοπεταλίων με το ινώδες το οποίο εναποτίθεται στην περιοχή του τραύματος.
- 3) Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν διάφορους παράγοντες, όπως οι TGF- β και PDGF.
- 4) Ύστερα από 48 ώρες τα μακροφάγα αντικαθιστούν τα ουδετερόφιλα ως κύρια φλεγμονώδη κύτταρα. Τα μακροφάγα μαζί με τα ουδετερόφιλα απομακρύνουν διάφορα υπολείμματα από την πληγή, απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες και αρχίζουν την αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας.
- 5) Η φάση του πολλαπλασιασμού αρχίζει περίπου 72 ώρες μετά, όταν οι ινοβλάστες που προσελκύονται προς το τραύμα από τους αυξητικούς παράγοντες, αρχίζουν να συνθέτουν κολλαγόνο.
- 6) Παρόλο που ο ρυθμός σύνθεσης κολλαγόνου μειώνεται μετά από περίπου 3 εβδομάδες, η αναδιοργάνωση του κολλαγόνου

συμβαίνει για μήνες μετά από το τραύμα. Οι φάσεις αυτές επούλωσης του τραύματος, παρουσιάζουν μια αλληλεπικάλυψη. Η διαδικασία της φλεγμονής διαχωρίζεται στην πρώιμη φάση όπου χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποσότητα ουδετεροφίλων και στην όψιμη στην οποία κυριαρχούν τα μονοπύρηνα κύτταρα.

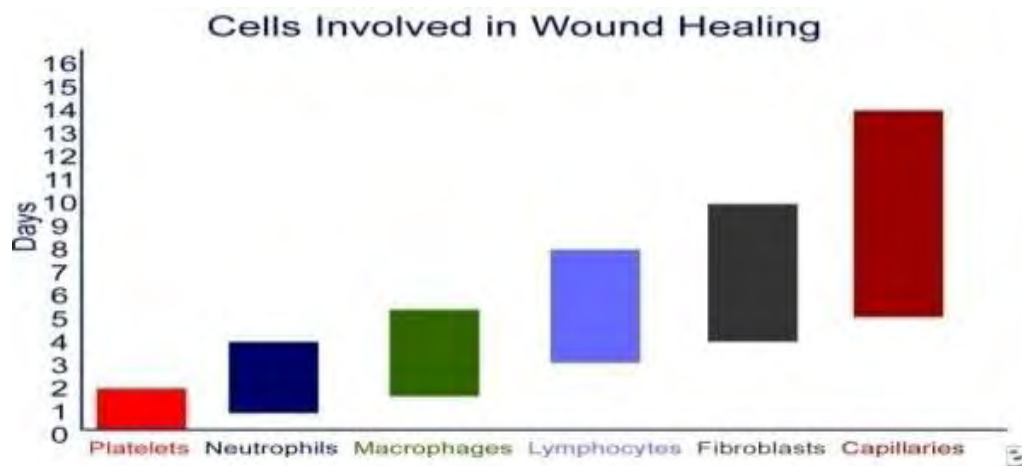
Όλα τα παραπάνω βήματα συνοψίζονται στην εικόνα που ακολουθεί :



Εικόνα 2: Φάσεις τη επούλωσης διαδικασίας

1.2.1 Κύτταρα που συμμετέχουν στην επούλωση των πληγών

Στη διαδικασία της επούλωσης συμμετέχει μία πληθώρα κυτταρικών τύπων. Αρχικά συμμετέχουν τα αιμοπετάλια και άλλα ανοσοκύτταρα τα οποία απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες και άλλα ρυθμιστικά μόρια και προσελκύουν ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα και επάγουν τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό του και την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας. Τέλος, ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλουν στη αγγειογένεση της περιοχής. (Clark)



1.2.2 Το φαινόμενο της ινοπλασίας

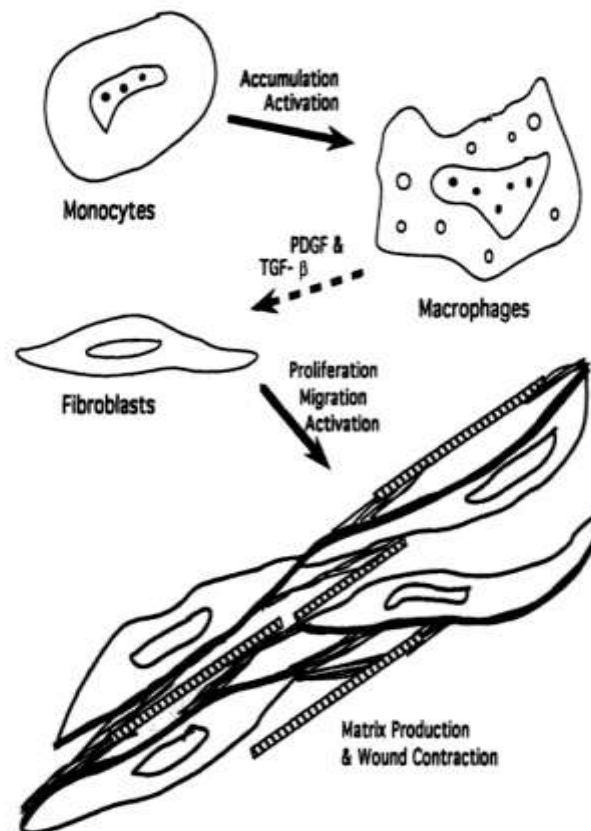
Στην ινοπλασία συμμετέχουν τόσο οι ινοβλάστες όσο και η εξωκυττάρια μήτρα. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του φαινομένου αυτού είναι η συμμετοχή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Παρόλο που οι ινοβλάστες είναι ικανοί να παράγουν από μόνοι τους κυτοκίνες, πολλές από αυτές απελευθερώνονται από

αιμοπετάλια και μακροφάγα. Ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, οι κυτοκίνες παράγονται στο σημείο της πληγής με σκοπό να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, τη μετανάστευσή τους στην πληγή και την παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας. In vivo μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι αυξητικοί παράγοντες δρουν στην ινοπλασία κατά την επούλωση των πληγών. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τόσο ο PDGF όσο και ο TGF- β είναι παρόντες κατά την επισκευή του ιστού, καθώς όπως έχει αποδειχθεί διεγείρουν την επιδιόρθωση της πληγής τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε διαγονιδιακά ζώα.

Δομικά μόρια στην πρώιμη εξωκυττάρια μήτρα που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του ιστού είναι τόσο η φιβρονεκτίνη και το κολλαγόνο όσο και το υαλουρονικό οξύ. Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα στους ινοβλάστες και στην εξωκυττάρια μήτρα. Πιο συγκεκριμένα, οι ινοβλάστες επηρεάζουν την εξωκυττάρια μήτρα προκαλώντας τη σύνθεσή της, την εναπόθεσή της αλλά και την αναδιαμόρφωσή της και αυτή με τη σειρά της επηρεάζει τους ινοβλάστες ρυθμίζοντας τη δράση τους και τον πολλαπλασιασμό τους ώστε να επιτευχθεί αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας.

Ο PDGF μαζί με τον TGF- β είναι ικανοί να διεγείρουν την μετανάστευση των ινοβλαστών και να αυξήσουν την παραγωγή των των ιντεγκρινών, δηλ. υποδοχέων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας. Όταν οι ινοβλάστες βρίσκονται σε μήτρα φιβρονεκτίνης ο PDGF διεγείρει υποδοχείς φιβρονεκτίνης, ενώ όταν οι ινοβλάστες βρίσκονται μέσα σε gel κολλαγόνου, παρατηρείται μέγιστη διέγερση των

υποδοχέων του κολλαγόνου. Έτσι λοιπόν, οι ινοβλάστες απαντούν στο σήμα που δέχονται από τον PDGF με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το περιβάλλον.



Εικόνα 3: Έναρξη της ινοπλασίας από ενεργοποιημένα μακροφάγα. Περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος προσλαμβάνονται στο σημείο του τραύματος από μια πληθώρα παραγόντων. Οι κυτοκίνες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την τροποποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα τα οποία παράγουν τους παράγοντες TGF-β και PDGF και έτσι διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών, η μετανάστευσή τους καθώς και η παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας.

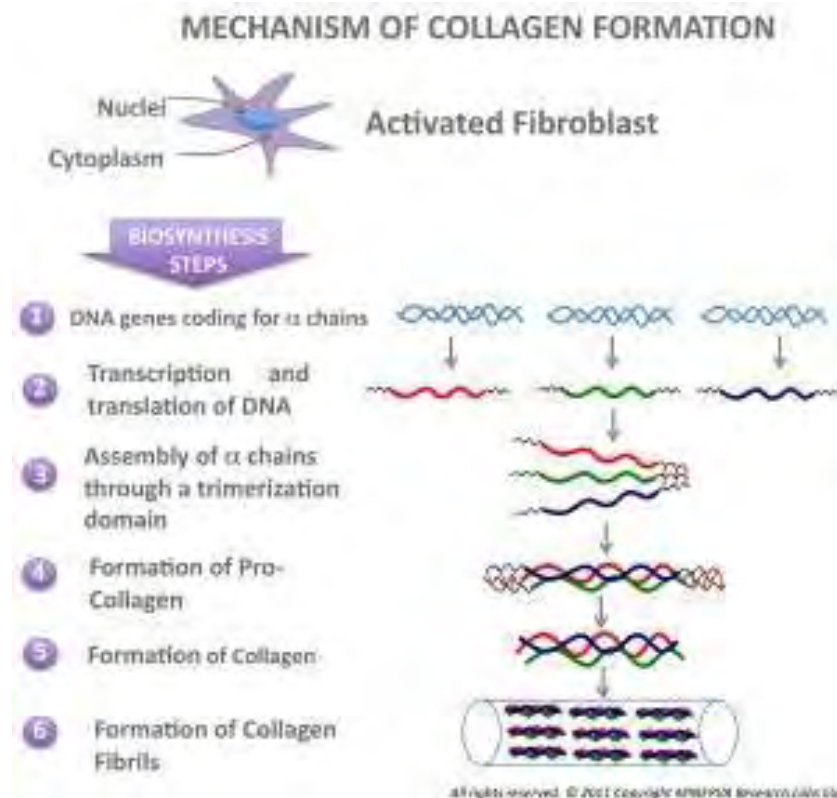
Οι ινοβλάστες υφίστανται μια σειρά από φαινοτυπικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της επούλωσης του ιστού οι οποίες τροποποιούν τον τρόπο αλληλεπίδρασης αυτών με την εξωκυττάρια μήτρα. Στα τελευταία στάδια της επούλωσης έχουμε μετατροπή των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες που συμβάλλει στη συστολή του τραύματος (“wound contraction”). Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται η κίνηση των άκρων της πληγής προς το κέντρο με σκοπό να κλείσει. Η διαδικασία αυτή προηγείται του σταδίου της ωρίμανσης της επούλωσης και λαμβάνει χώρα μέσα σε πέντε μέρες μετά την αρχική βλάβη.

1.2.3 Χαρακτηριστικά και ρόλος του κολλαγόνου στην ομοιοστασία του δέρματος

Το κολλαγόνο είναι μια κύρια πρωτεΐνη στο ανθρώπινο σώμα και αντιπροσωπεύει περίπου το 30% της συνολικής μάζας της πρωτεΐνης στο ανθρώπινο σώμα και ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά τους είναι ότι προσδίδουν εκτατική ισχύ στους συνδετικούς ιστούς. Είναι η κύρια πρωτεΐνη των οστών, των τενόντων και του δέρματος. Το χαρακτηριστικό ενός τυπικού μορίου κολλαγόνου είναι η μακριά, άκαμπτη τρίκλινη ελικοειδής μορφή του, στην οποία τρεις πεπτιδικές αλυσίδες κολλαγόνου περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη σε μια σχοινοειδή έλικα. Με τη σειρά τους τα μόρια αυτά συναρμολογούνται σε πολυμερή, γνωστά ως *ινίδια κολλαγόνου* και αυτά με τη σειρά τους σε ακόμη παχύτερες *ίνες κολλαγόνου*. Άλλα μόρια κολλαγόνου βρίσκονται στην επιφάνεια των ινιδίων κολλαγόνου και διασυνδέουν τα ινίδια τόσο το ένα με

το άλλο, όσο και με άλλα συστατικά του εξωκυττάριου χώρου. Σήμερα αναγνωρίζονται 8 τύποι κολλαγόνου ανάλογα με τη χρονολογική σειρά στην ανακάλυψή τους.

Οι μοναδικές φυσικές ιδιότητες των ινών κολλαγόνου προσδίδουν δομική ακεραιότητα στο σχηματισμό ενός πυκνού δικτύου σε όλο το χόριο του δέρματος. Η κύρια λειτουργία αυτού του δικτύου υφίσταται στο να παρέχει διαρθρωτική στήριξη στην επιδερμίδα. Διάφορα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κολλαγόνου, ανάλογα με τον ιστό. Το κολλαγόνο στο δέρμα παράγεται κυρίως από τους ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες είναι ευαίσθητοι σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα, τα οποία μπορεί να επάγουν τόσο την ενεργοποίηση όσο και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Η ενεργοποίηση των ινοβλαστών οδηγεί σε μια αύξηση στην παραγωγή του κολλαγόνου.

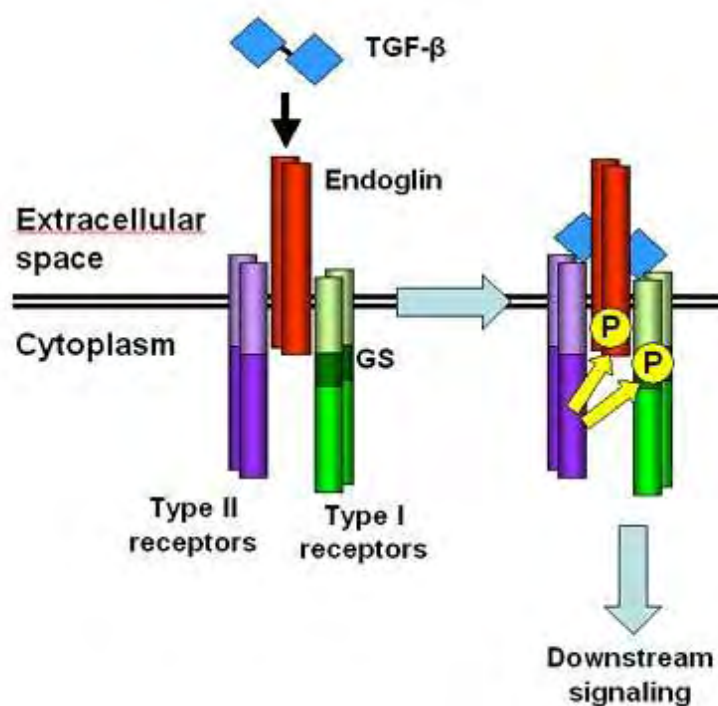


Εικόνα 4 : Μηχανισμοί σύνθεσης του κολλαγόνου

1.2.4 Μετασχηματίζων αυξητικός παράγων-β (Transforming Growth Factor-β - TGF-β)

Ο TGF-β είναι ένας εκκρινόμενος αυξητικός παράγων που αναγνωρίστηκε το 1980 ότι προκαλεί κακοήγη μετασχηματισμό σε καλλιέργειες μεσεγχυματικών νεφρικών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι ο TGF-β μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ διεγείρει κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης.(Roberts 1998, Moustakas et al. 2002) Ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας έχει ρυθμιστική δράση σε ένα ευρύτατο φάσμα κυτταρικών τύπων. Ελέγχει τη σύνθεση και τη συσσώρευση μορίων της εξωκυττάριας μήτρας καθώς διεγείρει τη σύνθεση κολλαγόνου, ινονεκτίνης, πρωτεογλυκανών, θρομβοσπονδίνης, τενασκινών, του

