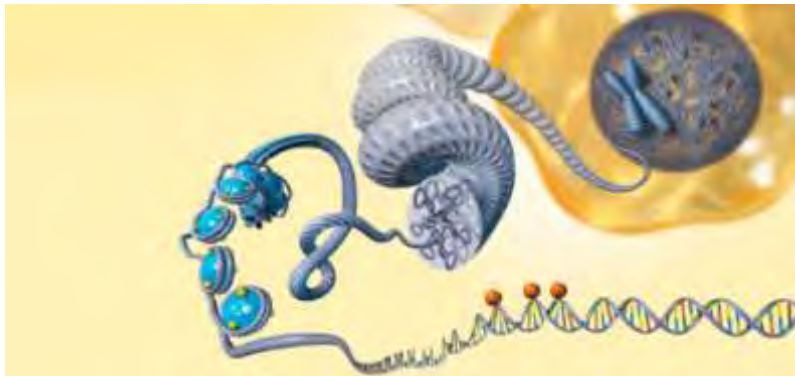


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη του ρόλου των ενζύμων που επάγουν επιγενετικές τροποποιήσεις στην παθογένεια της Πνευμονικής Ίνωσης »



ΜΠΑΡΜΠΑΓΙΑΝΝΗ ΗΛΙΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

«Μελέτη του ρόλου των ενζύμων που επάγουν επιγενετικές τροποποιήσεις στην παθογένεια της Πνευμονικής Ύψωσης»

" The role of the enzyme -inducing epigenetic changes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis "

Επιβλέπων :Αϊδίνης Βασίλης , Ερευνητής Α' Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Αϊδίνης Βασίλης

**Ερευνητής Α'
Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών
Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος
Φλέμινγκ»**

Σαραφίδου Θεολογία

**Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Μαμούρης Ζήσης

**Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Πρόλογος

Το θέμα της εργασίας μου αφορά τις επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στη δομή και όχι στις βάσεις του DNA, και ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης. Επικεντρωθήκαμε σ' αυτές τις τροποποιήσεις λόγω του όλου και μεγαλύτερου ρόλου που βρίσκεται να παίζουν σε σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος, καθώς επίσης και γιατί η πνευμονική ίνωση είναι μια θανατηφόρα ασθένεια με άγνωστη αιτιολογία, που η πρόγνωση της είναι χειρότερη από αυτή του καρκίνου. Οι στόχοι που τέθηκαν ήταν να βρεθεί αν υπάρχει αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις *in vivo* σε ποντίκια που πάσχουν από πνευμονική ίνωση. Η πιθανή αλλαγή στην έκφραση τους μπορεί να εμπλέκεται στη παθογένεια της νόσου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αιδίνη, ερευνητή Α του ΕΚΕΒΕ Φλέμινγκ,. Που μου έδωσε την ευκαιρία να την διπλωματική μου στο εργαστήριο Ανοσολογίας σ' ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς φοιτητές και μεταδιδακτορικούς ερευνητές για την βοήθεια που μου έδωσαν. Πιο συγκεκριμένα την Ελεάννα Καφφέ, μεταδιδακτορική ερευνήτρια που με επέβλεπε καθημερινά και μου εξηγούσε τα πάντα, τον Νίκο Ξυλουργίδη-μεταδιδακτορικό ερευνητή για την συνεργασία και την βοήθεια του σε *in silico* μελέτη της εργασίας. Τέλος τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Μαρκέλλα Ζαννίκου, Εύη Βλαχοπούλου, Χριστιάννα Μαγκριώτη, Βαγγέλη Διολέτη και τις διδακτορικές φοιτήτριες Αγγελική Κατσίφα και Ιωάννα Νίνου που ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν και να απαντήσουν σε οποιαδήποτε ερώτηση.

Περίληψη

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ ή IPF) είναι μια θανατηφόρα ασθένεια, αγνώστου αιτιολογίας. Τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στον πνεύμονα, που φυσιολογικά παράγεται ως απόκριση στην επούλωση πληγών. Υπάρχει το ζωικό μοντέλο της μπλεομυκίνης για την ΙΠΙ, το οποίο αναπαριστά τα βασικά χαρακτηριστικά της σε ζώα. Οι επιγενετικές αλλαγές από την άλλη κερδίζουν έδαφος ως υπεύθυνοι μηχανισμοί στην παθογένεση πολλών σοβαρών ασθενειών. Με τη βοήθεια της *in silico* αναζήτησης των γονιδίων που προκαλούν επιγενετικές αλλαγές, τα οποία υπερ /υπο-εκφράζονται στην ΙΠΙ και της *in vivo* ποσοτικοποίησης τους, μπορούμε να βρούμε ποια από αυτά ίσως να παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας.

Από αυτά τα δεδομένα επικεντρωθήκαμε στο γονίδιο SMYD3 που κωδικοποιεί για μια H3-K9 μεθυλο-τρανσφεράση, το οποίο έχει βρεθεί να παίζει ρόλο σε περιπτώσεις καρκίνου κ.α. Στην πειραματική πνευμονική ίνωση που επάγεται σε ζώα αγρίου τύπου μετά από οροτραχειακή ένεση μπλεομυκίνης, η έκφραση του γονιδίου μειώνεται στα ζώα που νοσούν σε σχέση με τα φυσιολογικά. Θέλοντας να δούμε αν αυτή η μείωση εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου, προκαλέσαμε ΙΠΙ σε knock-out smyd3 ποντίκια με το γνωστό μοντέλο της μπλεομυκίνης, ώστε να συμπεράνουμε αν υπάρχει διαφορά στην εμφάνιση της ασθένειας, σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου που νοσούν.

Σε ένα πρώτο πιλοτικό πείραμα παρατηρήθηκε αυξημένη θνησιμότητα και τάση για επιδείνωση της νόσου στα knock-out smyd3. Μελλοντικά πειράματα με μεγαλύτερο αριθμό ζώων θα αποσαφηνίσουν αν η εμπλοκή του SMYD3 στους μηχανισμούς παθογένεσης της ΙΠΙ είναι σημαντική.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a fatal disease of unknown etiology. Key features of the disease is the increased collagen deposition in the lung, which is normally produced in response to wound healing. There is the animal model of bleomycin induced fibrosis in animal, which reproduces the basic features of IPF. The epigenetic changes on the other gaining ground as responsible mechanisms in the pathogenesis of many serious diseases. With the help, of in silico search for genes that cause epigenetic changes, which are overexpressed or deregulated in IPF and their in vivo quantification, we can find which of these may play a role in the disease.

From these data we focused on SMYD3 gene encoding a H3-K9 methyl transferase, which has been found to play a role in cancers etc. In the experimental pulmonary fibrosis induced in wild type animals after orotracheal injection of bleomycin, SMYD3 expression is reduced in animals compared to normal. Next, we study if this reduction is involved in the pathogenesis of the disease in the SMYD3 knock-out mice by inducing fibrosis in SMYD3 knock out mice and their littermate controls (SMYD3^{+/+}, SMYD3^{+/-}). In a first pilot experiment, we found increased mortality and a tendency for disease exacerbation in the alive knock-out smyd3 mice. Future experiments with more animals will clarify if the involvement of SMYD3 in the pathogenetic mechanisms of IPF is important.