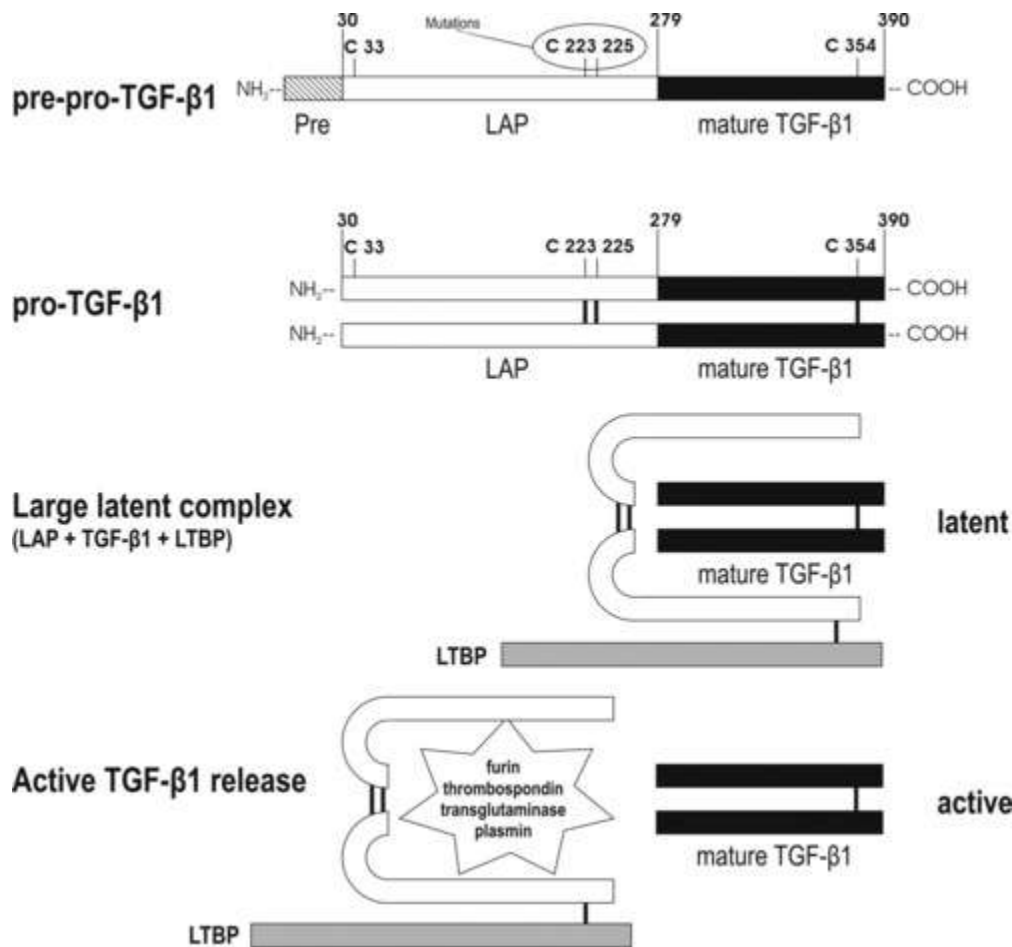
αναστολέα του ενεργοποιητή του κολλαγόνου όπως και του αναστολέα της μεταλλοπρωτεάσης-1. Ρυθμίζει τη διαφοροποίηση, το σχηματισμό των οστών, την αγγειογένεση, την αιμοποίηση και την κυτταρική μετανάστευση. Ο ενεργοποιεί επίσης μηχανισμούς απόπτωσης και ελέγχει τη μορφογένεση με ανασύσταση και ανάπλαση της εξωκυττάριας μήτρας. Σε όλες τις περιπτώσεις το σήμα του TGF-β μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων και επακόλουθη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών.



Εικόνα 5: Διάγραμμα που παρουσιάζει τη πρόσδεση του TGF-β στους υποδοχείς του.

1.2.5 Ωρίμανση του TGF-β

Ο TGF-β συντίθεται ως πρόδρομη ανενεργή προ-πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από μια προ-προ-NH₂ τελική περιοχή που έχει το ρόλο του σηματοδοτικού πεπτιδίου, μια προ-περιοχή 50-375 αμινοξέων (περιοχή LAP) και ένα COO- τελικό τμήμα που θα αποτελέσει το μονομερές του ενεργού ώριμου TGF-β. Η διαδικασία ωρίμανσης ξεκινά στο κυτταρόπλασμα όπου κόβεται το σηματοδοτικό προ-προ-πεπτίδιο. Το υπόλοιπο τμήμα διμερίζεται και ονομάζεται small latent complex (SLC). Το διμερές πρόδρομο μόριο συγκρατείται με δεσμούς S-S στο Golgi, όπου το TGF-β αποκόπτεται πρωτεολυτικά, ωστόσο παραμένει συνδεδεμένο στο προ-πεπτίδιο LAP μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Στην προ-περιοχή LAP του διμερούς πρόδρομου μορίου, συνδέεται επίσης και η γλυκοπρωτεΐνη LTBP και το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα ονομάζεται large latent complex (LLC). Με τη βοήθεια διαφόρων πρωτεασών ο ώριμος TGF-β αποκόπτεται. Το LLC απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο και με τη βοήθεια της LPTB, συνδέεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, όπου παραμένει ανενεργό. Η ενεργοποίηση του TGF-β ξεκινάει με την αποσύνδεση του LLC από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με τη βοήθεια πρωτεασών. Η σύνδεση της πρωτεΐνης της εξωκυττάριας μήτρας, θρομβοσπονδίνης στην προ-περιοχή LAP, οδηγεί στην απελευθέρωση του ώριμου ομό- ή ετερο-διμερούς TGF-β.



Εικόνα 6 : Ωρίμανση του TGF-β : ΟTGF-β συντίθεται ως πρόδρομη ανενεργή προ-πρωτεΐνη , η οποία αποτελείται από μια προ-προ NH₂ τελική περιοχή (*pre-region*), μια προ-περιοχή και ένα COO-τελικό τμήμα το οποίο θα αποτελέσει το μονομερές του TGF- β. Στη συνέχεια το σηματοδοτικό προ-πτο-πεπτίδιο αποκόβεται και το υπόλοιπο τμήμα διμερίζεται και ονομάζεται *small latent complex (SLC)*. Το διμερές του TGF-β κόβεται από μια πρωτεάση, ενώ παραμένει συνδεδεμένο στο προπεπτίδιο LAP μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων . Όπως φαίνεται και από το σχήμα η προπεριοχή LAP συνδέεται και με μια γλυκοπρωτεΐνη LTBP (*latentTGF-β bindingprotein*) και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ονομάζεται *LareLatentComplex (LLC)*. Με τη συνεργασία διαφόρων πρωτεασών το ώριμο TGF-β αποκόπτεται.

1.2.6 Ισομορφές του TGF-β

Ο TGF-β στα θηλαστικά απαντάται σε τρεις ισομορφές, τις TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, οι οποίες έχουν υψηλή ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία και εμφανίζουν σχεδόν ταυτόσημη δομή. Κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια. Ειδικότερα στον άνθρωπο, ο TGF-β1 είναι η μοναδική μορφή που βρίσκεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και μάλιστα σε υψηλή συγκέντρωση, καθώς και σε όλους τους ιστούς σε μικρότερες όμως συγκεντρώσεις. Είναι η καλύτερα μελετημένη μορφή του TGF-β. Ο TGF-β2 αρχικά απομονώθηκε στα αιμοπετάλια του χοίρου. Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα χοίρου και υπάρχει στο σίελο, στο μητρικό γάλα και στο αμνιακό υγρό. Η ισομορφή του TGF-β3 η οποία γενικά υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες στους ιστούς, απομονώθηκε από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο και εκκρίνεται από περιορισμένο αριθμό κυττάρων, κυρίως από μυοβλάστες. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* δεν κατάφεραν να διαχωρίσουν τις διαφορετικές δράσεις αυτών των ισομορφών. Ωστόσο μελέτες που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία είχε γίνει απαλοιφή των γονιδίων του TGF-β αποκάλυψαν ότι κάθε μορφή έχει έναν ανεξάρτητο και απαραίτητο ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης. Ειδικότερα, απαλοιφή του γονιδίου TGF-β1 στον ποντικό προκαλεί σύνδρομο απίσχανσης, το οποίο συνοδεύεται από πολυεστιακή σύμμεικτη ανοσολογική αντίδραση και νέκρωση ιστών καταλήγοντας σε καταστροφή των οργάνων και τελικά σε θάνατο του εμβρύου, αναδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τη σπουδαιότητα της ισομορφής αυτής στην

ανοσολογική απόκριση. Ποντίκια στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο TGF- β 2 παρουσίαζαν πολλαπλές και βαριές αναπτυξιακές ανωμαλίες στους πνεύμονες, στην καρδιά, στους οφθαλμούς, στο πρόσωπο, στη σπονδυλική στήλη και στο ουροποιητικό σύστημα. Τέλος, ποντίκια στα οποία είχε γίνει απαλοιφή του TGF- β 3 παρουσίαζαν έναν ατελή φαινότυπο που χαρακτηριζόταν από αδυναμία των επιθηλιακών κυττάρων του ουρανίσκου να συνδέονται μεταξύ τους, προκαλώντας υπερωσχιστεία, υποδεικνύοντας ότι ο TGF- β 3 είναι απαραίτητος για τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων. Όλες οι ισομορφές του TGF- β προσδέονται σε υποδοχείς που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με ενδογενή δράση κινάση Ser/Thr. Οι υποδοχείς δηλαδή έχουν μια περιοχή που έχει την ικανότητα να μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα από το ATP σε κατάλοιπα Ser/Thr. Η δράση κινάσης βρίσκεται στο εσωτερικό τμήμα του υποδοχέα. Οι υποδοχείς του TGF- β ονομάζονται T β RI και T β RII και είναι διμερισμένοι.

1.2.7 Πρωτεΐνες Smad

Οι πρωτεΐνες Smad είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) R-Smads που ενεργοποιούνται από υποδοχείς των TGF- β (Smad2 και Smad3) β) Co-smad (Smad4) που δεσμεύεται με τις ενεργοποιημένες R-Smads και τις συνοδεύει στον πυρήνα γ) I-Smads που είναι οι ανασταλτικές Smads και σταματούν την περαιτέρω μεταγωγή σήματος (Smad6 και Smad7). Όπως αναφέρθηκε με την φωσφορυλίωση του T β RI δημιουργείται μια θέση πρόσδεσης για τους Smads. Με την πρόσδεση των Smad2

και Smad3 στον υποδοχέα, προκαλείται φωσφορυλίωσή τους. Η φωσφορυλίωση των Smad2 και Smad3 προκαλεί την απομάκρυνσή τους από τον υποδοχέα και τη δημιουργία συμπλόκου με την Smad4 (Co-Smad). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο Smad2/3-Smad4 εισέρχεται στον πυρήνα, αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, που είναι συνδεδεμένοι με το DNA, και μεταγράφεται το γονίδιο στόχος. Οι Smad εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα στάδια ανάπτυξης και σε όλους τους ιστούς του ενήλικου οργανισμού (Flanders et al. 2001)

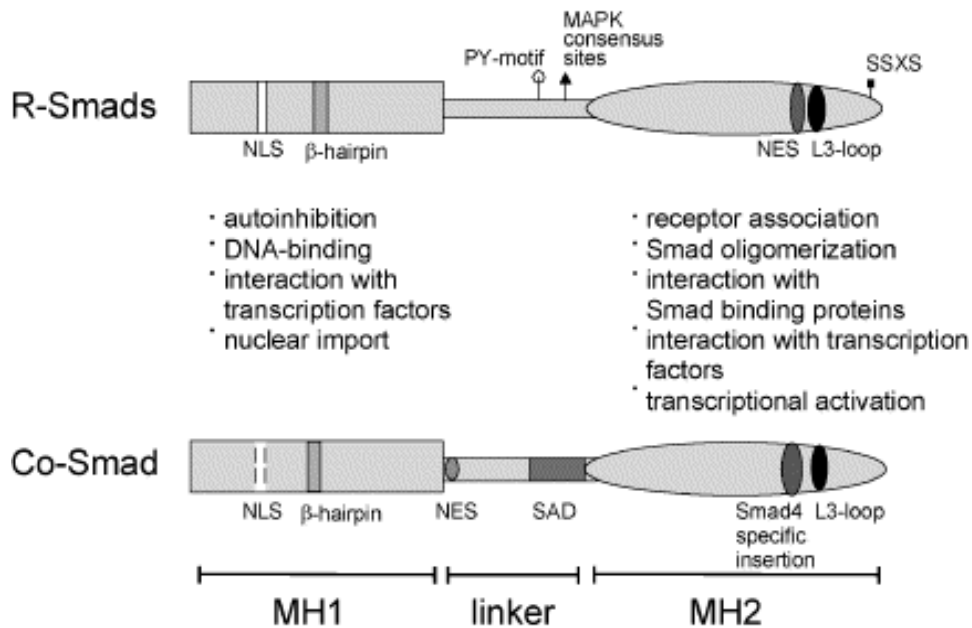
1.2.8 Δομή των πρωτεϊνών Smad

Οι Smads είναι πρωτεΐνες χωρίς ενζυμική δράση που περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, με το DNA και με μεταγραφικούς παράγοντες. Αποτελούνται από τρεις περιοχές:

- MH1 N-Mad homology 1
- Linker, συνδετική περιοχή
- MH2 C-Mad homology 2

Οι περιοχές MH1 είναι καλά συντηρημένες ανάμεσα στις R-Smad και στις Co-Smad, ενώ οι αντίστοιχες περιοχές των I-Smad εμφανίζουν μικρή ομοιότητα με αυτές των άλλων δυο ομάδων. Η περιοχή MH1 συμβάλλει στην αυτοαναστολή αλληλεπιδρώντας φυσιολογικά με την περιοχή MH2. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η δράση των Smad απουσία προσδέτη (TGF-β). Επίσης η περιοχή αυτή ρυθμίζει τη μετατόπιση των μορίων στον πυρήνα του κυττάρου καθώς και τη

μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της πρόσδεσής τους στο DNA και της αλληλεπίδρασης με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες. Η περιοχή MH2 έχει υψηλά ποσοστά ομοιότητας ανάμεσα σε όλες τις Smad και είναι αυτή που ρυθμίζει τον ολιγομερισμό των Smad, την αναγνώρισή τους από τους υποδοχείς και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα κυτταροπλασματικά μόρια και μεταγραφικούς παράγοντες. Η συνδετική περιοχή (linker) η οποία συνδέει τις περιοχές MH1 και MH2, είναι λιγότερο συντηρημένη και περιέχει σημαντικά ρυθμιστικά μοτίβα πλούσια σε προλίνη. Αυτή η περιοχή περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης για MAPKKK και μια περιοχή SAD που είναι η περιοχή του Co-Smad που συμβάλλει στην αλληλεπίδρασή του με τους R-Smads. Περιέχει επίσης ένα ΡΥμοτίβο το οποίο υπάρχει μόνο στα R-Smads τα οποία αλληλεπιδρούν με E3 λιγάσες και οδηγεί στην ουβικουιτινίωση και στην πέψη του συμπλόκου. Τέλος, περιλαμβάνει με περιοχή NES στο N-άκρο, η οποία βρίσκεται μόνο στον Co-Smad και συμβάλλει στην εισαγωγή του στον πυρήνα.

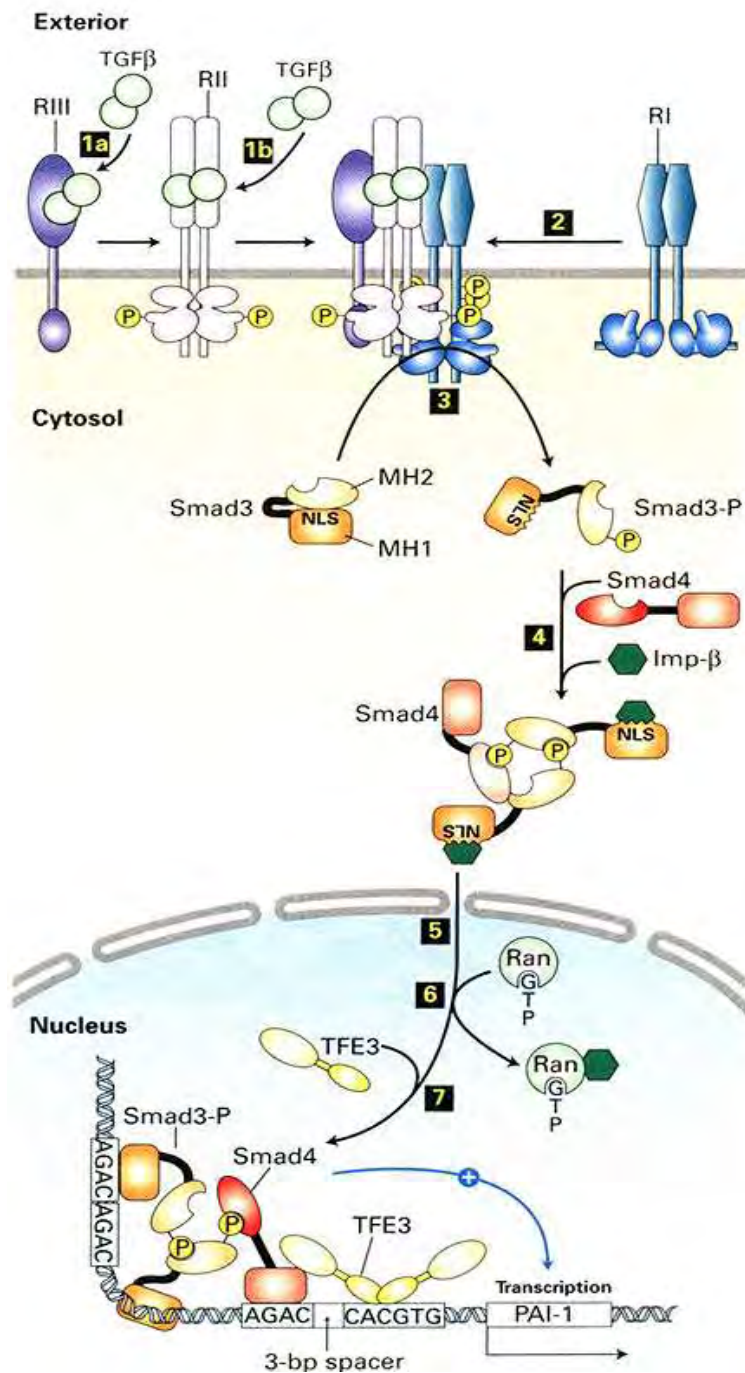


Εικόνα 7 :Δομή των πρωτεϊνών *Smad* και ρόλος της κάθε περιοχής τους:

στην περιοχή MH1 υπάρχουν τμήματα για αυτοαναστολή των *R-Smads*, σύνδεση με το DNA, αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες και εισαγωγή στον πυρήνα. Στην περιοχή MH2 βρίσκονται τμήματα τα οποία αλληλεπιδρούν με τον *TβRI* και τη *Smad4* και με συμπαράγοντες σύνδεσης στο DNA. Τέλος, στη συνδετική περιοχή των *R-Smads* υπάρχουν αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης ενώ στη συνδετική περιοχή των *Co-Smad* υπάρχουν οι περιοχές *NES* και *SAD* για εισαγωγή στον πυρήνα και για αλληλεπίδραση με τις *R-Smad* αντίστοιχα.

Οι διαφορετικές βιολογικές δράσεις του TGF- β προκύπτουν από την ικανότητά του να ρυθμίζει τη μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων στόχων κάθε φορά ανάλογα με ποιους μεταγραφικούς παράγοντες και με ποιους συμπαράγοντες της μεταγραφής συνεργάζονται οι *Smad*. Η *Smad-7* ανταγωνίζεται τη *R-Smad* ως προς την αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη δημιουργία νέων συμπλόκων *Smad2/Smad4* και *Smad3/Smad4*. Επιπλέον η *Smad7* ενεργοποιεί την αποφωσφορυλίωση των υποδοχέων από φωσφατάσες,

επάγει τη σήμανσή τους με μόρια ουβικουϊτίνης προς αποικοδόμηση, όπως και την αποικοδόμησή τους στα λυσοσώματα. Το βασικό μονοπάτι ενεργοποίησης των Smad, το οποίο έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη, ρυθμίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης τους, από την είσοδο και έξοδο τους από τον πυρήνα και από την αποικοδόμησή τους από το πρωτεόσωμα μέσω προσθήκης μορίων ουβικουϊτίνης.



Εικόνα 8 : Βασικό μονοπάτι του TGF-β: Ο TGF-β προσδένεται στο διμερισμένο υποδοχέα TβRII, ο οποίος φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα TβRI, στην GS περιοχή του, και αυτός με την σειρά του θα φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη Smad 2/3 αυτή θα συνδεθεί με τη Smad4 και θα εισέλθουν στον πυρήνα όπου θα προάγουν την μεταγραφή ενός γονιδίου στόχου.

1.2.9 Σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β εκτός των πρωτεϊνών Smad

Ο TGF-β μπορεί να δράσει και μέσω άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών εκτός από το μονοπάτι των Smad, οι μηχανισμοί των οποίων μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες: α) στην ενεργοποίηση μονοπατιών που περιλαμβάνουν άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα με τις Smad, τροποποιώντας τη δράση τους, β) στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται από τις ίδιες τις Smad και οι οποίες μεταδίδουν μηνύματα σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια και γ) στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα ή φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς του TGF-β ενώ παράλληλα δεν επηρεάζουν τη δράση των Smad.

Ο TGF-β ενεργοποιεί:

- Την **κινάση PI3-K** και μέσω αυτής την κινάση Akt.
- Τα μονοπάτια των **MAP κινασών**: μέσω της GTPάσης Rho ενεργοποιεί το μονοπάτι JNK, μέσω της TAK1 (MAPKK) ενεργοποιεί το μονοπάτι p38, και μέσω της Ras ενεργοποιεί το μονοπάτι των ERK1/2.
- Μέσω της GTPάσης Rho ενεργοποιεί επίσης το μονοπάτι της κινάσης **ROCK**, η οποία φωσφορυλιώνοντας ενεργοποιεί την κινάση Limk2. Η Limk2 αναστέλει την κοφιλίνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ακτίνη και οδηγεί στον αποπολυμερισμό της. Συνεπώς, ο TGFβ ευνοεί τον πολυμερισμό της ακτίνης του κυτταροσκελετού.
- Μέσω της ενεργοποίησης της φωσφατάσης PP2A αναστέλλει την **κινάση p70S6K**, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο.

1.2.10 Ρόλος του TGF-β στην ιστική επούλωση

Ο TGF-β θεωρείται κομβικός παράγων για την ιστική επούλωση στον ενήλικο δεδομένου ότι συμμετέχει σε όλες τις φάσεις. Έχει δειχθεί ότι η ιστική επούλωση στα έμβρυα, και ιδιαίτερα στα πρώτα δύο τρίτα της κύησης, διαφέρει από αυτή του ενήλικου ιστού αφού χαρακτηρίζεται από απουσία κάποιας φλεγμονώδους αντίδρασης και απουσία ουλής. Τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα, τα οποία αποτελούν σημαντικές πηγές του TGF-β, απουσιάζουν στη φάση αυτή. Με τη βοήθεια ανοσοιστοχημικών τεχνικών που πραγματοποιήθηκαν σε έμβρυα ποντικών ανακαλύφθηκε ότι τα επίπεδα του TGF-β είναι σημαντικά μειωμένα και ότι τα επίπεδα του mRNA του αυξάνονται μετά τον τραυματισμό μετά την πρώτη ώρα, ενώ μετά από 18 ώρες επαναφέρονται στα επίπεδα που ήταν πριν τον τραυματισμό. Το ερώτημα αν η περιορισμένη έκφραση του TGF-β ευθύνεται για την απουσία ουλής στις πληγές των εμβρύων είχε ως αποτέλεσμα την πραγματοποίηση των πειραμάτων προθήκης TGF-β1 σε εμβρυικές πληγές. Με την προσθήκη όμως TGF-β σε εμβρυικές πληγές παρατηρείται σχηματισμός ουλής. Αντίστροφα, σε πληγές ενήλικου η προσθήκη αντισώματος έναντι του TGF-β έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού του σχηματισμού ουλής, αποδεικνύοντας ότι τα διαφορετικά επίπεδα του TGF-β στο σημείο του τραυματισμού ευθύνονται για το μη σχηματισμό ουλής στα έμβρυα. (Clark)

1.2.11 Αυξητικός παράγων προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (Platelet-Derived Growth Factor – PDGF)

Ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (PDGF) είναι από τα ισχυρότερα μιτογόνα. Απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια, ενώ εκκρίνεται σε μεγάλες ποσότητες και από τα μακροφάγα και από διάφορα σωματικά κύτταρα. Ο PDGF ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την απόπτωση καθώς και τη σύνθεση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας.

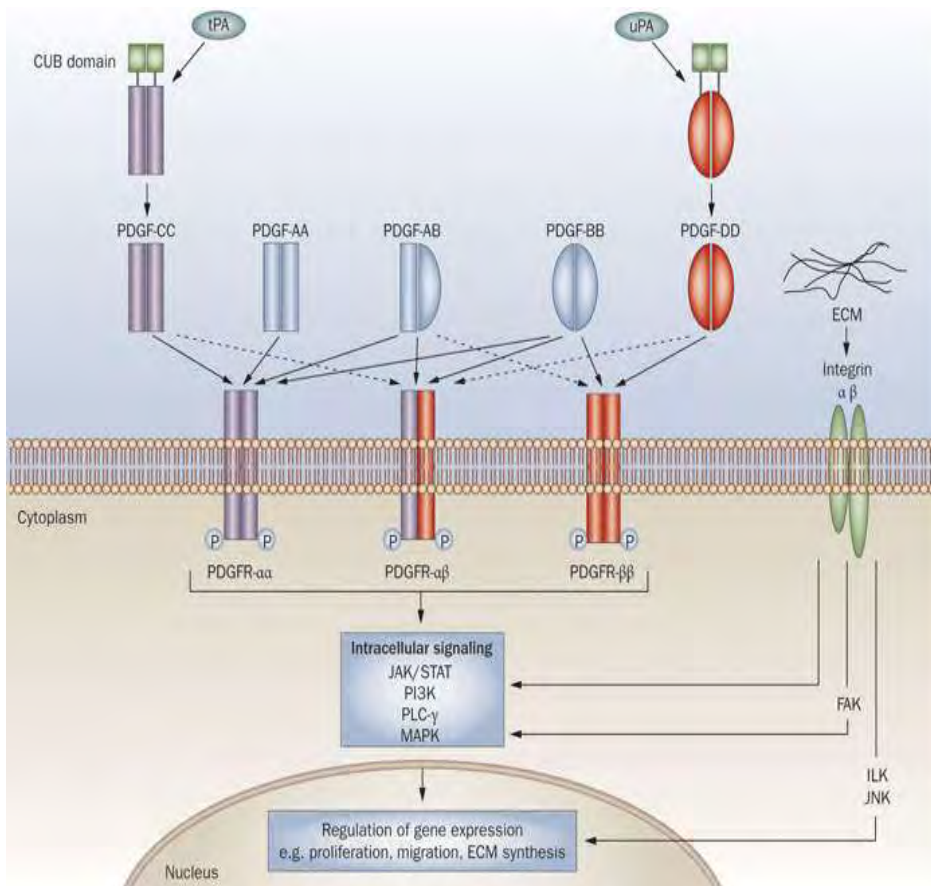
1.2.12 Δομή του PDGF

Το ενεργό μόριο του PDGF είναι διμερές, αποτελούμενο από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες τις A και B –προϊόντα διαφορετικών γονιδίων- οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας έτσι τις τρεις ισομορφές PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB. Οι ισομορφές αυτές προσδένονται στους υποδοχείς τύπου α και τύπου β, οι οποίοι ως ομοδιμερείς (PDGFR-αα) ή ετεροδιμερείς (PDGFR-ββ) έχουν διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για κάθε ισομορφή του PDGF και αυτοφωσφορυλιώνονται, καθώς έχουν ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης. Η αυτοφωσφορυλίωση είναι το κλειδί στη μεταγωγή σήματος. Οι φωσφορυλιωμένες περιοχές στο κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα αποτελούν θέσεις πρόσδεσης SH2 περιοχών. Υπάρχουν δυο διαφορετικές κατηγορίες SH2 περιοχών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος: α) αυτές που έχουν καταλυτική δράση και β) αυτές που δεν έχουν καταλυτική δράση αλλά αποτελούν το συνδετικό κρίκο

για την πρόσδεση άλλως σηματοδοτικών μορίων. Η ενεργότητα των υποδοχέων του PDGF έχει ως αποτέλεσμα την ακόλουθη ενεργοποίηση κινασών όπως η PI3-K, η Src, το μονοπάτι GRB2/SOS-Ras-Raf-Mek-ERK, η φωσφολιπάση PLC-γ, η πρωτεΐνη Shc και τη μετάδοση του σήματος του PDGF στον πυρήνα.

1.2.13 Ο ρόλος του PDGF στην ιστική επούλωση

Ο PDGF είναι ένας από τους παράγοντες ο οποίος διεγείρει την επούλωση των ιστών. Η γνώση σχετικά με το ρόλο του PDGF στην επούλωση των πληγών έχει προέλθει από τρεις σειρές ερευνών: α) μελέτες σχετικές με τα αποτελέσματα του PDGF in vitro σε διαφορετικούς σημαντικούς για την επούλωση των πληγών κυτταρικούς τύπους, β) έρευνες σχετικές με την έκφραση του PDGF και των υποδοχέων του κατά τη διάρκεια της επούλωσης των πληγών, γ) έρευνες που μελετούν το αποτέλεσμα της εξωγενούς προσθήκης του PDGF στην επούλωση των πληγών.



Εικόνα 9 : Σ' αυτή την εικόνα απεικονίζεται η δομή του PDGF. Ο PDGF είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες A και B οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας έτσι τις τρεις ισομορφές PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB. Οι ισομορφές αυτές προσδέονται στον ανάλογο υποδοχέα. Η ενεργότητα των υποδοχέων του PDGF έχει ως αποτέλεσμα την ακόλουθη ενεργοποίηση κινασών όπως η PI3-K, η Src, το μονοπάτι GRB2/SOS-Ras-Raf-Mek-ERK, η φωσφολιπάση PLC-γ, η πρωτεΐνη Shc και τη μετάδοση του σήματος του PDGF στον πυρήνα.