Περιεχόμενα

«Μελέτη των επιγενετικών τροποποιήσεων στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση»	1
Πρόλογος	2
Περίληψη	3
1.Εισαγωγή	7
1.1. Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση	7
1.1.1.Επιδημιολογία	7
1.1.2.Συμπτώματα και διάγνωση	7
1.1.3. Μηχανισμοί παθογένεσης	8
1.1.4.Πειραματικό Μοντέλο της πνευμονική ίνωσης	10
1.2. Επιγενετικές Τροποποιήσεις.....	12
1.2.1.Επιγενετικές τροποποιήσεις στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση	14
1.2.2. Ρόλος και χαρακτηρισμός του γονιδίου SMYD3.....	16
2.Πειραματικό Μέρος-Ανάλυση Τεχνικών	17
2.1.Insilico μελέτη για την αναζήτηση ενός πιθανού ρόλου των επιγενετικών ενζύμων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης	17
2.2.Ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιγενετικών ενζύμων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.....	18
2.3. Invivo πειράματα	21
2.3.1. Απομόνωση DNA.....	21
2.3.2. Καθορισμός του γονοτύπου στα ποντίκια Smyd3-	22
2.3.3.Μοντέλο της μπλεομυκίνης με οροτραχειακή ένεση στα ζώα	23
2.3.4.Μέτρηση κυττάρων από το βρογχοκυψελιδικό υγρό	25
2.3.5.Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης από το βρογχοκυψελιδικό υγρό	26
2.3.6.Μέτρηση κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό	26
2.3.7. Ιστολογία –Ιστοί -Χρώσεις	27
2.3.8.Χρώση αιματοξυλίνης-εοσίνη.....	27
3.Αποτελέσματα	28
3.1. Insilico αναζήτηση ενός πιθανού ρόλου επιγενετικών ενζύμων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης	28
3.2.Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται σε επιγενετικές αλλαγές στην παθογένεια της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης <i>invivo</i> σε ποντίκια	32

3.2.1. Γονίδια που υπερεκφράζονται στην πνευμονική ίωση.	35
3.2.2. Γονίδια που υπερεκφράζονται στην ηπατική ίωση.....	37
3.2.3. Γονίδια που υποεκφράζονται στην πνευμονική ίωση.....	38
3.2.4. Γονίδια που υποεκφράζονται στην ηπατική ίωση	39
3.3. Σύγκριση του επιπέδου έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται σε επιγενετικές αλλαγές στην ίωση του πνεύμονα και του ήπατος.....	40
3.4. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των επιγενετικών ενζύμων και της <i>insilico</i> αναζήτησης στην παθόγεια της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονική ίωση.	41
3.5. Βελτίωση του πειραματικού προτύπου της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίωσης <i>in vivo</i>	42
3.6. <i>In vivo</i> μελέτη του πιθανού ρόλου του SMYD3 στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίωση.....	44
3.6.1. Ρόλος του SMYD3 στην ίωση.....	44
3.6.2. Επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίωση σε ποντίκια με γονότυπο SMYD3.....	45
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση	48
Βιβλιογραφία	49

1.Εισαγωγή

Ίνωση είναι ένα παθολογικό χαρακτηριστικό των περισσότερων χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων. Ίνωση, ή ουλές, ορίζεται η συσσώρευση περίσσειας συστατικών εξωκυτταρικής μήτρας. Εάν και εξαιρετικά προοδευτική, η ίνωση τελικά οδηγεί σε δυσλειτουργία οργάνων και θάνατο. Η ίνωση επηρεάζει σχεδόν κάθε ιστό στο σώμα. Η ίνωση που προσβάλλει τον πνεύμονα χαρακτηρίζεται ως Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ).

1.1. Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση

1.1.1.Επιδημιολογία

Η Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ) είναι μία χρόνια, μη αναστρέψιμη, προοδευτικά εξελισσόμενη και τελικά θανατηφόρος ινωτική πνευμονική νόσος αγνώστου αιτιολογίας, με διάμεση επιβίωση που εκτιμάται στα 3-5 έτη μετά τη διάγνωση. Είναι η πιο συχνή από τις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες, περιορίζεται μόνο στους πνεύμονες και σχετίζεται με το ιστολογικό ή και το απεικονιστικό πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας.

Η επίπτωση της ΙΠΙ αυξάνεται με την ηλικία. Στην Ελλάδα, η εκτιμώμενη επίπτωση της νόσου είναι 1-5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, και ο εκτιμώμενος επιπολασμός της νόσου είναι 4-18 περιστατικά ανά 100.000. Η νόσος είναι σπάνια σε άτομα κάτω των 50 ετών, ενώ είναι συχνότερη στους άρρενες. Τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης των ασθενών με ΙΠΙ αναφέρονται κοντά στο 30%, ποσοστά σαφώς χειρότερα από συνήθεις νεοπλασίες όπως του μαστού ή του προστάτη και παρόμοια με αυτά του καρκίνου του πνεύμονα.

1.1.2.Συμπτώματα και διάγνωση

Η αιτιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη. Σύμφωνα με τις ισχύουσες διεθνείς οδηγίες η διάγνωση της απαιτεί τον αποκλεισμό άλλων αιτίων διαμέσων πνευμονοπαθειών, όπως επαγγελματική έκθεση, νοσήματα του συνδετικού ιστού ή τοξικότητα από φάρμακα. Αν και η ΙΠΙ είναι εξ ορισμού νόσος άγνωστης αιτιολογίας, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με αυτή όπως το κάπνισμα (περισσότερο από το 70% των ασθενών είναι καπνιστές ή πρώην καπνιστές), η περιβαλλοντική/επαγγελματική έκθεση σε κόνεις (αμίαντο), οι πνευμονικές λοιμώξεις και η γαστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση. Τέλος, περίπου 2-5% των ασθενών με ΙΠΙ μπορεί να εμφανίζουν οικογενή ΙΠΙ (προσβολή 2 ή περισσότερων ατόμων της ίδιας βιολογικής οικογένειας). Η οικογενής ΙΠΙ εκδηλώνεται σε νεαρότερες ηλικίες, είναι πιο επιθετική και υπάρχει συσχέτιση με τα γονίδια surfactant protein C (SPC), human telomerase reverse transcriptase (hTERT), human telomerase RNA (hTR). Η νόσος στα αρχικά της στάδια είναι ασυμπτωματική. Τα συμπτώματα της ΙΠΙ είναι μη ειδικά. Οι περισσότεροι ασθενείς αρχικά παρουσιάζουν δύσπνοια στην κόπωση και μη παραγωγικό βήχα. Τα συμπτώματα αυτά είναι κοινά για πολλά πνευμονολογικά και καρδιολογικά νοσήματα. Η δύσπνοια, το κυρίαρχο σύμπτωμα της ΙΠΙ, προοδευτικά επιδεινώνεται. Άλλα συστηματικά συμπτώματα που μπορεί να συνοδεύουν την κλινική εικόνα της ΙΠΙ είναι απώλεια βάρους, δεκατική πυρετική κίνηση, κόπωση,

αρθραλγίες/μυαλγίες κ.α. Η μέση διάρκεια των συμπτωμάτων μέχρι τη διάγνωση της νόσου είναι 1-2 έτη.

Η διάγνωση της νόσου γίνεται κυρίως με την υπολογιστική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας των πνευμόνων. Για την επιβεβαίωση της διάγνωσης σε ορισμένα περιστατικά μπορεί να απαιτείται και βιοψία ιστού. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις πρόσφατα αναθεωρημένες διεθνείς οδηγίες, τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΙΠΠ είναι:

1. Αποκλεισμός άλλων πιθανών αιτιών πνευμονικής ίνωσης.
2. Παρουσία του ακτινολογικού προτύπου της Συνήθους Διάμεσης Πνευμονίας (UIP) σε υψηλής ευκρίνειας υπολογιστική τομογραφία θώρακος (HRCT).
3. Συγκεκριμένοι συνδυασμοί ακτινολογικής εικόνας πιθανής/μη πιθανής UIP και ιστολογικών ευρημάτων σε βιοψία πνεύμονα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η βιοψία πνεύμονα δεν είναι πλέον απαραίτητη, αφού ένα μεγάλο μέρος των ασθενών με ΙΠΠ (έως 50%) έχουν ακτινολογικό πρότυπο UIP, που σε συνδυασμό με συμβατή κλινική εικόνα και αποκλεισμό άλλων, γνωστών αιτιών πνευμονικής ίνωσης (π.χ. νοσήματα του συνδετικού ιστού, πνευμονική ίνωση από φάρμακα, πνευμονία από υπερευαισθησία) θέτουν τη διάγνωση.