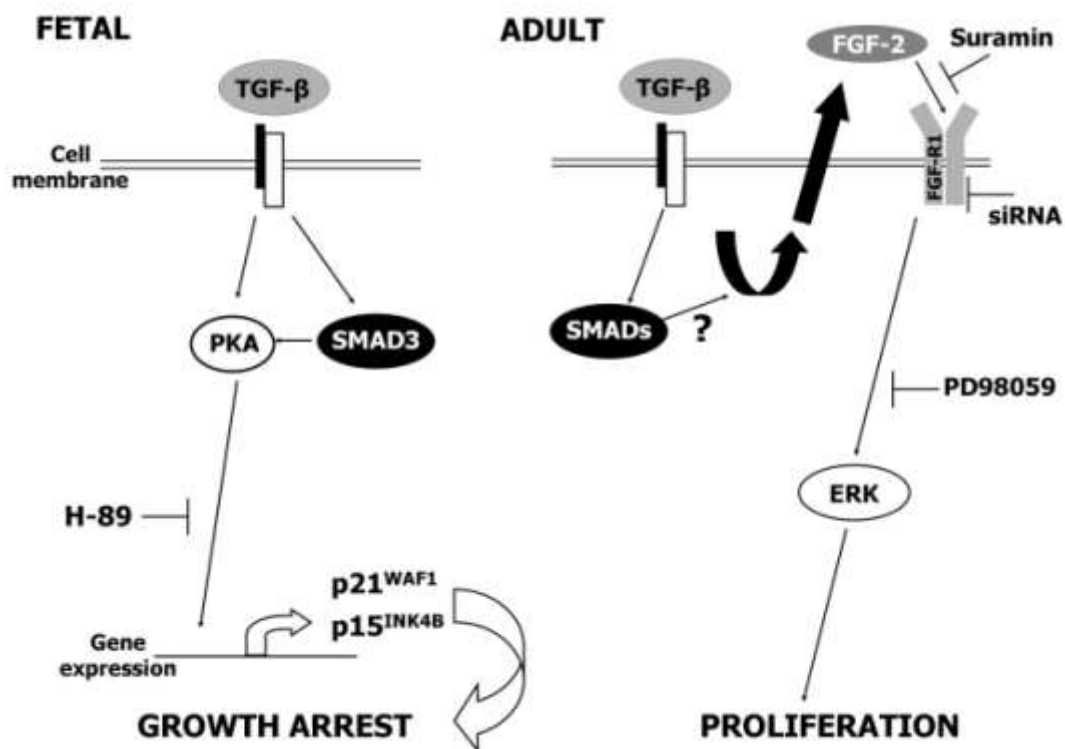
In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι ο PDGF είναι ένα ισχυρό μιτογόνο για τα κύτταρα του συνδετικού ιστού. Σημαντική είναι η ικανότητα του PDGF να προκαλούν την ενεργοποίηση των μακροφάγων για την παραγωγή και την έκκριση άλλων αυξητικών παραγόντων, σημαντικών

για την ιστική επούλωση. Παρόλο που άλλοι παράγοντες όπως ο TGF- β προκαλεί επίσης ισχυρή διέγερση για την παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας, ο PDGF έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει την παραγωγή της φιβρονεκτίνης, καθώς και του υαλουρονικού οξέος από ινοβλάστες. Ο PDGF σε συνδυασμό με τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης (IGF-I) έχει αποδειχθεί πως ενισχύει την επούλωση πληγών σε δέρμα χοίρου καθώς και σε ινδικά χοιρίδια. Επίσης, PDGF έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανός να βελτιώνει την επούλωση σε συνθήκες ανεπαρκούς επούλωσης όπως είναι σε διαβητικά ποντίκια ή μετά από ακτινοβολία.

1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGF- β ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΔΟΤΕΣ

Ο TGF- β είναι ένας πολύ-λειτουργικός αυξητικός παράγοντας. Όσον αφορά τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, ενώ είναι ανασταλτικός για τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά κύτταρα. Γνωρίζοντας επίσης τον αποφασιστικό ρόλο του TGF- β στην επούλωση της πληγής και τις διαφορετικές στρατηγικές επιδιόρθωσης πληγών στο δέρμα εμβρύων και ενηλίκων, στο εργαστήριο έχει μελετηθεί η επίδραση αυτού του αυξητικού παράγοντα στον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών από άτομα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Διαπιστώθηκε ότι ο TGF- β δρα με διαφορετικό τρόπο: ενώ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό εμβρυϊκών ινοβλαστών (μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης PKA και ακολούθως της

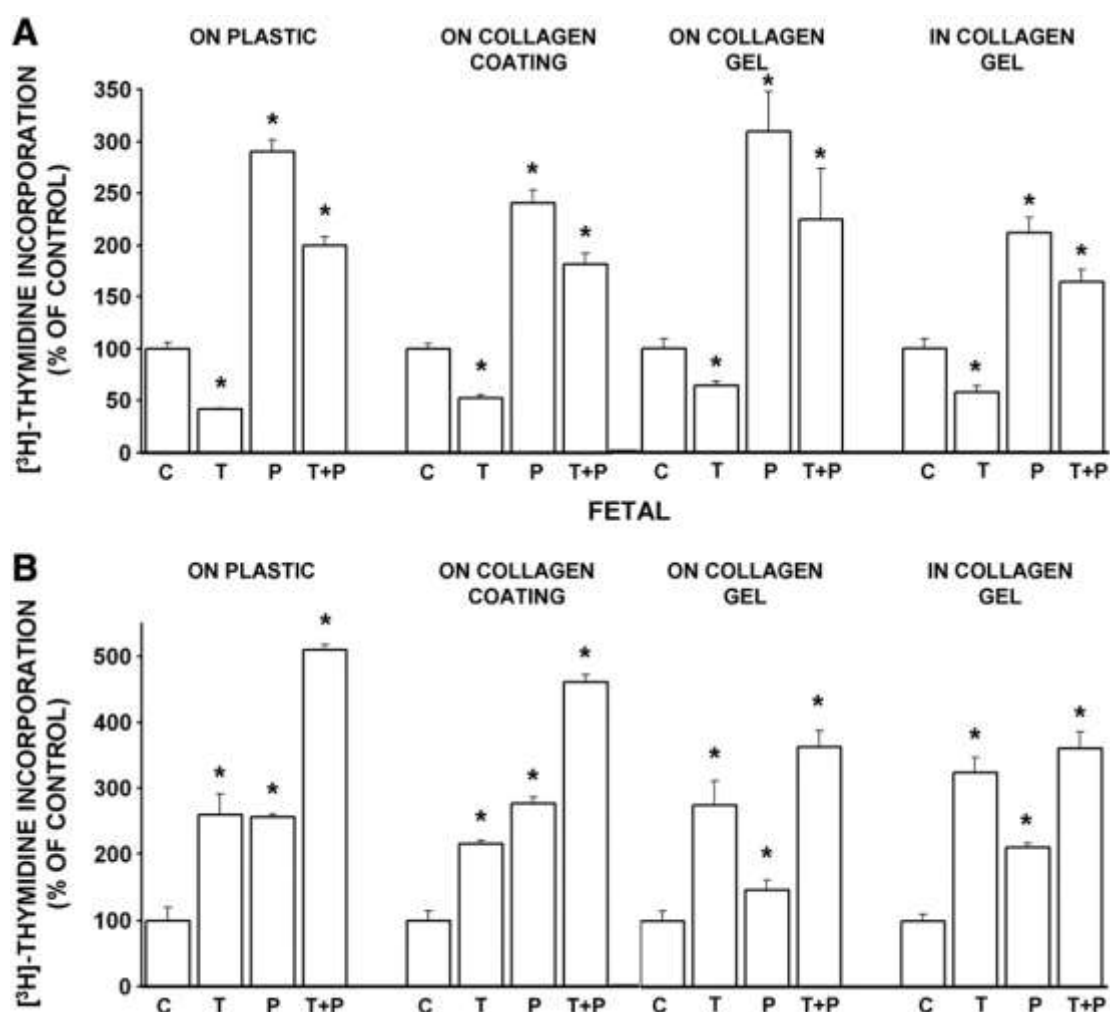
αυτορρύθμισης των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου $p21^{WAF1}$ και $p15^{INK4B}$), διεγείρει τα κύτταρα που προέρχονται από ενήλικους (με τη διαμεσολάβηση της απελευθέρωσης FGF-2 και την συνακόλουθη διέγερση του σηματοδοτικού μονοπατιού MEK-ERK) (Giannouli and Kletsas)



Εικόνα 10 : Εδώ απεικονίζεται η διαφορετική δράση του TGF-β στους δερματικούς ινοβλάστες από έμβρυο και ενήλικο δότη.

Παράλληλα, διερευνήθηκε ο ρόλος του εξωκυττάριου περιβάλλοντος στο ανωτέρω φαινόμενο και ιδιαίτερα τη συνεισφορά της εξωκυττάριας μήτρας, όπως το κολλαγόνο. Δείχθηκε ότι η διαφορετική δράση του TGF-β

σε ινοβλάστες εμβρύου και ενηλίκου παραμένει αναλλοίωτη παρουσία του κολλαγόνου. (Armatas, Pratsinis et al.)



Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες εμβρύου (A) και ενηλίκου (B) καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες, σε επιφάνειες καλυμμένες με κολλαγόνο, σε gel κολλαγόνου ή επί gel κολλαγόνου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η διαφορετική δράση του TGF-β (T) (ανασταλτική και διεγερτική αντίστοιχα) παράμεινε αναλλοίωτη. Επίσης, ο PDGF (P) ήταν διεγερτικός σε όλες τις περιπτώσεις.

Επίσης, σε πρόδρομα πειράματα μελετήθηκε ο ρόλος των μηχανικών δυνάμεων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρισδιάστατα gel κολλαγόνου, σε δύο καταστάσεις, προσκολλημένα (attached) και

απελευθερωμένα (relaxed). Τα πρώτα πειράματα έδειξαν ότι οι διάφορες μηχανικές δυνάμεις που εξασκούνται στις δύο αυτές καταστάσεις δεν επηρεάζουν τη δράση του TGF-β.

Βάσει των παραπάνω, στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

1. Η επιβεβαίωση του ρόλου των μηχανικών δυνάμεων στη δράση του TGF-β και σε άλλες κυτταρικές σειρές και
2. Η μελέτη της δράσης του TGF-β σε δερματικούς ινοβλάστες από άλλα θηλαστικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας προήλθαν από τις εξής επιλεγμένες εταιρίες αντιστοίχως:

- Το θρεπτικό υλικό Dulbeco's Minimal Essential Medium (DMEM), καθώς επίσης και η L-γλουταμίνη, τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, το πυροσταφυλικό νάτριο και το διττανθρακικό νάτριο από την Biochrom AG (Berlin, Germany).
- Ο εμβρυϊκός βόειος ορός από την Gibco.
- Οι φιάλες 75cm² από την Corning Life Sciences (Acton, MA).
- Οι πλαστικοί φυγοκεντρικοί σωλήνες και τα τρυβλία διαμέτρου 35mm από την Greiner Bio-one (Frankfurt, Germany).
- Τα τρυβλία διαμέτρου 10cm και 6cm από την Orange Sciences.
- Οι πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων από την Greiner (Germany).
- Αιμοκυττόμετρο Improved Neubauer από την Bright Line – Hausser Scientific (Horsham, U.S.A.)
- Ειδική συσκευή με φίλτρα υάλου για τη μέτρηση του DNA synthesis
- Το διάλυμα DMSO από τη Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.1 Αποστείρωση

Για την αποφυγή μολύνσεων που μπορεί να προκληθούν από βακτήρια ή μύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι αποστείρωσης:

- 1) Οι πιπέτες Pasteur, οι γυάλινες πιπέτες και τα μεταλλικά σκεύη σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης (180°C επί 90 λεπτά).
- 2) Τα γυάλινα δοχεία με πλαστικό πώμα, τα πλαστικά δοχεία, τα φίλτρα αποστείρωσης και οι συσκευές διήθησης σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (120°C για 15 λεπτά).
- 3) Τα θερμοευαίσθητα διαλύματα με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,22mm.
- 4) Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή θρεπτικού υλικού DMEM καθώς και για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων όπως PBS, σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης με γυάλινα δοχεία με πλαστικό πώμα (121 °C για 30 λεπτά).

2.2 Καλλιέργειες κυττάρων

Οι καλλιέργειες των ινοβλαστών αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη (2mM), NaHCO₃ (3,75mg/L), πυροσταφυλικό νάτριο (110,04mg/L), πενικιλίνη (50,000IU/L) και στρεπτομυκίνη (50,000IU/L). Αναπτύσσονται σε θερμοστατούμενο κλίβανο, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 95% υγρασία και θερμοκρασία 37°C. Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιούνται πλαστικά τρυβλία επιφάνειας 50cm². Οι ινοβλάστες αναπτύσσονται σε DMEM εμπλουτισμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (fetal bovine serum-FBS) 15% (v/v), έως ότου καλύψουν το 100% της επιφάνειας του πυθμένα του τρυβλίου, σχηματίζοντας μια μονοστιβάδα. Όταν η καλλιέργεια γίνει πλήρης (τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια της φιάλης κυτταροκαλλιεργειών) τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται ως εξής:

Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται με αναρρόφηση και προστίθεται 4ml διαλύματος θρυψίνης-κιτρικού νατρίου (θρυψίνη 0,25 % (w/v), κιτρικό νάτριο 10mM, NaCl 110mM, pH 7,2) έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ορού τα οποία περιέχουν αναστολέα θρυψίνης. Στη συνέχεια η θρυψίνη αναρροφάται και προστίθεται 4 ml διαλύματος θρυψίνης-κιτρικού νατρίου έως ότου η κυτταρική μονοστοιβάδα να καλυφθεί πλήρως. Τα κύτταρα τοποθετούνται στους 37°C για επώαση (περίπου 1 λεπτό) μέχρι να διαπιστωθεί μικροσκοπικά η εξής μορφολογική αλλαγή: τα κύτταρα συρρικνώνονται ελαφρώς και το περίγραμμα της κυτταρικής τους μεμβράνης γίνεται εντονότερο. Σε αυτό το σημείο αφαιρείται η περίσσεια θρυψίνης- κιτρικού νατρίου και τα κύτταρα επωάζονται για λίγα λεπτά ακόμα στους 37°C μέχρι να αρχίσουν να αποκολλώνται από τον πυθμένα του τρυβλίου. Η αποκόλληση των κυττάρων ολοκληρώνεται με ελαφριά χτυπήματα του τρυβλίου και στη συνέχεια προστίθενται 8 mL θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένο με 15% FBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις, εναιωρούνται στο θρεπτικό υλικό. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται ισομερώς σε αποστειρωμένα τρυβλία με λόγο κατανομής (splitratio) 1:2. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

2.3 Μέτρηση αριθμού κυττάρων

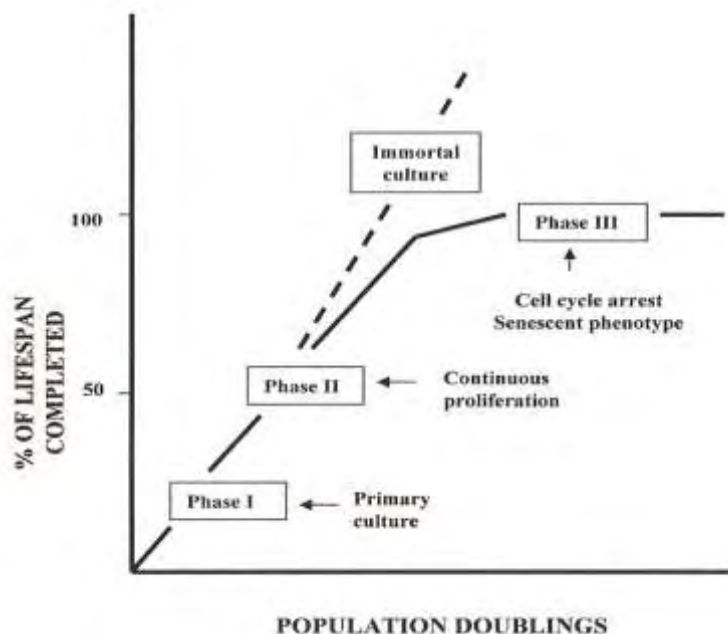
Η μέτρηση του ολικού αριθμού κυττάρων σε εναιώρημα πραγματοποιήθηκε με σωματιδιακό αναλυτή CoulterCounter (BeckmanCoulterZ1). Ινοβλάστες που βρίσκονται σε καλλιέργεια αποκολλώνται με διάλυμα θρυψίνης- κιτρικού νατρίου και στη συνέχεια

εναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 15% FBS. Στη συνέχεια, προσθέτουμε συγκεκριμένο όγκο εναιωρήματος (0,5mL) σε 12ml ισότονου αλατούχου διαλύματος IsoFlowSheathFluid και μετρώνται στο σωματιδιακό αναλυτή. Το όργανο μετρά τον αριθμό σωματιδίων που περιέχονται στο εναιώρημα, επιτρέποντας μας να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια. Ο συγκεκριμένος τρόπος είναι γρήγορος και ακριβής, όμως απαιτεί καλά επαναιωρούμενο κυτταρικό πληθυσμό, απελευθερωμένο από πάσης φύσης υπολείμματα, των οποίων η ύπαρξη αλλοιώνει τη μέτρηση του πραγματικού αριθμού των κυττάρων. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή μειονεκτεί εφόσον δεν επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

2.4 Αποθήκευση κυττάρων

Τα στελέχη των ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτήν την εργασία έχουν πεπερασμένο εύρος ζωής, σε αντίθεση με αυτά των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων. Κατά την ανακαλλιέργεια, η συμπληρωμένη μονοστιβάδα κατανέμεται σε λόγο κατανομής 1:2 και τα κύτταρα αναπτύσσονται έως ότου επανασχηματίσουν νέα μονοστιβάδα. Επομένως, ο αριθμός ανακαλλιέργειών που υφίσταται μια καλλιέργεια εξαρτάται από τον ρυθμό αναδιπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού (Cell Population Doublings-CPDs). Αυτό όμως αλλάζει για τις γηρασμένες (senescent) καλλιέργειες, δηλαδή αυτές που έχουν σχεδόν συμπληρώσει το εύρος της ζωής τους. Οι γηρασμένες καλλιέργειες αδυνατούν αισθητά να συμπληρώσουν μια

πλήρη μονοστιβάδα κατά τις τελευταίες 2-3 ανακαλλιέργειες. Ακολουθεί μια αναπαράσταση του εύρους ζωής των ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών.



Σύμφωνα με τους **Hayflick και Moorhead** (Hayflick and Moorhead 1961), τα διάφορα κυτταρικά στελέχη μπορούν να ψυχθούν στους -196°C για μακρύ χρονικό διάστημα και, αφού αποψυχθούν και επανέλθουν στους 37°C , να ανακαλλιεργηθούν και να διατηρήσουν στο ακέραιο τις ιδιότητες τους. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να συμπληρώσουν τον αριθμό CPDs που θα συμπλήρωναν αν δεν μεσολαβούσε η ψύξη/απόψυξη.

Τα δύο στελέχη των ανθρώπινων διπλοειδών δερματικών ινοβλαστών, διαφόρων CPDs (κυτταρικών γενεών), που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή, αποθηκεύτηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (στους -196°C) εντός υγρού αζώτου, με σκοπό τη δημιουργία ενός αρχείου γενεών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό είχαμε τη δυνατότητα, ανά πάσα στιγμή, να

διεξάγουμε τα πειράματά μας επάνω σε διάφορα επίπεδα κυτταρικής ηλικίωσης.

Τα κύτταρα πρέπει να φυλαχθούν σε τέτοιες συνθήκες ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη βιωσιμότητά τους κατά την απόψυξή τους και την επανακαλλιέργειά τους. Έτσι, η συλλογή των ινοβλαστών γίνεται 2-3 ημέρες μετά την ανακαλλιέργειά τους, όταν δηλαδή βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης και ο μεταβολισμός τους είναι πιο έντονος.

Η διαδικασία αποθήκευσης έχει ως εξής: Κύτταρα τα οποία έχουν καλλιεργηθεί σε φιάλες 75cm² και τα οποία βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, αποκολλώνται από τον πυθμένα. Σημειώνεται όμως, ότι δεν αφήνουμε καθόλου ίχνη θρυψίνης κατά την επώαση στους 37°C, αφού ακόμα και ίχνη θρυψίνης μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή των κυττάρων κατά την απόψυξη. Αφού τα κύτταρα αποκολληθούν από τον πυθμένα, εναιωρούνται σε 1,5ml DMEM εμπλουτισμένο με 20% (v/v) FBS και 10% (v/v) διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ο ρόλος του DMSO είναι να προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες που προκαλεί η ψύξη/απόψυξη. Συγκεκριμένα, η μείωση του σημείου πήξης που προκαλεί το DMSO εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων. Τέλος, το αιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε αποστειρωμένη πλαστική αμπούλα, η οποία κλείνεται ερμητικά. Μια άλλη σημαντική παράμετρος της διαδικασίας αυτής είναι η ταχύτητα ψύξης/απόψυξης. Προκειμένου τα κύτταρα να προστατευτούν περαιτέρω από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, πρέπει η ψύξη να είναι σταδιακή: 1hr στους -20°C, η οποία ακολουθείται από 24hrs στους -70°C και τέλος βύθιση της αμπούλας εντός υγρού αζώτου σε δεξαμενές.

Η απόψυξη πρέπει να είναι ταχεία ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων, περνώντας γρήγορα από την περιοχή -50°C έως 0°C, όπου

πιστεύεται ότι προκαλούνται οι περισσότερες καταστροφές (Coriell 1979). Συνεπώς, η αμπούλα με τα κύτταρα τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C. Αφού αποψυχθεί η αμπούλα, το περιεχόμενό της προστίθεται σε μια φιάλη 75cm² που ήδη περιέχει 10ml DMEM εμπλουτισμένο με FBS 10% (v/v). Αφού ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων, την επόμενη μέρα, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, το οποίο περιέχει DMSO, αντικαθίσταται με νέο και τα κύτταρα αναπτύσσονται κανονικά.

2.5 Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν: το εμπορικά διαθέσιμο κυτταρικό στέλεχος ανθρώπινων δερματικών ινοβλάστων από νεογνό 3 ημερών AG1523c, και τα πρωτογενή στελέχη δερματικών ινοβλαστών που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο από έμβρυο (FSF), ενήλικο δότη (DSF 85), αρουραίο (RatNSF), ποντίκι [ενήλικο (MSF) και έμβρυο (MEF)], καθώς και από γουρούνι (PSF). Επίσης, αναπτύχθηκαν κυτταρικά στελέχη από δερματικούς ινοβλάστες από την περιοχή του προσώπου (AFSF). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε πλήρες Eagle's Minimal Medium (MEM) στο οποίο είχαν προστεθεί μη απαραίτητα αμινοξέα, διάλυμα πενικιλίνης, διάλυμα στρεπτομυκίνης και L-γλουταμίνη παρουσία 10% (v/v) ορού από έμβρυο βοδιού (FBS), σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 95% υγρασία και θερμοκρασία 37 βαθμούς κελσίου (κλίβανος ThermoFormaSeriesII, Ohio, USA).

2.6 Συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων

Προκειμένου να επιτευχθεί ένα άριστο περιβάλλον για την καλλιέργεια των κυττάρων θα πρέπει να παρέχονται στα κύτταρα η κατάλληλη θερμοκρασία, το σωστό θρεπτικό υλικό με την κατάλληλη συγκέντρωση ορού και το κατάλληλο υπόστρωμα.

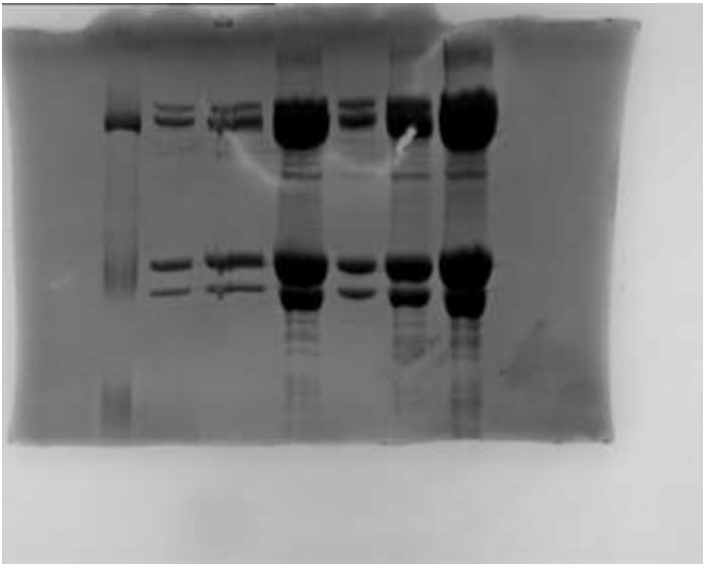
- ✓ Θερμοκρασία: Τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών αναπτύσσονται στους 37 βαθμούς κελσίου σε κατάλληλους κλιβάνους που περιέχουν 5% CO₂ (κλίβανος Thermo Forma Series II, Ohio, USA).
- ✓ Θρεπτικό υλικό: Ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων. Εκτός από τα βασικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων (αμινοξέα, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, υδατάνθρακες), το θρεπτικό υλικό περιέχει και τους κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες, ρυθμίζει το pH (7-7,4) και περιέχει τα κατάλληλα αέρια (O₂, CO₂). Στο θρεπτικό υλικό προστίθεται επίσης και 5-20% ζωικός ορός συνήθως από βόδι, διότι περιέχει αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες που βοηθούν την ανάπτυξη των κυττάρων.
- ✓ Υπόστρωμα: Τα κύτταρα που προσκολλώνται χρειάζονται ένα κατάλληλο υπόστρωμα για την επικόλληση τους και την ανάπτυξή τους πάνω στην επιφάνεια της φλάσκας ή του τρυβλίου. Υπάρχουν διάθεσιμες στην αγορά κατάλληλα επίστρωμένες μικροπλάκες που επιτρέπουν την κυτταρική προσκόλληση. Επίσης υπάρχουν παράγοντες όπως το κολλαγόνο, η λαμίνη, και η ζελατίνη που ενισχύουν ακόμα περισσότερο την προσκόλληση των κυττάρων που απομονώνονται από τους ιστούς.

2.7 Απομόνωση κολλαγόνου

Το κολλαγόνο τύπου I το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα τεχνική απομονώθηκε από τους τένοντες ουρών αρουραίων με τη μέθοδο των Michalopoulos και Pitot τροποποιημένη από τους Coulomb και συνεργάτες. Η διαδικασία γίνεται εντός εστίας νηματικής ροής και όλα τα εργαλεία (νυστέρια, ψαλίδια, λαβίδες κλπ) είναι αποστειρωμένα σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης σε θερμοκρασία 120 βαθμούς Κελσίου για δυο ώρες.

- Οι ουρές των αρουραίων κόβονται και τοποθετούνται σε διάλυμα αλκόολης 100% για 15min-1h.
- Προζυγίζουμε το αποστειρωμένο τρυβλίο petri τοποθέτησης των τενόντων.
- Το δέρμα αποκολλάται από την ουρά και στη συνέχεια απομακρύνονται οι τένοντες με τη βοήθεια νυστεριού και λαβίδας και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο τρυβλίο. Υπολογίζεται το βάρος τους (σε mg).
- Έπειτα οι τένοντες τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια και τοποθετούνται σε διάλυμα οξικού οξέος 0,1% (4mg τενόντων/ml διαλύματος).
- Ανάδευση διαλύματος στους 4 βαθμούς Κελσίου επί 72 ώρες.
- Σε στείρες συνθήκες φτιάχνουμε alicots των 40ml σε tubes και το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές αν λεπτό επί 90 λεπτά στους 4 βαθμούς Κελσίου.

- Αφαιρείται το υπερκείμενο σε στείρες συνθήκες στον απαγωγό, τοποθετείται σε αποστειρωμένα φιαλίδια και φυλάσσεται στους 4 βαθμούς.
- Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος του διαλύματος απομόνωσης κολλαγόνου. Διάλυμα κολλαγόνου διαχωρίστηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 6% και βάφτηκε με Coomassie-Brilliant Blue. Το κολλαγόνο που απομονώθηκε από ουρές αρουραίων ήταν κυρίως κολλαγόνο τύπου I. Παρατηρούνται οι κύριες ζώνες των αλυσίδων α1 και α2.



2.8 Παρασκευή gel κολλαγόνου

Για την παρασκευή 10ml διαλύματος του gel απαιτούνται:

- 700μl διττανθρακικό νάτριο
- 1ml DMEM 10x
- 8,3ml κολλαγόνο

Τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα, τοποθετούνται στα τρυβλία και αφήνονται στον κλίβανο ώστε να πολυμερισθεί το κολλαγόνο. Στη συνέχεια το gel καλύπτεται με θρεπτικό υλικό.

2.9 Διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού σύνθεσης DNA σε καλλιέργειες σε πλαστικές επιφάνειες

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

- PBS
- Διάλυμα λύσης: 0,3N NaOH και 1% (w/v) SDS
- 1% (v/v) Triton-X-100
- Διάλυμα σπινθηρισμού: 0,4% (w/v) 2,5-διφαινυλοξαζόλη (PPO), 0,01% (w/v) 1,4-δι(5-φαινυλο-2-οξαζόλυλο) βενζένιο (POPOP), σε διάλυμα τολουολίου: TritonX-100 με αναλογία 2:1

Ο προσδιορισμός βασίζεται στην προσθήκη θυμιδίνης με τρίτιο στο θρεπτικό υλικό των ηρεμούντων κυττάρων που έχουν δεχθεί το εξωτερικό ερέθισμα και την ακόλουθη επώαση στους 37 βαθμούς κελσίου, οπότε η σημασμένη θυμιδίνη ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA. Στο τέλος του διαστήματος αυτού συλλέγεται το λύμα των κυττάρων και μετράται η ποσότητα [^3H -TdR] που ενσωματώθηκε στο DNA σε μετρητή β-ακτινοβολίας με τη μέθοδο υγρού σπινθηρισμού. Η τιμή της μέτρησης αντιπροσωπεύει τη σύνθεση DNA που πραγματοποίησε η καλλιέργεια κατά το χρονικό

διάστημα που μεσολάβησε από την προσθήκη [^3H -TdR] έως τη στιγμή της συλλογής και λύσης των κυττάρων.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται με DMEM 1% FBS σε τρυβλίο 48 θέσεων και όταν καλύψουν το χώρο του φρεατίου προστίθεται DMEM 0,1% FBS για 48 ώρες με σκοπό το συγχρονισμό τους. Στη συνέχεια πραγματοποιείται προσθήκη αυξητικών παραγόντων παρουσία τριτιωμένης θυμιδίνης σε συγκέντρωση 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ για 48h. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS (500 ml) και μονιμοποίηση με 10% TCA για 10-30 min. Σκοπός χρήσης του TCA είναι η προσκόλληση των κυττάρων στο πλαστικό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ξέπλυμα με νερό βρύσης και τα μονιμοποιημένα κύτταρα αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, γίνεται λύση των κυττάρων με την προσθήκη 0,15ml/well διαλύματος λύσης (NaOH 3N/SDS 1%) και αναδεύεται για 20'-1h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιούμε δοχεία σπινθηρισμού στα οποία προσθέτουμε 3ml διαλύματος σπινθηρισμού. Στην πορεία γίνεται λήψη λύματος, τοποθέτηση στο δοχείο σπινθηρισμού, καλή ανάδευση και μέτρηση της β -ακτινοβολίας.