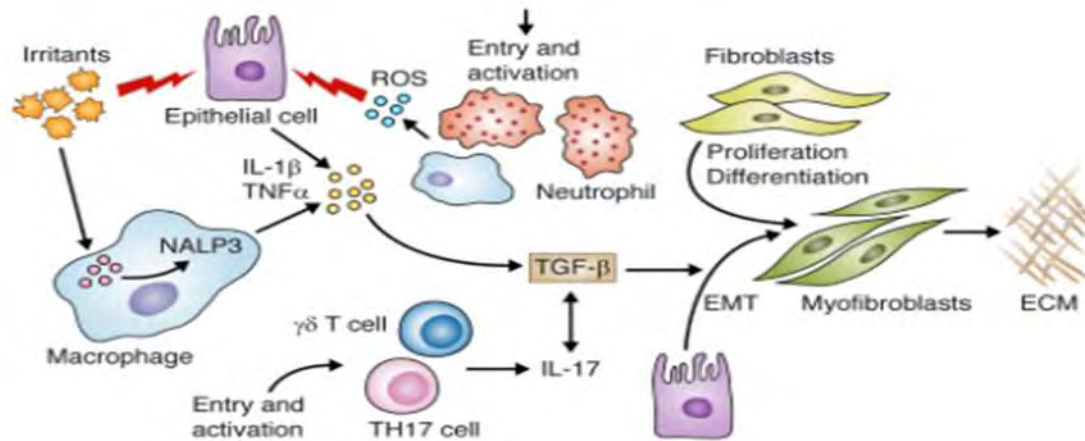
Η ανάγκη διαχείρισης και θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών αυτών είναι επιτακτική και επείγουσα λόγω της υψηλής θνησιμότητας της νόσου. Η μόνη μέχρι πρότινος θεραπευτική προσέγγιση που αύξανε την επιβίωση ήταν η μεταμόσχευση πνεύμονα. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος όσον αφορά την κατανόηση της παθογένειας της νόσου και πρόσφατα εγκρίθηκαν σε Ευρώπη και ΗΠΑ οι πρώτες θεραπείες για την αντιμετώπιση της.

1.1.3. Μηχανισμός παθογένεσης της ΙΠΠ

Η ίνωση είναι επίσης ένα σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό πολλών χρόνιων αυτοάνοσων ασθενειών, συμπεριλαμβάνοντας τη σκληροδερμία, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη νόσο του Crohn, την ελκώδη κολίτιδα, τη μυελοϊνωση και το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Η ίνωση επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη όγκου και τη μετάσταση, τη χρόνια απόρριψη μοσχεύματος και την παθογένεση.

Στα πρώιμα στάδια της βλάβης κάποιου ιστού, επιθηλιακά κύτταρα και/ή ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές προωθούν αποκρίσεις με αντι-ινωδολυτικές ιδιότητες που προκαλούν θρόμβωση και ανάπτυξη μιας προσωρινής μονάδας εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μετέπειτα η αποκοκκίωση προωθεί διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και αυξημένη διαπερατότητα, επιτρέπει την αποτελεσματική πρόσληψη των φλεγμονωδών κύτταρων (π.χ., ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα,

ηωσινόφιλα και) στη θέση του τραυματισμού/βλάβης. Τα ουδετερόφιλα είναι τα πιο άφθονα φλεγμονώδη κύτταρα σε πρώιμα στάδια της πληγής επούλωσης, αλλά αντικαθίστανται γρήγορα από τα μακροφάγα μετά την αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων. Κατά τη διάρκεια αυτού το αρχικού σταδίου της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, ενεργοποιούνται τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα ώστε να εξαλείψουν τυχόν εισβολή μικροοργανισμών στη πληγείσα περιοχή. Παράγουν επίσης μια ποικιλία κυτοκινών και χημειοκινών που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση και την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών.



Εικόνα 1.3.1: Βασικοί μηχανισμοί δημιουργίας μυοϊνοβλαστών στην παθογένεση της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης.

Οι μυοϊνοβλάστες προέρχονται από μια ποικιλία πηγών συμπεριλαμβανομένων των τοπικών μεσεγχυματικών κυττάρων, προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών (που ονομάζονται ινοκύτταρα), και μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται επιθηλιακή –μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), όπου τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες. Μόλις οι ινοβλάστες ενεργοποιηθούν, μεταμορφώνονται σε μυοϊνοβλάστες λείων μυών που εκφράζουν ακτίνη, εκκρίνοντας συστατικά ECM. Τέλος, στην ωρίμανση της πληγής, μυοϊνοβλάστες προωθούν τη συστολή του τραύματος, μια διαδικασία όπου οι ακμές της πληγής μεταναστεύουν προς το κέντρο και τα επιθηλιακά/ενδοθηλιακά κύτταρα διαιρούνται και μεταναστεύουν για την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού. Ίνωση αναπτύσσεται όταν η πληγή είναι σοβαρή, ο ερεθισμός των ιστών που βλάπτουν επιμένει, ή όταν η διαδικασία επισκευής απορρυθμίζεται. Έτσι, πολλά στάδια της διαδικασίας αποκατάστασης τραύματος μπορεί να απορρυθμιστούν και να συμβάλλουν στο σχηματισμό ουλής.

Αν και η σχετική σημασία της φλεγμονής στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης έχει συζητηθεί, η νόσος πιστεύεται ότι επάγεται, τουλάχιστον αρχικά, από μια

ισχυρή φλεγμονώδη απόκριση (Crystal et al., 2002). Παρά το γεγονός ότι κάποιοι τύποι πνευμονικής ίνωσης διατηρούν ένα σημαντικό φλεγμονώδες περιβάλλον καθ' όλη τη διάρκεια της ασθένειας, άλλες μορφές, όπως η ΙΠΙ συχνά χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά προοδευτική ινωτική ασθένεια απουσία ανιχνεύσιμου παράγοντα φλεγμονής (Thannickal et al., 2004). Σε αυτή την περίπτωση, έχει αναφερθεί ότι η απόκριση στην επούλωση της πληγής περιλαμβάνει επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες του πνεύμονα που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ίνωσης. Το γεγονός ότι ένας ενεργός φλεγμονώδης παράγοντας δεν είναι μια αυστηρή προϋπόθεση πιθανόν να εξηγεί γιατί οι αντιφλεγμονώδεις θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των κορτικοστεροειδών και κυτταροτοξικών παραγόντων έχουν δείξει μικρή αποτελεσματικότητα στην ΙΠΙ (Demedts et al., 2005).

Μια βελτιωμένη κλινική, ακτινολογική, και ιστοπαθολογική ταξινόμηση των διαφόρων μορφών και των σταδίων της πνευμονικής ίνωσης και μια πιο λεπτομερή κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των ινογένεσης που απαιτούνται έτσι ώστε οι θεραπείες να είναι καλύτερα προσαρμοσμένες στα βαθύτερα αίτια της νόσου. Παρ' όλα αυτά, πολλές σημαντικές προόδους έχουν δημιουργηθεί από μοντέλα τρωκτικών, τα οποία αποτελούνται από διαγονιδιακά ποντίκια και knock-out που εμφανίζουν είτε ενισχυμένη ή μειωμένη ευαισθησία σε πνευμονική ίνωση. Αυτές οι σημαντικές μελέτες έχουν επεκταθεί στην κατανόηση των μηχανισμών της πνευμονικής ίνωσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι σχεδόν δύο δεκαετίες έρευνας έχουν προταθεί ότι ο TGF παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης προωθώντας την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο (Border and Noble, 1994), ελάχιστη πρόοδος έχει γίνει για την αναστολή της TGF οδού (Kisseleva και Brenner, 2008).

1.1.4. Πειραματικό Μοντέλο της πνευμονική ίνωσης

Οι τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν βελτιώσει σημαντικά τη γνώση για τους μηχανισμούς παθογένεσης της πνευμονικής ίνωσης και αυτό βοήθησε να εντοπιστούν πιθανοί στόχοι για νέες θεραπείες. Ωστόσο, παρά το μεγάλο αριθμό των αντι-ινωτικών σε πειραματικές προ-κλινικές μελέτες, η μετάφραση αυτών των ευρημάτων στην κλινική πρακτική, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα. Αυτή η αναθεώρηση θα επικεντρωθεί στο μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης επαγόμενη από μπλεομυκίνη, αφού έχει αδιαμφισβήτητη συμβολή στην έρευνα των βασικών μηχανισμών, στην παθογένεση της νόσου και στη χρησιμότητά του για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας των αντί-ινωτικών φαρμάκων.

Τα ζωικά μοντέλα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην έρευνα των ασθενειών, και πολλά μοντέλα έχουν ήδη βρεθεί για να εξετάσουν την πνευμονική παθολογία. Χρόνιες ασθένειες είναι πιο δύσκολες να αποτυπωθούν σε μοντέλο. Η περίπτωση της πνευμονικής ίνωσης είναι ακόμη πιο περίπλοκη, δεδομένου ότι η αιτιολογία και φυσική ιστορία της νόσου είναι ασαφής και δεν υπάρχει κανένα μεμονωμένο σήμα γνωστό ότι είναι ικανό να επάγει "IPF" σε ζώα. Πολλά διαφορετικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης έχουν αναπτυχθεί όλα αυτά τα χρόνια. Τα περισσότερα από αυτά μιμούνται μερικά, αλλά ποτέ όλα τα χαρακτηριστικά της ανθρώπινης ΙΠΙ, ειδικά τη

προοδευτική και μη αναστρέψιμη φύση της πάθησης. Κοινές μέθοδοι περιλαμβάνουν βλάβη από ακτινοβολία, έγχυση της μπλεομυκίνης, διοξείδιο του πυριτίου ή αμιάντο, και διαγονιδιακά ποντίκια ή μεταφορά γονιδίων που παράγουν ινογόνες κυτοκίνες. Μέχρι στιγμής, ο τυπικός παράγοντας για την επαγωγή της πειραματικής πνευμονικής ίνωσης στα ζώα είναι η μπλεομυκίνη.

Η μπλεομυκίνη είναι ένα χημειοθεραπευτικό αντιβιοτικό, που παράγεται από το βακτήριο "Streptomyces verticillus». Η χρήση του σε ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης βασίζεται στο γεγονός ότι η ίνωση είναι μία από τις σημαντικότερες δυσμενείς επιπτώσεις του φαρμάκου της μπλεομυκίνης στη θεραπεία του καρκίνου του ανθρώπου. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του λεμφώματος, στα καρκινώματα πλακωδών κυττάρων, σε όγκους γεννητικών κυττάρων κλπ. Πιστεύεται ότι η μπλεομυκίνη δρα προκαλώντας μονά και διπλά-σπασίματα του DNA σε κύτταρα όγκου και διακόπτοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο. Αυτό συμβαίνει δημιουργώντας χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, και αντίδραση αυτών με το οξυγόνο, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή του υπεροξειδίου DNA διάσπασης και υδροξειδίου ελεύθερες ρίζες (Claussen & Long, 1999). Μια υπερπαραγωγή του Δραστικών Μορφών Οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε μια φλεγμονώδη απόκριση που προκαλεί πνευμονική τοξικότητα, ενεργοποίηση των ινοβλαστών και επακόλουθη ίνωση (Chaudhary, Schnapp, & Park, 2006, Grande NR, 1998). Η υδρολάση της μπλεομυκίνης επηρεάζει κριτικά τις επιδράσεις αυτού του φαρμάκου σε διαφορετικούς ιστούς. Οι πνεύμονες διατηρούν χαμηλά επίπεδα του ενζύμου και ως εκ τούτου είναι πιο επιρρεπή σε επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη βλάβη των ιστών (Sebti, Mignano, Jani, Srimatk and ada & Lazo, 1989). Πνευμονικές παρενέργειες σε ασθενείς είναι δόσοεξαρτώμενες, σχετιζόμενες με την ηλικία και εμφανίζονται πιο συχνά με την παρουσία προϋπαρχόντων πνευμονικών ασθενειών ή το κάπνισμα. Τοξικότητα του πνεύμονα αναπτύσσεται σε περίπου 10% των ασθενών που έλαβαν μπλεομυκίνη, και κλινικά σχετίζεται με βήχα, δύσπνοια, πυρετό, κυάνωση, και επιδείνωση των παραμέτρων της πνευμονικής λειτουργίας. Μέσα σε λίγες εβδομάδες έως και μήνες αυτή η απάντηση θα μπορούσε να εξελιχθεί σε πνευμονική ίνωση σε ~ 1% των ασθενών.

Η μπλεομυκίνη ως παράγοντας για την επαγωγή πνευμονικής ίνωσης περιγράφηκε για πρώτη φορά σε σκύλους, αργότερα στα ποντίκια (Adamson & Bowden, 1974), και αρουραίους. Προκαλεί φλεγμονώδεις και ινωτικές αντιδράσεις μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμα περισσότερο μετά την ενδοτραχειακή έγχυση. Η αρχική υπερέκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (ιντερλευκίνης-1, παράγοντα νέκρωσης του όγκου-α, ιντερλευκίνη-6, η ιντερφερόνη-γ) ακολουθείται από την αυξημένη έκφραση των προ-ινωτικών δεικτών (αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β1, φιμπρονεκτίνη, προκολλαγόνου-1), με αιχμή γύρω από την 14^η ημέρα μετά την έγχυση της μπλεομυκίνης και την έναρξη του μοντέλου. Ο «διακόπτης» μεταξύ φλεγμονής και ίνωσης φαίνεται να συμβαίνει γύρω στην 9η ημέρα μετά την έγχυση της μπλεομυκίνης (Chaudhary, Schnapp, & Park, 2006). Αξιοσημείωτες στο μοντέλο ποντικού είναι οι διαφορές στην ευαισθησία ανάπτυξης

ίνωσης μεταξύ διαφορετικών ειδών ποντικών. Τα CBA και τα C57Bl/6 ποντίκια έχουν ισχυρή ανοσοαπάντηση στη μπλεομυκίνη ενώ τα ποντίκια Balb/c παρουσιάζουν σχετική ανθεκτικότητα στην ίνωση. Αυτές οι διαφορές είναι πιθανόν να οφείλονται σε διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των κυταροκινών και των πρωτεασών (Phan & Kunkel, 1992).

Έχει αναφερθεί πως κάποια ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως η εναπόθεση του κολλαγόνου και η εξάλειψη του κυψελιδικού χώρου, είναι κοινό χαρακτηριστικό στα ζώα με μπλεομυκίνη και στους σε ασθενείς με ΙΠΙ (Usuki K, 1995). Αυτή η παρατήρηση έχει οδηγήσει στην υπόθεση, ότι η μπλεομυκίνη αναπαράγει τυπικά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης ασθένειας και, ως εκ τούτου, η χρήση αυτού του μοντέλου έχει γίνει πολύ δημοφιλής. Περαιτέρω, το μοντέλο μπλεομυκίνη έχει το πλεονέκτημα ότι είναι αρκετά εύκολο να εκτελεστεί, είναι ευρέως προσιτό και ως εκ τούτου εκπληρώνει σημαντικά κριτήρια που αναμένονται από ένα καλό μοντέλο ζώου. Έχουν συγκεκριμένες δοσολογίες καθιερωμένες για κάθε είδος για την επίτευξη μιας ινωτικής απόκρισης και, ανάλογα με την οδό χορήγησης, διαφορετικά σχήματα της ίνωσης έχουν αναπτυχθεί. Η ενδοτραχειακή έγχυση της μπλεομυκίνης, η τυπική οδός χορήγησης, οδηγεί σε βρογχοκεντρική ίνωση, ενώ η ενδοφλέβια ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση επάγει **υποϋπεζωκοτική** εντόπισή των ουλών παρόμοια με την ανθρώπινη ασθένεια (Chua, Gauldie, & Laurent, 2005). Το μοντέλο της μπλεομυκίνης συνέβαλε να δια φωτίσει τους ρόλους των κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην πνευμονική ίνωση. Για παράδειγμα, έχει βοηθήσει να προσδιοριστεί ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF β) ως ένας από τους βασικούς παράγοντες στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης (J. Zhaoetal., 2002).