2.10 Διαδικασία προσδιορισμού σύνθεσης DNA σε πήκτωμα κολλαγόνου

Η διαδικασία του προσδιορισμού σύνθεσης DNA εντός πηγμάτων κολλαγόνου γίνεται ως ακολούθως. Αφαιρείται το

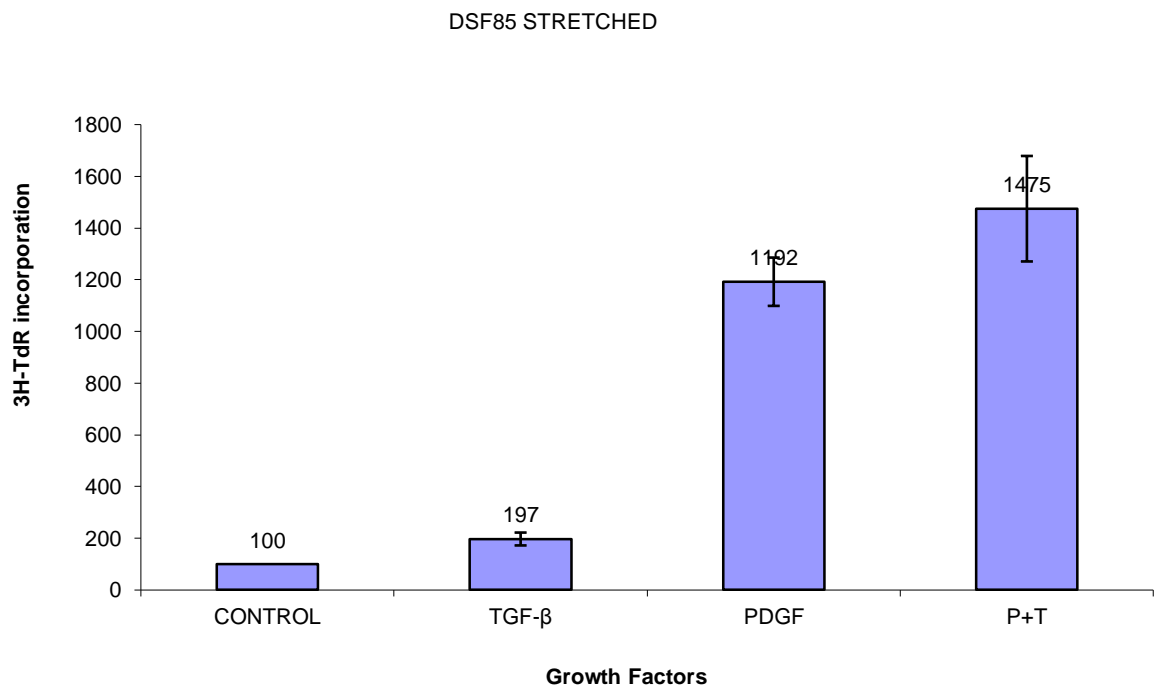
υπερκείμενο, και το gel λύεται με διάλυμα κολλαγονάσης (1 mg/ml). Στη συνέχεια το αιώρημα φυγοκεντρείται και τα κύτταρα λύνονται με διάλυμα λύσης. Προστίθεται TCA (τελικής συγκέντρωσης 10%, σε παγόλουτρο για 30 min) για τη μονιμοποίηση των κυττάρων και το διάλυμα διέρχεται μέσω φίλτρων υάλου. Τα φίλτρα αφού στεγνώσουν τοποθετούνται σε δοχεία σπινθηρισμού παρουσία υγρού σπινθηρισμού και η ραδιενέργεια μετράται σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η διαφορική δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών εμβρύου και ενηλίκου είναι ανεξάρτητη των μηχανικών δυνάμεων.

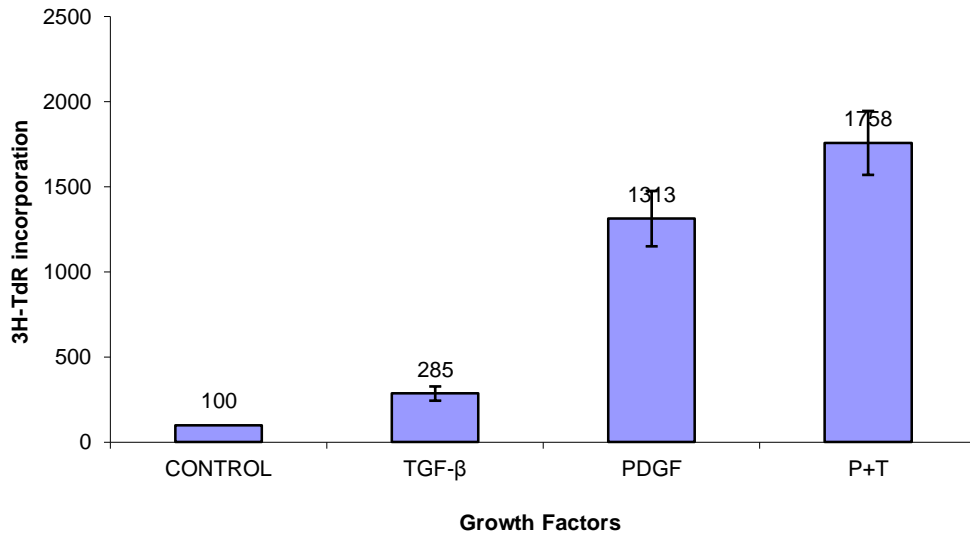
Ο TGF-β έχει διττή δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, αναστέλλει έντονα τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ επάγει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης όπως ινοβλαστών. Στο πλαίσιο αυτό, εξετάστηκε μια επιπλέον παράμετρος στην απόκριση στον TGF-β, δηλαδή το αναπτυξιακό στάδιο προέλευσης των κυττάρων. Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, αποδείχθηκε ότι ο παράγοντας TGF-β αναστέλλει τόσο τον πολλαπλασιασμό στους εμβρυικούς ινοβλάστες που καλλιεργούνται σε πλαστικές επιφάνειες όσο και το διεγερτικό αποτέλεσμα του παράγοντα PDGF. Αντίθετα, ο TGF-β διεγείρει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών ενηλίκου και δρα συνεργικά με τον PDGF, μετά την ταυτόχρονη προσθήκη και των δυο παραγόντων. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός του ότι η απόκριση τόσο του TGF-β όσο και του PDGF μένει ανεπηρέαστη μετά από καλλιέργεια των κυττάρων σε gel κολλαγόνου προσκολλημένα (attached) και απελευθερωμένα (relaxed) (Armatas A, Pratsinis et al.).

Όπως αναφέρθηκε, πρώτος στόχος της εργασίας αυτής ήταν να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αυτά και σε δύο άλλα κυτταρικά στελέχη ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών, ένα στέλεχος από δότη 85 ετών και ένα στέλεχος από έμβρυο 16 εβδομάδων κύησης .



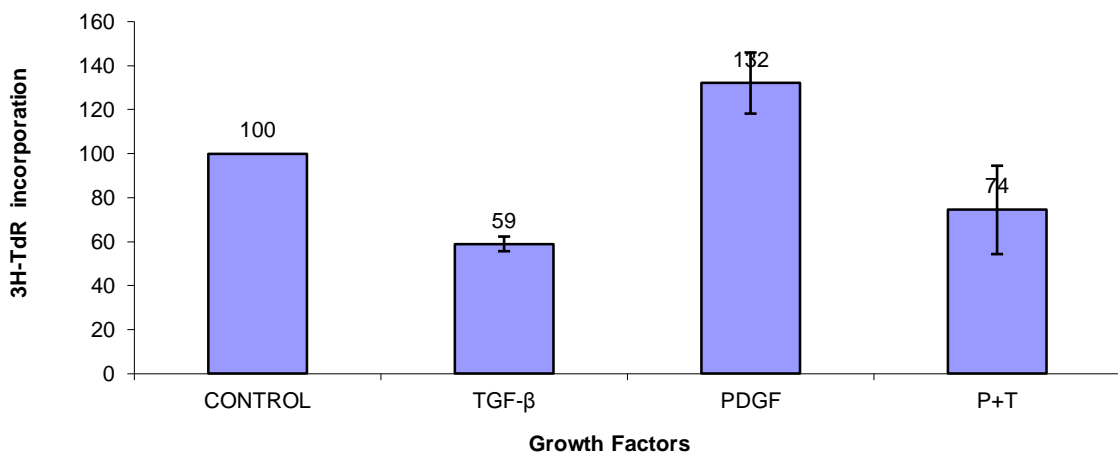
Σχήμα 3.1: Δερματικοί ινοβλάστες ενηλίκου καλλιεργήθηκαν σε ποσκολλημένα gel πολυμερισμένου κολλαγόνου τύπου I. Επώασθησαν με TGF-β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

DSF85 RELAXED



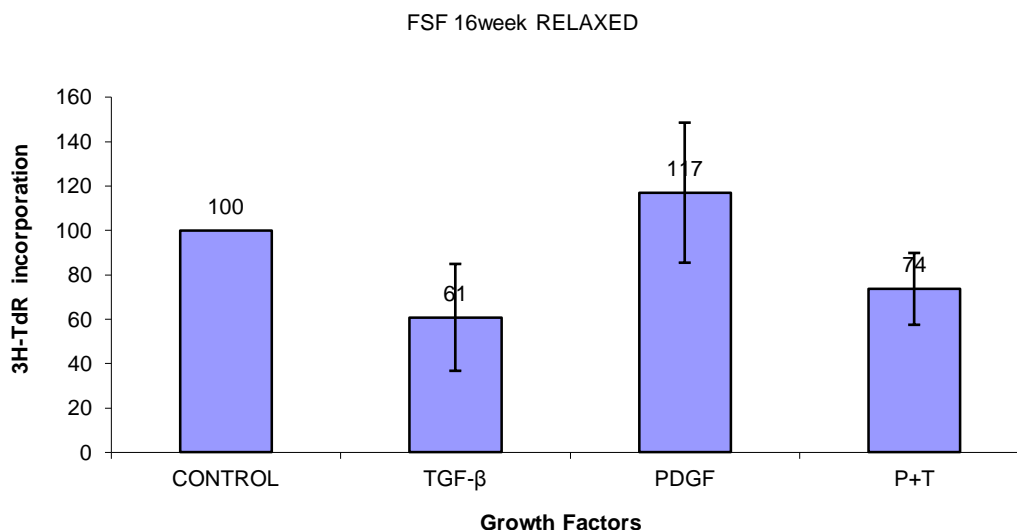
Σχήμα 3.2: Δερματικοί ινοβλάστες ενηλίκου καλλιεργήθηκαν σε απελευθερωμένα gel πολυμερισμένου κολλαγόνου τύπου I. Επώασθησαν με TGF-β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

FSF 16week stretched



Σχήμα 3.3: Δερματικοί ινοβλάστες εμβρύου επώασθησαν σε προσκολλημένα

gel πολυμερισμένου κολλαγόνου τύπου I. Η επώαση πραγματοποιήθηκε παρουσία TGF-β , PDGF καθώς και υπό την ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων. Παρατηρήσαμε μια αναστολή του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών παρουσία TGF-β ενώ ο PDGF παραμένει διεγερτικός του πολλαπλασιασμού. Υπό την ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των εμβρυικών ινοβλαστών καθώς αυτοί οι δυο αυξητικοί παράγοντες όπως έχει αποδειχθεί δρουν συνεργικά.

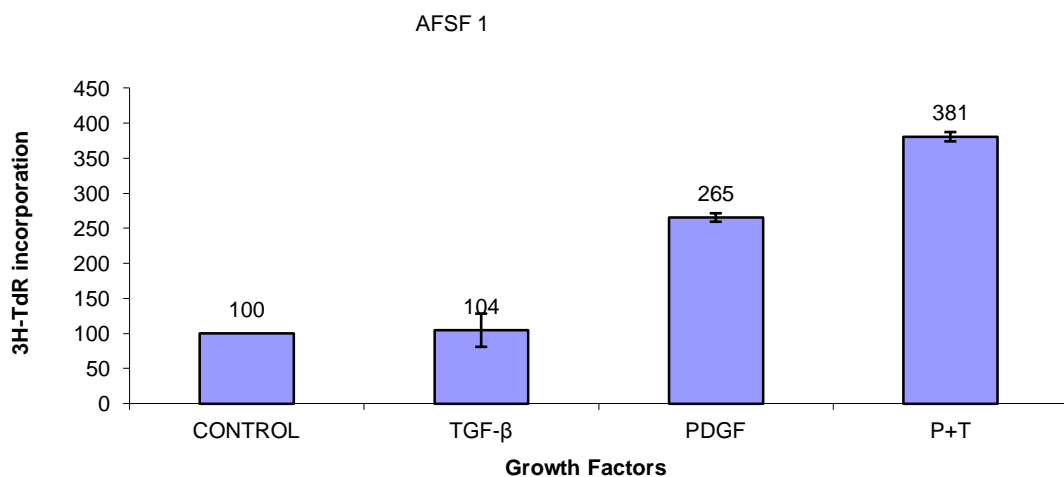


Σχήμα 3.4: Δερματικοί ινοβλάστες εμβρύου επώασθησαν παρουσία απελευθερωμένου gel πολυμερισμένου κολλαγόνου τύπου I (relaxed). Η επώαση πραγματοποιήθηκε παρουσία TGF-β , PDGF καθώς και υπό την ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά του σχήματος 3.3 καθώς οι μηχανικές δυνάμεις δεν παίζουν κάποιο ρόλο.

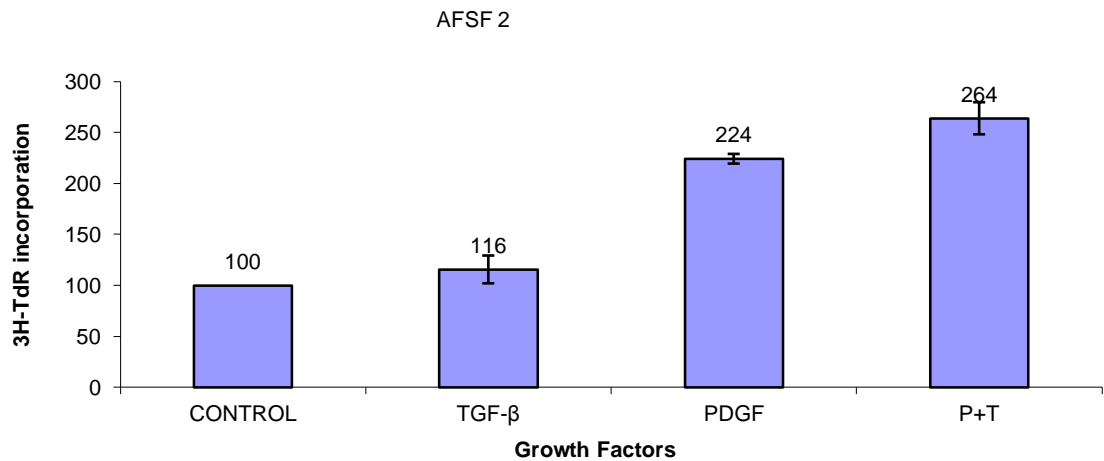
Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται μια διέγερση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών τόσο παρουσία TGF-β όσο και παρουσία PDGF. Επώαση των καλλιεργειών των ινοβλαστών παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων επιφέρει μια ακόμα πιο έντονη διέγερση. Διαπιστώνουμε επομένως, ότι οι δυο αυτοί αυξητικοί παράγοντες δρουν συνεργικά. Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα τόσο σε προσκολλημένα και απελευθερωμένα gel κολλαγόνου είναι παρόμοια. Άρα συμπεραίνουμε ότι οι μηχανικές δυνάμεις δεν επηρεάζουν σημαντικά την απόκριση των δερματικών ινοβλαστών ενηλίκου στον TGF-β.