Ωστόσο, παρά τα αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματα και μερικές ομοιότητες σε ιστολογικές μεταβολές με τον άνθρωπο, το μοντέλο της μπλεομυκίνης έχει σημαντικούς περιορισμούς όσον αφορά την κατανόηση του προοδευτικού χαρακτήρα της ανθρώπινης ΙΠΙ. Όπως αναφέρθηκε, η μπλεομυκίνη προκαλεί μια φλεγμονώδη απόκριση, που προκλήθηκε από υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών, με την επαγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και ενεργοποίηση των μακροφάγων και ουδετερόφιλων, που μοιάζει με οξεία πνευμονική βλάβη με κάποιο τρόπο. Η μετέπειτα εξέλιξη της ίνωσης, ωστόσο, είναι τουλάχιστον εν μέρει αναστρέψιμη, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε παρέμβαση (Izbicki, Segel, Christensen, Conner, & Breuer, 2002). Το μεγάλο μειονέκτημα του μοντέλου είναι ότι δεν αναπαράγεται η πτυχή της αργής και μη αναστρέψιμης εξέλιξης της ΙΠΙ σε ανθρώπους (Chua, Gauldie, και Laurent, 2005).

1.2.Επιγενετικές Τροποποιήσεις

Ορισμός

Τα τελευταία 10 χρόνια γίναμε μάρτυρες μιας έκρηξης των επιστημονικών γνώσεων, από ερευνητικές προσπάθειες και διεθνείς πρωτοβουλίες αφιερωμένες στην Επιγενετική. Η λέξη «epigenetics» έχει την προέλευσή της στην Ελληνική λέξη

επί(δηλαδή για πάνω από, ή παραπάνω) και τη γενετική, την επιστήμη της κληρονομικής μετάδοσης (Bonasio et al. 2010, Schwartz 2010; Yang and Schwartz 2011). Ο τελευταίος ορισμός περιλαμβάνει τη μελέτη των κληρονομήσιμων φαινοτύπων που προκύπτουν από τις αλλαγές σε ένα χρωμόσωμα χωρίς αλλοιώσεις στην αλληλουχία DNA (Goldberg et al. 2007). Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες των επιγενετικών σημάτων.

Κατηγορίες

1. Μεθυλίωση του DNA

Μεθυλίωση του DNA είναι μια εξαιρετικά ειδική βιοχημική διαδικασία που τυπικά περιλαμβάνει την προσθήκη μιας ομάδας μεθυλίου στην θέση 5 των νησίδων CpG (Magnusdottir et al. 2012). Ειδικά ένζυμα που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες DNA (DNMTs) μεσολαβούν στη διαδικασία που οδηγεί σε γονιδιακή καταστολή. Η τοποθέτηση ομάδων μεθυλίου αλλάζει την εμφάνιση και τη δομή του DNA που οδηγούν σε τερματικές τροποποιήσεις των αλληλεπιδράσεων των γονιδίων με τη μεταγραφική μηχανή της κυττάρων μέσα στον πυρήνα.

2. Τροποποιήσεις των ιστονών

Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες που αποτελούν τα βασικά εξαρτήματα της χρωματίνης, του συμπλόκου του DNA και πρωτεϊνών που συνθέτουν τα χρωμοσώματα. Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί που μπορούν να τροποποιήσουν τη δομή των ιστονών και της χρωματίνης: η ακετυλίωση και η μεθυλίωση. Αυτά είναι βιοχημικές διαδικασίες που χαρακτηρίζονται από τη προσθήκη είτε ενός ακετυλίου ή μίας ομάδας μεθυλίου στο αμινο-οξύ λυσίνης που βρίσκεται στην ιστόνη. Η ακετυλίωση των ιστονών έχει αποτέλεσμα τη συμύκνωση στη δομή της χρωματίνης. Η συμπτκνωθέν αυτή δομή της χρωματίνης, με τη σειρά του, αυξάνει την προσβασιμότητα παραγόντων μεταγραφής και αναστρέψιμα ρυθμίζεται από δύο διακριτές οικογένειες ενζύμων, που ονομάζονται ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης και δεακετυλάσες. Η μεθυλίωση της ιστόνης καταλύεται από μεθυλοτρανσφεράσες ιστόνης ή διμεθυλάσες και ευνοεί τη συμπίεση ή χαλάρωση χρωματίνης με βάση τον αριθμό των ομάδων μεθυλίου (Helin and Dhanak 2013, Kimmins and Sassone-Corsi 2005, Kloze and Zhang 2007).

Επιπλέον, υπάρχουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών εκτός από μεθυλίωση και ακετυλίωση, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης και ουβικιτινίωσης, που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη δομή της χρωματίνης. Η φωσφορυλίωση ιστόνης λαμβάνει χώρα σε σερίνη, θρεονίνη, και κατάλοιπα τυροσίνης και ασκεί ένα ουσιαστικό ρόλο στην αντιμετώπιση των βλαβών του DNA και τη ρύθμιση της μεταγραφής του κυτταρικού κύκλου, και την απόπτωση (Rossetto et al. 2012). Από την άλλη μεριά, η ουμπικιτινίωση ιστόνης αντιπροσωπεύει τη λιγότερο κατανοητή τροποποίηση ιστόνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, είτε μέσω πρωτεασώματος-εξαρτώμενη καταστροφή των

μεταγραφικών παραγόντων ή ανεξάρτητους του πρωτεασώματος μηχανισμούς (Zhang2003).

3. Μη κωδικοποιημένη ρύθμιση RNA (Noncoding RNA regulation)

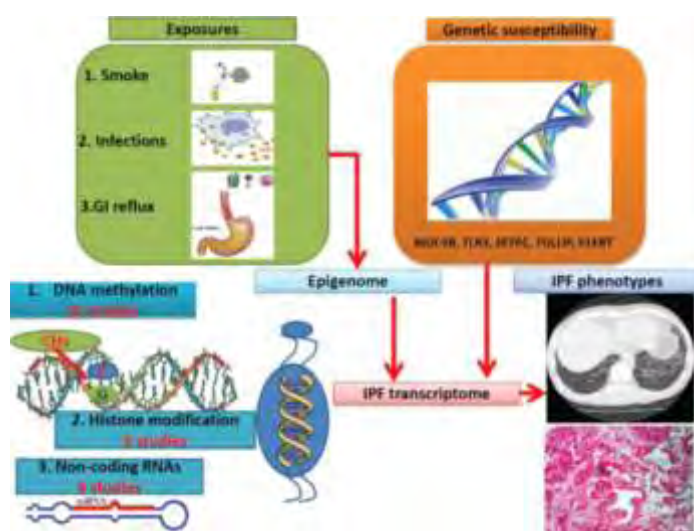
Η πρόσφατη έλευση και εφαρμογή καινοτόμων τεχνολογιών υποστήριξε την προϋπόθεση ότι η λειτουργία του RNA είναι περισσότερο από τη μετάδοση γενετικών πληροφοριών στα ριβοσώματα, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση της πρωτεΐνης. Πολλά λειτουργικά RNA έχουν περιγραφεί πρόσφατα, συμπεριλαμβανομένων των microRNAs (miRNAs) και των μακροπρόθεσμα μη κωδικευμένων RNA (LNC-RNA).

Τα miRNAs είναι μικρά, περίπου 22 νουκλεοτιδίων, μονόκλινα, μη κωδικοποιητικά RNAs, που λειτουργούν ρυθμίζοντας την έκφραση του γονιδίου-στόχου είτε την αποσιώπηση ή την υποβάθμιση. Τα miRNAs μπορούν έμμεσα να μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση με τα συνολικά αποτελέσματα στην μεθυλίωση και στόχευση των παραγόντων μεταγραφής. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν ανοδικά δίκτυα ολόκληρου του γονιδίου και συνεπώς να τροποποιήσουν φαινοτύπους σύνθετης νόσου, προτείνοντας τους ως αποτελεσματικούς παράγοντες για διαταραχές ίνωσης του πνεύμονα και έτσι ελκυστικές εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές για αυτή τη θανατηφόρο νόσο (Nana-Sinkam κ.ά.2009).

Τα LNC-RNAs αντιπροσωπεύουν μετάγραφα μη-κωδικοποιημένα σε πρωτεΐνη, περισσότερο από 200 νουκλεοτίδια, ένα κάπως αυθαίρετο όριο που τα διακρίνει από μικρά ρυθμιστικά RNA όπως microRNAs. Ένα χρήσιμο πλαίσιο έχει προταθεί για τη λειτουργική ταξινόμηση του lnc-RNA: ως ικρίωματα συναρμολόγησης των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν, σύνδεση πρωτεϊνών σε περιοχές της μεταγραφής (σε cis), ή οδηγοί φέρνοντας τις πρωτεΐνες σε μία ρυθμισμένη περιοχή του γονιδιώματος (σε trans) (Mercer et al. 2009). Διάφορες λειτουργίες έχουν προταθεί για LNC-RNAs, συμπεριλαμβανομένων των ρόλων στη ρύθμιση του μεταβολισμού DNA, τη δομή χρωματίνης και την έκφραση του γονιδίου, που οδηγεί σε ποικίλες ασθένειες του ανθρώπου (Huang και Zangk 2014,Καραπετιάν κ.ά. 2013, Maass et al. 2014, Shietal. 2013,Zhang et al. 2013)

1.2.1.Επιγενετικές τροποποιήσεις στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση

Εν όψει των ταχέως αναδυόμενων παθογενετικών μονοπατιών και σε μια προσπάθεια να βρεθεί μια λογική που μπορεί να εξηγηθούν οι μείζονες αποκλίσεις μεταξύ δεδομένων γονιδιωματικής και πρωτεομικής, οι επιστήμονες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση του ρόλου των μετα-



μεταγραφικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων γονιδίων-περιβάλλοντος στην ινογένεση του πνεύμονα (Blackwell κ.ά. 2013, Cabrera et al 2013, Fingerlin et al. 2013, Herazo-Málaga et al. 2013, Kass και Καμίνσκι 2011, O'Dwyer et al. 2013, Peljto et al. 2013, Seibold et al. 2011). (Εικ. δίπλα).

Μεθυλίωση του DNA

Έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του Thy-1 είναι υπεύθυνη για τη μείωση της έκφρασης του Thy-1 σε ινοβλάστες πνεύμονα IPF, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη παραγωγή μυοϊνοβλαστών και προοδευτική εμφάνιση ουλών στους πνεύμονες (Sanders et al. 2007, 2008). Διαφορικά επίπεδα μεθυλίωσης τριών CpG νησιά στον υποκινητή του α-λείου μυός ακτίνη (α-SMA) σε ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες και κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα φάνηκε να συσχετίζεται με την έκφραση της α-SMA σε αυτές τις κυτταρικές σειρές (Hu et al. 2010). Φαρμακολογική αναστολή της δραστηριότητας DNMT προκάλεσε μια α-SMA γονιδιακή έκφραση. Υπερμεθυλίωση του προαγωγού πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε απόπτωση ινοβλαστών, όπως προσταγλανδίνης E2 του υποδοχέα 2 γονίδιο (PTGER2) και P14 (ARF), είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη έκφραση τους στους ινοβλάστες της ΙΠΙ (Cisneros κ.ά. 2012, Huang et al. 2010). Η προσταγλανδίνη E2 έχει αποδειχθεί επίσης για την αύξηση της Dnmt3a δραστηριότητας, που οδηγεί σε υπερμεθυλίωση και αυξημένη έκφραση των γονιδίων που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ινοβλάστες πνεύμονα (Huang et al. 2012). Είναι ενδιαφέρον, ότι 402 διαφορικά μεθυλιωμένες CpG νησίδες επικαλύπτονται μεταξύ IPF και καρκίνου των πνευμόνων, τονίζοντας κοινών παθογενετικών οδών (Ραμπίνοβιτς κ.ά. 2012).

Η παρακολούθηση της συγκριτικής ανάλυσης του γονιδιώματος σε επίπεδο μεθυλίωσης του DNA με τη χρήση συστοιχιών μεθυλίωσης αποκάλυψε ένα σχετικά ισορροπημένο διαφορικό ρεπερτόριο μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΙΠΙ και ελέγχων που καλύπτουν συνολικά 870 γονίδια (Sanders et al. 2012). Αν και οι παραπάνω μελέτες πρότειναν ότι η DNA μεθυλίωση μπορεί να μεταβάλλει την έκφραση πολλών γονιδίων εντός του ινωτικού πνεύμονα, σε όλα αυτά χρησιμοποιούνται μικρά μεγέθη δειγμάτων, μόνο εν μέρει χαρακτηρίζεται η συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης ότι μπορεί να οδηγήσει σε IPF φαινότυπο, και το πιο σημαντικό δεν ήταν σε θέση να εκτιμήσει μεταβολές μεθυλίωσης στις CpG ακτές που βρίσκονται εκτός των νησιών CpG. Σε μια πρόσφατη μελέτη από τον Yang et al. (2014) πραγματοποιήθηκαν συστοιχίες μεθυλίωσης γονιδιακής έκφρασης σε σχεδόν 100 δείγματα IPF πνεύμονα. Αντιθέτως με προηγούμενες μελέτες (Ραμπίνοβιτς κ.ά. 2012a, 2012, Sanders et al. 2012), μια σχετικά ισχυρή σχέση έκφραση του γονιδίου-μεθυλίωσης αποκαλύφθηκε σχεδόν στο ήμισυ των διαφορικά μεθυλιωμένα γονίδια, πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η ανάλυση μεθυλίωσης επικεντρώθηκε για πρώτη φορά σε CpG ακτές, όπου τα επιγενετικά σήματα φαίνεται να είναι πιο ρυθμιστικές από αυτές που παρατηρήθηκαν στα νησιά CpG.

Τροποποιήσεις των ιστονών

Μέχρι στιγμής, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μειωμένη ακετυλίωση ιστονών στις περιοχές υποκινητή των αντι-ινωτικών γονιδίων (συμπεριλαμβανομένων Fas-συνδέτη, της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2), και CXCL-10 (IP-10) είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή και μειωμένη δραστηριότητα των σχετικών πρωτεϊνών, που οδηγεί σε αντίσταση στην απόπτωσης ινοβλαστών που προέρχονται από ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (Coward κ.ά.. 2009, 2010, Huangetal. 2013. Wang et al. (2009) ανέφεραν ότι αναστολέας αποακετυλάσης ιστόνης είναι ισχυρός έναντι του TGF- β 1, προκαλώντας επιδράσεις σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών με αναστολή διαφοροποίησης τους σε μυοϊνοβλάστες και μειώνοντας την παραγωγή κολλαγόνου. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από τους Zhangetal. (2013b) σε το πειραματικό μοντέλο της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση.

1.2.2. Ρόλος και χαρακτηρισμός του γονιδίου SMYD3.