3.1.2. Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών προσώπου.

Όλα τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες δερματικών ινοβλαστών από χέρι. Ακολούθησαν και άλλα πειράματα από δερματικούς ινοβλάστες προερχόμενους από το πρόσωπο θέλοντας να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών από δύο ενήλικους δότες.



Σχήμα 3.5: Δερματικοί ινοβλάστες προερχόμενοι από το πρόσωπο ενήλικου καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επώασθησαν με TGF-β, PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.



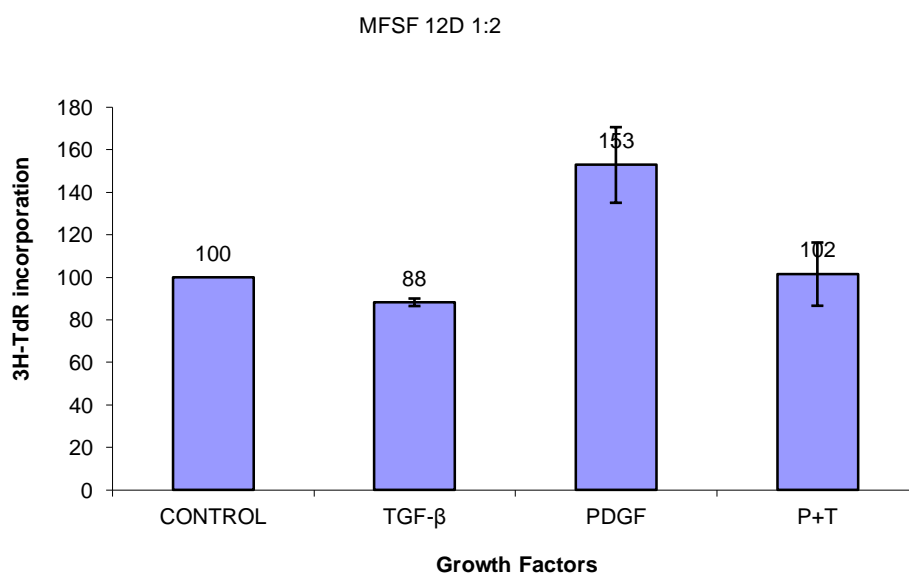
Σχήμα 3.6: Δερματικοί ινοβλάστες από το πρόσωπο ενηλίκου καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες. Επώασθησαν με TGF-β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος συμπίπτουν με τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος (σχήμα 3.5)

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σε ινοβλάστες προσώπου ο TGF-β είναι ελάχιστα διεγερτικός και σε όλες τις περιπτώσεις συνεργεί με τη διεγερτική δράση του PDGF.

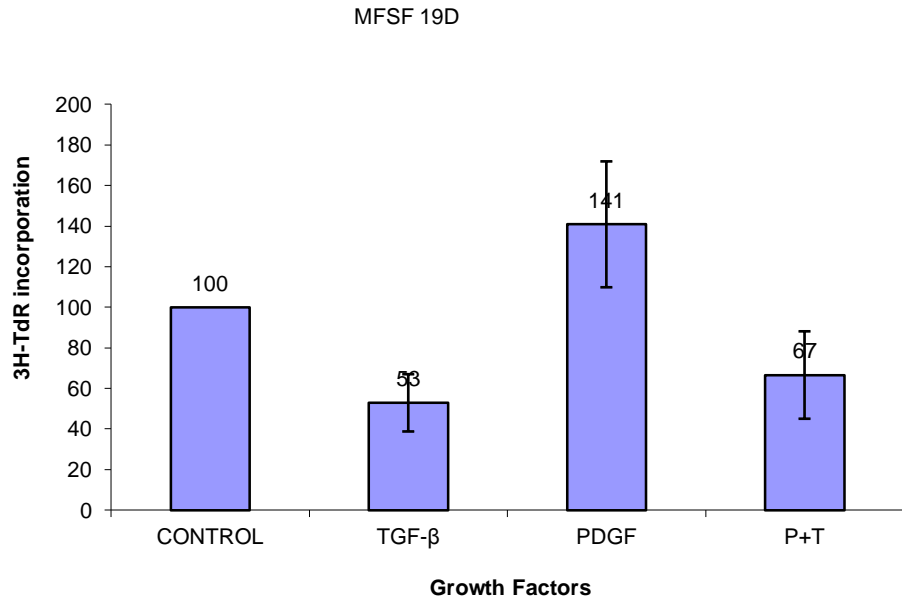
3.1.3. Η δράση του TGF-β σε δερματικούς ινοβλάστες από άλλα θηλαστικά.

Στην συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε εάν δερματικοί ινοβλάστες από άλλα θηλαστικά αποκρίνονται στον TGF-β όπως οι άνθρωποι. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στις εξής κυτταρικές σειρές: δερματικοί ινοβλάστες από αρουραίο (Rat NSF), ποντίκι [ενήλικο (MSF) και έμβρυο (MEF)], καθώς και από γουρούνι (PSF).

3.1.3.1. Μελέτη της δράσης του TGF- β δερματικούς ινοβλάστες εμβρύου ποντικού.

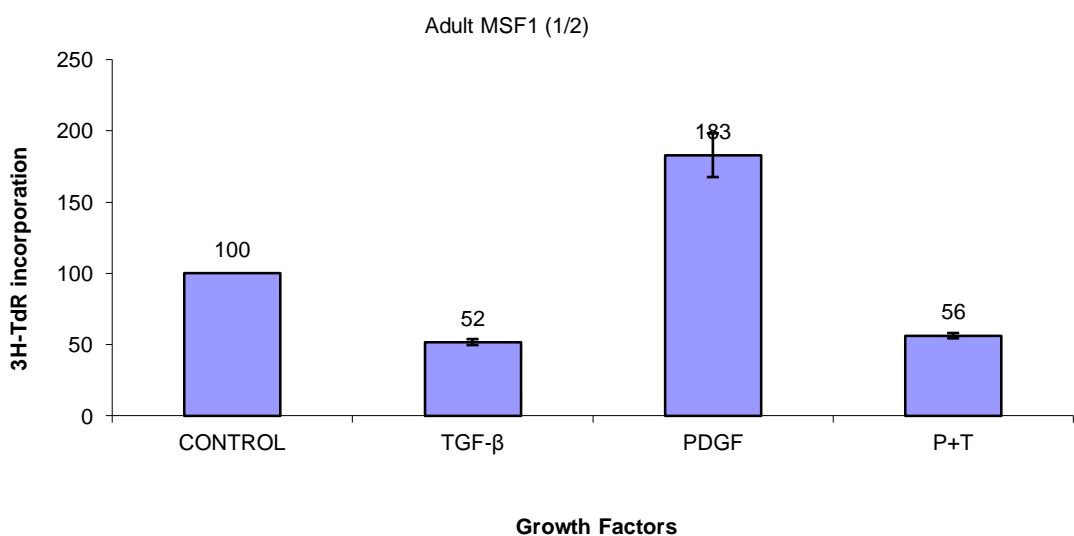


Σχημα 3.7: Δερματικοί ινοβλάστες προερχόμενοι από έμβρυο ποντικό 12 εβδομάδων καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επιάσθηκαν με TGF- β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.



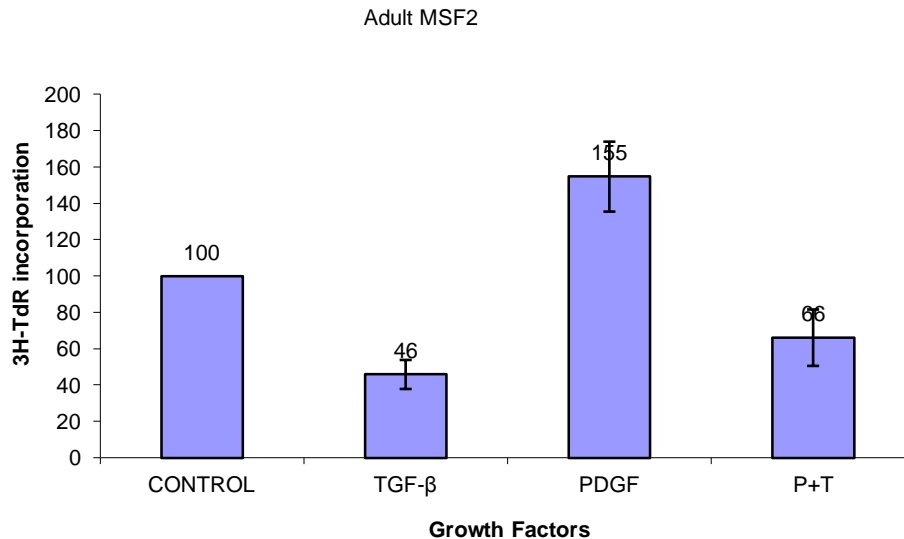
Σχήμα 3.8: Δερματικοί ινοβλάστες προερχόμενοι από έμβρυο ποντίκι 19 εβδομάδων καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επωάσθηκαν με TGF-β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

3.1.3.2. Μελέτη της δράσης του TGF-β δερματικούς ινοβλάστες ενήλικου ποντικού.



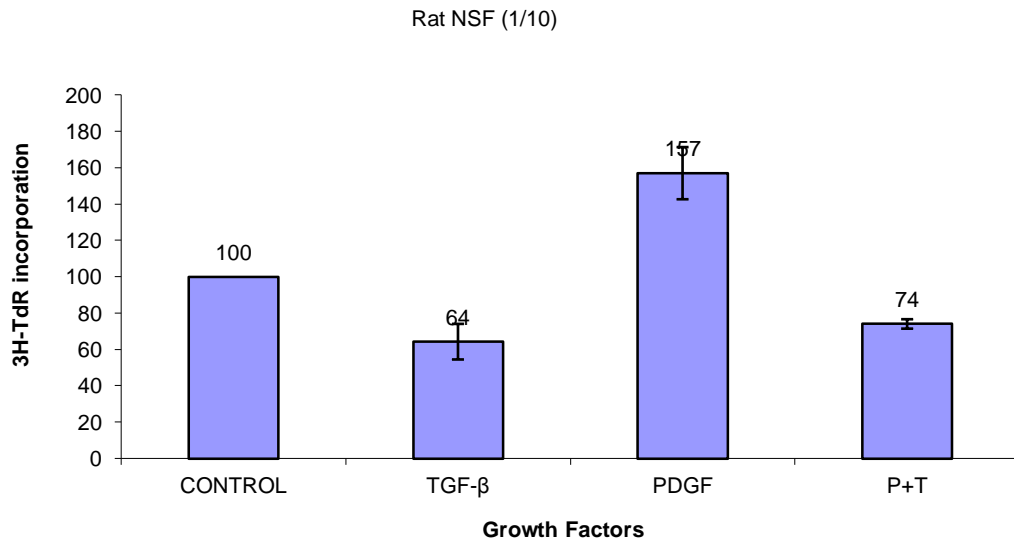
Σχήμα 3.9 : Δερματικοί ινοβλάστες προερχόμενοι από ενήλικο ποντίκι

καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επωάσθηκαν με TGF-β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

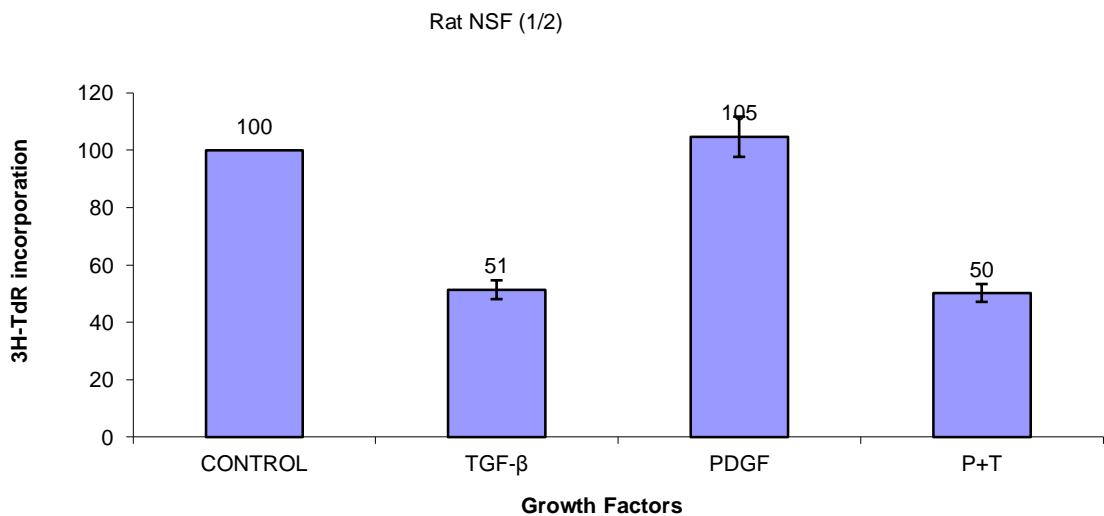


Σχήμα 3.9: Δερματικοί ινοβλάστες προερχόμενοι από ενήλικο ποντίκι καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επωάσθηκαν με TGF-β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Σε αυτή την περίπτωση, όπως και στα τρία προηγούμενα πειράματα παρατηρείται αναστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών από ποντίκι ενώ ο PDGF παραμένει διεγερτικός.

3.1.3.3. Μελέτη της δράσης του TGF- β δερματικούς ινοβλάστες ενήλικου αρουραίου.



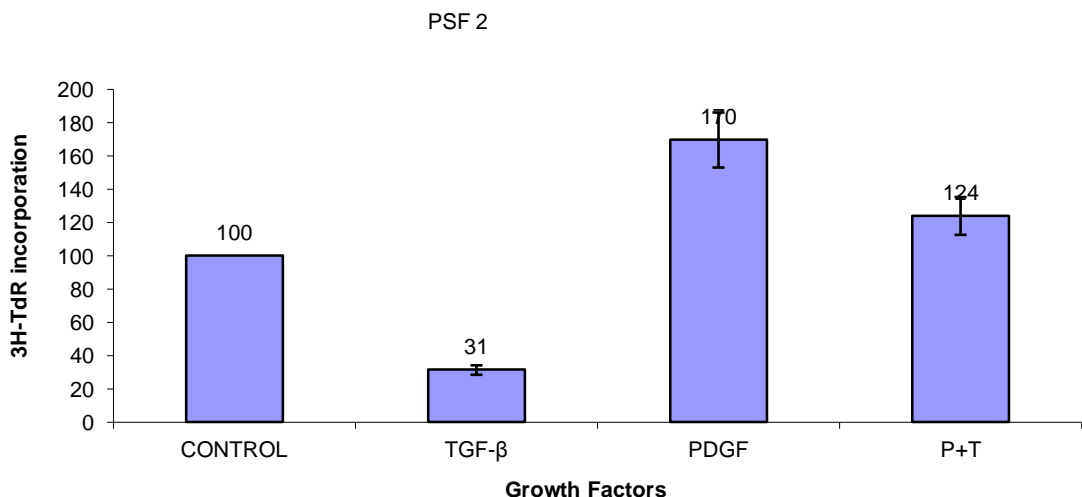
Σχήμα 3.10 : Δερματικοί ινοβλάστες από ενήλικο αρουραίο καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επιάσθηκαν με TGF- β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.



➤ **Σχήμα 3.11:** Δερματικοί ινοβλάστες ενήλικου αρουραίου καλλιεργήθηκαν

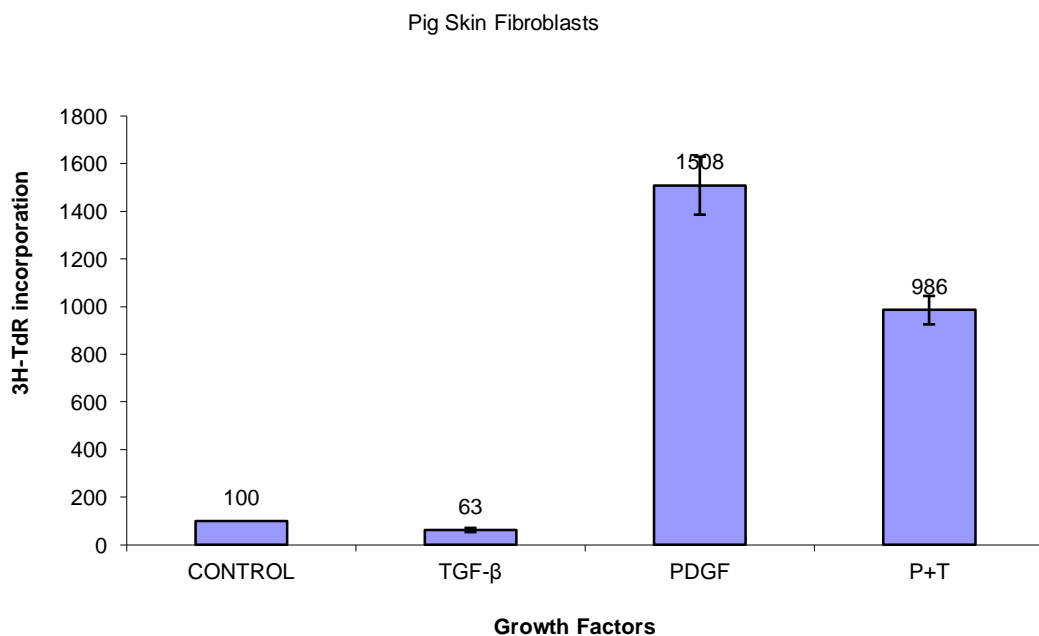
σε πλαστικές επιφάνειες 48well plate. Επώασθησαν με TGF- β , PDGF καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτιωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα σε καλλιέργειες δερματικών ινοβλαστών από αρουραίο παρατηρείται έντονη αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών ύστερα από επώαση με TGF- β , ενώ ο PDGF παραμένει διεγερτικός. Επώαση της καλλιέργειας υπό την ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων επιφέρει αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού

3.1.3.4. Μελέτη της δράσης του TGF- β δερματικούς ινοβλάστες ενήλικου γουρουνιού.



Σχήμα 3.11 : Δερματικοί ινοβλάστες ενήλικου γουρουνιού καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα,

επώασθησαν με $TGF-\beta$, $PDGF$ καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.



Σχήμα 3.12: Δερματικοί ινοβλάστες προερχόμενοι από ενήλικο γουρούνι καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες. Επώασθησαν με $TGF-\beta$, $PDGF$ καθώς και με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων και τριτωμένης θυμιδίνης Η μέτρηση της σύνθεσης DNA έγινε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα σε καλλιέργειες δερματικών ινοβλαστών από γουρούνι παρατηρείται αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών

ύστερα από επώαση με TGF-β, ενώ ο PDGF παραμένει διεγερτικός. Επώαση της καλλιέργειας υπό την ταυτόχρονη παρουσία και των δυο αυξητικών παραγόντων επιφέρει αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού.

Συμπεραίνουμε επομένως, ότι ο TGF-β δε δρα με τον ίδιο μηχανισμό στα διάφορα είδη και στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, παρά το γεγονός του ότι στους ανθρώπινους ινοβλάστες είχαμε αναστολή ή διέγερση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών από εμβρυικούς ή ενήλικους δότες αντίστοιχα, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα είδη (ποντίκια, αρουραίους, γουρούνια) διαπιστώθηκε έντονη αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Διαφορετικοί μηχανισμοί ιστικής επούλωσης σε ενήλικες και έμβρυα

Ο TGF-β είναι ένας πολυλειτουργικός αυξητικός παράγοντας. Έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ είναι ανασταλτικός για τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά κύτταρα. Ο PDGF είναι ένας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας και αποτελεί ισχυρό μιτογόνο που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια. Ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό την απόπτωση καθώς και τη σύνθεση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας.

Όπως προαναφέραμε ένας από τους πιο αντιπροσωπευτικούς μηχανισμούς ομοιοστασίας είναι αυτός της επούλωσης των πληγών, ο οποίος στοχεύει στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας των ιστών. Ωστόσο εντοπίζονται αρκετές διαφορές κατά την επούλωση των πληγών στα έμβρυα και στους ενήλικες. Σε αντίθεση με τους ενήλικες οι πληγές στα έμβρυα και συγκεκριμένα κατά τα δυο πρώτα στάδια της κήσης, ιαίνονται χωρίς το σχηματισμό ουλής και απουσία συστολής. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι οι ινοβλάστες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την επούλωση της πληγής, παρουσιάζουν κάποιες διαφορές ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του δότη (Kondo and Yonezawa 1995, Cullen et al.1997). Ειδικότερα οι εμβρυικοί ινοβλάστες συνθέτουν περισσότερο κολλαγόνο και κυρίως κολλαγόνο τύπου III και IV, από ότι οι ινοβλάστες ενηλίκου, οι οποίοι συνθέτουν κυρίως κολλαγόνο τυπου I. Επίσης μεταναστεύουν με πιο γρήγορους ρυθμούς

και αυτό φαίνεται να επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίον εναποτίθενται και διασυνδέονται τα μόρια του κολλαγόνου στην εξωκυττάρια μήτρα. Όσον αφορά τη δράση του TGF-β στους ινοβλάστες εμβρύου και ενηλίκου, έχει αναφερθεί ότι η επώαση με οποιαδήποτε από τις τρεις ισομορφές του TGF-β μειώνει την ικανότητα συστολής και την έκφραση μιας σειράς ιντεγκρινών μόνο στους εμβρυικούς ινοβλάστες (Moulin et al. 2001). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η δράση του TGF-β βρέθηκε να προκαλείται ποιοτικά και ποσοτικά σχεδόν ισοδύναμα και από τις τρεις ισομορφές του TGF-β. (Pratsinis et al. 2004). Τέλος έχουν επισημανθεί διαφορές στην έκκριση διαφόρων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, όπως το κολλαγόνο και η ινονεκτίνη μετά από επώαση των κυττάρων με TGF-β (Bullard et al. 2003).

4.1.1 Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών διαφέρει ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του δότη.

Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μελετήθηκε ο μηχανισμός της διαφορικής απόκρισης του πολλαπλασιασμού δερματικών ινοβλαστών εμβρύου και ενηλίκου στον TGF-β. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των εμβρυικών ινοβλαστών, ενώ διεγείρει τους ινοβλάστες των ενηλίκων. Η διαφορική αυτή απόκριση φαίνεται ότι οφείλεται στη συμμετοχή διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Ειδικότερα στους εμβρυικούς ινοβλάστες όπου τα επίπεδα ενεργοποίησης Smad 3 από τον TGF-β είναι υψηλά, ο TGF ενεργοποιεί την PKA η οποία επιτρέπει τη μεταγραφή και τη μετάφραση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21^{CIP1/WAF1} και p15^{INK4B} που οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού

κύκλου. Η αναστολή αυτή προκαλείται μέσω της σύνθεσης των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών όπως της p21^{CIP1/WAF1} και p15^{INK4B} οι οποίες δεσμεύονται στα σύμπλοκα της κυκλίνης D-Cdk4/6 E-Cdk2 και με αυτόν τον τρόπο τις αδρανοποιούν. Έτσι λοιπόν αποτρέπεται η είσοδος του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Επομένως ο TGF-β επάγει την έκφραση των παραπάνω αναστολέων. Αντίθετα στους ινοβλάστες ενηλίκων παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή αύξηση των p21^{CIP1/WAF1} και p15^{INK4B} και αυτό μόνο τις 6 πρώτες ώρες μετά την προσθήκη του παράγοντα (Hannon and Beach 1994, Datto et al 1995). Σε πρόδρομα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η ανασταλτική δράση του TGF-β στους εμβρυικούς ινοβλάστες αίρεται από την παρουσία της κουρκουμικίνης (Pratsinis et al. 2004) ενός αναστολέα του μονοπατιού των JNK1/2 και AP-1.

Στους δερματικούς ινοβλάστες ενηλίκου ο TGF-β α) επάγει την αύξηση της εκκρινόμενης μιτογόνου ισομορφής του FGF-2, β) ενεργοποιεί την απελευθέρωση αυτής της ισομορφής στο υπερκείμενο μέσω της καλλιέργειας ινοβλαστών. Όσο αναφορά τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TGF-β σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η PKA. Η PKA βρέθηκε ότι ενεργοποιείται από τον TGF-β μόνο στους ινοβλάστες εμβρύου και όχι ενηλίκου. Ο ειδικός αναστολέας H-89, οποίος βρέθηκε ότι παρεμποδίζει αποτελεσματικά την ανασταλτική δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό των εμβρυικών ινοβλαστών πράγματι αναστέλλει την PKA. Επίσης βρέθηκε ότι ο H-89 παρεμποδίζει τόσο την ενεργοποίηση της PKA από τον TGF-β όσο και από την φορσκολίνη η οποία είναι κλασικός αγωνιστής της αδενυλικής κυκλάσης και ενεργοποίησης της PKA (Seamon and Daly 1986). Η FGF-2 είναι ο αυξητικός παράγοντας στον οποίο οφείλεται η

πολλαπλασιαστική δράση του TGF-β για τους ινοβλάστες ενηλίκου και βρέθηκε ότι επάγει ισχυρά την αύξηση του FGF-2 στο υπερκείμενο της καλλιέργειας των κυττάρων ενηλίκου 2 ώρες μετά την προσθήκη του. (Giannouli and Kletsas 2005). Μελετήθηκε στη συνέχεια η συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού των MEK 1/2/ERK-1/2 στη διαφορική ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των δερματικών ινοβλαστών από τον TGF-β. Βρέθηκε ότι τόσο ο TGF-β όσο και ο FGF-2 προκαλούν αύξηση της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 (Powers et al.). Όμως υπάρχει διαφορά στην κινητική αυτής της φωσφορυλίωσης καθώς ο FGF-2 προκαλεί ταχύτατη φωσφορυλίωση ενώ ο TGF-β παρουσιάζει σταδιακή και αυξανόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με ένα αυτοκρινή μηχανισμό πιθανότατα μέσω του FGF-2. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι ο TGF-β ενεργοποιεί τις ERK1/2 μέσω του FGF-2 μόνο στους ινοβλάστες ενηλίκου και όχι στους ινοβλάστες εμβρύου, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν ακολουθείται ο ίδιος μηχανισμός μετάδοσης σήματος και ότι οι ERK1/2 παίζουν ρόλο μόνο στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού. (C.Giannouli and D.Kletsas 2005)

4.1.2 Η δράση του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών είναι ανεξάρτητη των μηχανικών δυνάμεων.

Οι μηχανικές δυνάμεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επούλωσης, με πιο χαρακτηριστική εφαρμογή στη διαδικασία της συστολής της πληγής. Για να μελετήσουμε το ρόλο τους στην πολλαπλασιαστική δράση του TGF-β καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε

τρισδιάστα gel πολυμερισμένου κολλαγόνου, που αποτελούν ένα σύστημα προσομοίωσης της δερμίδας in vivo. Χρησιμοποιήσαμε δύο συνθήκες, τα προσκολλημένα και απελευθερωμένα gel, στα οποία εξασκούνται στα κύτταρα εντελώς διαφορετικές δυνάμεις. Και στις δύο περιπτώσεις η δράση του TGF- β παρέμεινε αναλλοίωτη, υποδεικνύοντας ότι η δράση του παράγοντα αυτού είναι ανεξάρτητη των μηχανικών δυνάμεων.

4.2 Η δράση του TGF- β στον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών από άνθρωπο όσο και από άλλα θηλαστικά.

Όπως προαναφέρθηκε, στο παρελθόν είχαν πραγματοποιηθεί πειράματα σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες χεριού. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το φαινόμενο και σε ινοβλάστες προσώπου. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στα κύτταρα αυτά ο TGF- β έχει ασθενή διεγερτική δράση, αλλά συνεργεί έντονα με τη διεγερτική δράση του PDGF.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα και σε δερματικούς ινοβλάστες από άλλα θηλαστικά. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε τη δράση του TGF- β σε δερματικούς ινοβλάστες ποντικού (εμβρυϊκούς και ενηλίκου), ενήλικου αρουραίου και ενήλικου γουρουνιού. Σε όλες τις περιπτώσεις ο TGF- β ήταν ανασταλτικός και ανέστειλε και τη διεγερτική δράση του PDGF. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στη δράση του TGF- β σε ινοβλάστες ανθρώπου και άλλων θηλαστικών.

5 REFERENCES

Yates CC., Hebda P., Wells A. 2013. *Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution.*

Clark *The molecular and cellular biology of wound repair.*

Giannouli C. and Kletsas D. 2005. *Tgf- β regulates differentially the proliferatio of fetal and adult human skin fibroblasts via the activation of PKA and the autocrine action of FGF-2. Cell Signal.*

Kletsas D, Pratsinis H., Mavrogonatou E., Aggelopoulou M., and Kouroumalis A. 2014. *The different proliferative response of fetal and adult human skin fibroblasts to TGF- β is retained when cultured in the presence of fibronectin or collagen.*

Ferguson, M. W. J. and S. O’Kane (2004). *Scar free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention*

Haralson and Hassel (1995). *Extracellular Matrix.*

Pratsinis H., Giannouli C., Zervolea I., Psarras S., Stathakos D. and Kletsas D. 2004. *Differential proliferative response of fetal and adult human skin fibroblasts to transforming growth factor-beta.*

Lutz: *Integration of TGF- β pathway into the cellular signalling network, Cellular Signaling 2002.*

Powers and A. Wellstein.2000. *Fibroblasts growth factors, their receptors and signaling.*

Wuff, B. and A. Parent (2012). *Mast Cells Contribute to Scar Formation during Fetal Wound Healing.*

Kletsas D., D. Sthathakos, V. Sorrentino, and L. Philipson. 1995. *The growth inhibitory block of TGF- β is located close to the G1/S border in the cell cycle.*

Moulin V., B. Y. Tam., G. Castrilloux, F. A. Auger, M. D. O'Connor-McCourt, A. Phillip. 2001. *Fetal and adult human skin fibroblasts display intrinsic differences in contractile capacity.*

Roberts, A. B., Sporn M.B 1996: *Transforming Growth Factor-beta. The molecular and cellular biology of wound repair.*

Bullard K. M., Longaker M. T . and H. P. Lorenz.2003. *Fetal wound healing: current biology.*

Flanders, K. C., Kim E. S., and A. Roberts. 2001. *Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo*

Moustakas A., Pardali K., Gaal A. and C.H. Heldin. 2002. *Mechanisms of Tgf- β signaling in regulation of cell growth and differentiation.*