Η SMYD3 (SET Και MYND) είναι μια πρωτεΐνη του γονιδίου κωδικοποίησης με δραστηριότητα λυσίνης N-μεθυλοτρανσφεράσης. Συγκεκριμένα μεθυλιώνει Lys-4 και Lys-5 H3ιστόνης, προκαλώντας δι- και τρι-μεθυλίωση, αλλά όχι μονομεθυλίωση. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση, ως μέλος του συμπλόκου πολυμεράσης RNA. Δεσμεύει DNA που περιέχει 5-CCCTCC-3 ή 5-GAGGGG-3 αλληλουχίες Ένα σημαντικό παράλογο αυτού του γονιδίου είναι το SMYD1. Πολλαπλές παραλλαγές μεταγραφής που κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές έχουν βρεθεί για το γονίδιο αυτό.

Το SMYD3 είναι ένα γονίδιο που υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία των ορθοκοκλικών καρκινωμάτων και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Εισαγωγή SMYD3 σε κύτταρα NIH3T3 με αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη, και στη συνέχεια γενετική knock-down με μικρό παρεμβαλλόμενο RNAs (siRNAs) σε καρκινικά κύτταρα οδήγησε σε σημαντική καταστολή της ανάπτυξης τους. Το SMYD3 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με RNA πολυμεράση II μέσω μιας αλληλεπίδρασης με την HELZ ελικάσης RNA μετενεργοποίησης ενός συνόλου των γονιδίων που περιλαμβάνουν ογκογονίδια και γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ο τομέας SET SMYD3 έδειξε δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης H3-λυσίνη 4 (H3-K4). Άρα έχει δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης ιστόνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής ως μέλος του σύμπλοκο RNA πολυμεράσης. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του SMYD3 μπορεί να είναι ένας βασικός παράγοντας στην ανθρώπινη καρκινογένεση.

Δεν έχει ακόμα συνδεθεί η έκφραση του γονιδίου SMYD3 με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Παρ' όλα αυτά λόγω της μεγάλης συμβολής του στην καρκινογένεση και των κοινών οδών ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων και ίνωσης, υπάρχουν ελπιδοφόρες ενδείξεις για την συμβολή του στην παθογένεση της νόσου.

2. Πειραματικό Μέρος-Ανάλυση Τεχνικών

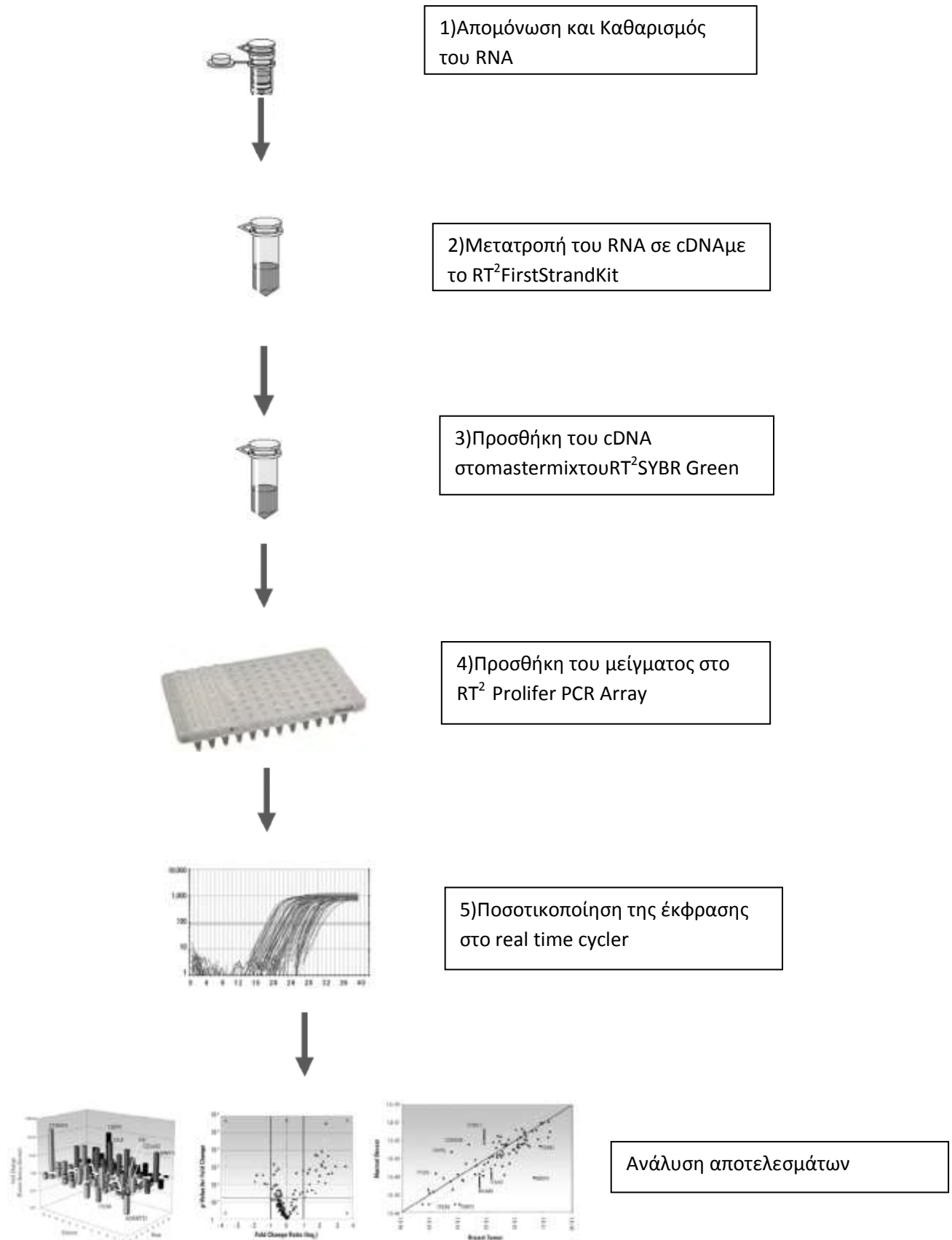
2.1. In silico μελέτη για την αναζήτηση ενός πιθανού ρόλου των επιγενετικών ενζύμων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.

Η μελέτη στηρίζεται στην αναζήτηση πληροφοριών στις βάσεις δεδομένων που αφορούν την έκφραση των επιγενετικών ενζύμων σε πειράματα που σχετίζονται με την Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση σε ποντίκια και σε ανθρώπους.

- Η αναζήτηση ξεκινά με την χρήση του NCBI(Διεθνές κέντρο βιοτεχνολογικών πληροφοριών) και την επιλογή των GEO datasets (σύνολα δεδομένων)
- Εισαγωγή στην αναζήτηση της λέξης-κλειδί όπως «IPF lung mouse» δηλαδή ΙΠΙ-πνεύμονας-ποντίκι.
- Εμφάνιση ορισμένων δημοσιεύσεων από πειράματα που αντιστοιχούν στην αναζήτηση. Επιλογή του πειράματος που προκαλεί ενδιαφέρον με βάση τον κωδικό στο series.
- Επιλογή της ανάλυσης στο GEO2R, εισαγωγή του παραπάνω κωδικού στο Geo assecion, και μετά το πάτημα του κουμπιού Set, εμφάνιση όλων των δεδομένων που υπάρχουν για διαφορετικά δείγματα ή διαφορετικά χρονικά σημεία.
- Επιλογή των δειγμάτων που υπάρχει ενδιαφέρον, διαχωρισμός σε ομάδες οι οποίες στην συνέχεια θα συγκριθούν μεταξύ τους. Π.χ. δημιουργία 2 ομάδων, μια με δείγματα από ποντίκια που ενέθηκαν με saline και μια άλλη με μπλεομυκίνη σύμφωνα με το γνωστό μοντέλο.
- Μετά, με την επιλογή «Top 250», εμφανίζονται τα αποτελέσματα για όλα τα δεδομένα. Εδώ υπάρχει η δυνατότητα για επιλογή των επιπλέον χαρακτηριστικών που μπορούν να αποθηκευτούν.
- Αποθήκευση όλων των αποτελεσμάτων με το «save all results».
- Στην συνέχεια, τα αποτελέσματα μεταφέρονται σ' ένα φύλλο excel και μπορεί να γίνει sort ως προς τον logFC και μετά να επιλεγούν τα συγκεκριμένα γονίδια που εμπλέκονται στις επιγενετικές τροποποιήσεις.

Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε σύνολο δεδομένων από κάθε πείραμα. Η τιμή του logFC δείχνει τη διαφορά της έκφρασης του γονιδίου από τη σύγκριση των 2 ομάδων. Όλοι οι στόχοι που χρησιμοποιούνται σε τελική ανάλυση είναι με τιμή $p < 0,05$ και βρίσκονται στο πρώτο 20% εκείνων που αλλάζουν. Τα δεδομένα στη συνέχεια ταξινομούνται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επιγενετικής ρύθμισης ενζύμων συλλέγονται. Τα δεδομένα από τα πειράματα σε ποντίκια είναι επίσης χωρισμένα σε χρονικά σημεία για να εκτιμηθεί η έκφραση τους στα πρώτα στάδια της ίνωσης αλλά και αργότερα.

2.2. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης επιγενετικών ενζύμων στη παθολογία της πνευμονικής ίνωσης.



Βήμα 1: Αρχικά η επεξεργασία ξεκινά με την απομόνωση του RNA που περιγράφεται παρακάτω και τον καθαρισμό του από το DNA. Τα βήματα είναι τα εξής:

- Μεταφορά έως 700 μl του δείγματος, σε μια στήλη spin RNaseasy που τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής 2 ml. Το καπάκι κλείνει απαλά, και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15 s σε ≥ 8000 xg ($\geq 10,000$ rpm).
- Προσθήκη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 στη στήλη RNaseasy spin. Φυγοκέντρηση για 15 s σε ≥ 8000 xg ($\geq 10,000$ rpm) για την πλύση της στήλης φυγοκέντρησης.
- Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE στη στήλη RNaseasy. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε ≥ 8000 xg ($\geq 10,000$ rpm) για να πλυθεί η μεμβράνη της στήλης.
- Μεταφορά της στήλης RNA easy σε ένα νέο σωλήνα 1,5 ml συλλογής. Προσθήκη 30 έως 50 μl RNAase-free νερό απευθείας στη μεμβράνη της στήλης. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε ≥ 8000 xg ($\geq 10,000$ rpm) για την έκλυση του RNA.
- Στη συνέχεια επώαστηκε το RNA με ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την καταστροφή του DNA.

Βήμα 2: Σ' αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA από το RNA

- Προσθήκη 10 μl μίγματος της αντίστροφης μεταγραφής σε κάθε σωλήνα που περιείχε 10 μl RNA, που έχει γίνει εξάλειψη του DNA. Ανάμειξη απαλά με πιπέτα πάνω και κάτω.
- Επώαση στους 42°C για ακριβώς 15 λεπτά. Τότε η αντίδραση σταματάει αμέσως με επώαση στους 95 ° C για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 91 μl RNase-free νερό σε κάθε αντίδραση. Ανάμειξη με πιπέτα πάνω και κάτω αρκετές φορές.

Το μείγμα της αντίστροφης μεταγραφής περιέχει:

Περιεχόμενο	Όγκος για 1 αντίδραση
5x διάλυμα BC3	4μl
Control P2	1μl
RE3 Reverse transcriptase mix	2μl
RNAase- free water	3μl
Τελικός όγκος	10μl

Βήμα 3: Στην συνέχεια, το cDNA αναμειγνύεται με το ειδικό mastermix του RT² Prolifer PCR.

- Τα περιεχόμενα του RT²SYBR Green master mix φυγοκεντρώνονται για 10-15 sec ώστε να βρεθούν στον πάτο του σωλήνα.

Περιεχόμενο	Όγκος για πιάτο με 96-wells
2x RT ² SYBR Green mastermix	1350μl
cDNA του δείγματος	102μl
RNA-free water	1248μl
Τελικός όγκος	2700μl

- Ετοιμάζεται το μείγμα με βάση τις εξής αναλογίες:

- Προσθήκη 10 μl μίγματος της αντίστροφης μεταγραφής σε κάθε σωλήνα που περιείχε 10 μl RNA, που έχει γίνει εξάλειψη του DNA. Ανάμειξη απαλά με πιπέτα πάνω και κάτω.
- πιπέτα πάνω και κάτω αρκετές φορές.

Βήμα 4: Διανομή του παραπάνω μίγματος στο RT² Prolifer PCR Array 96-wells

- Μεταφορά 25 μl από το μείγμα σε κάθε «πηγαδάκι» από το PCR Array
- Φυγοκέντρηση του πιάτου για 1 min στα 1000g για να απομακρυνθούν οι φουσκάλες.

Βήμα 5: Τοποθέτηση του πιάτου στο μηχάνημα της real-time PCR (real-time cycler) και ποσοτικοποίηση της έκφρασης.

- Προγραμματισμός του real- time cycler με βάση το πρωτόκολλο

Κύκλοι	Διάρκεια	Θερμοκρασία (°C)	
1	10min	95	Ενεργοποίηση της DNA Taq πολυμεράσης
40	15sec 1min	95 60	Συλλογή δεδομένων φθορισμού

- Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων

Βήμα 6: Ανάλυση των αποτελεσμάτων

- Εξαγωγή των τιμών Ct απ' όλα τα πηγαδάκια σ' ένα φύλλο excel
- Περαιτέρω ανάλυση με το PCR Array data analysis.

2.3. In vivo πειράματα

Τα *in vivo* πειράματα περιλαμβάνουν την αναπαραγωγή των πειραματικών ποντικών (wt και SMYD3 knock-out), τον προσδιορισμό του γενοτύπου τους με απομόνωση DNA από ουρά και το πειραματικό μοντέλο επαγωγής της ίνωσης σε αυτά με μπλεομυκίνη.

2.3.1. Απομόνωση DNA και καθορισμός του γονότυπου των ζώων

- Αποκοπή 1cm ουράς από τα νεογέννητα ποντίκια περίπου την 10^η μέρα της γέννησης τους.
- Επώαση της ουράς σε 400 μl ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (tail buffer) που περιέχει πρωτεϊνάσης K (σε υδατόλουτρο στους 56°C όλη τη νύχτα).
- Την επόμενη μέρα προσθήκη 400 μl φαινόλης και vortex για 5 min
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 g για 15 min.
- Προσεκτική αναρρόφηση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης στο 90% του όγκου που αναρροφάται .
- Vortex και φυγοκέντρηση στα 13000 στους 4 °C. Το DNA σε αυτό το στάδιο κατακρημνίζεται ως ίζημα.
- Απόρριψη υπερκειμένου και πλύση του ιζήματος με αιθανόλη 75 %.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 g και απόρριψη υπερκειμένου.
- Το ίζημα που μένει είναι το DNA, το οποίο αφού στεγνώσει λίγο με τον αέρα, διαλυτοποιείται σε νερό απαλλαγμένο από DNAάσες (Gibco νερό).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕΘΟΔΟΥ.

Διάλυμα λύσης 1L

Tris pH 8,0 1M 50 ml (50 mM τελική συγκέντρωση)
 EDTA 0,5M 200 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)
 NaCl 5 M 20 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)
 Απιονισμένο νερό 630 ml
 SDS 10% 100 ml (1% τελική συγκέντρωση)
 Γίνεται αποστείρωση με τη χρήση φίλτρου 0,22μm.
 Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρωτεΐνωση Κ (10 mg/ml)

100 mg Proteinase K

10 ml 50mM Tris pH 8.0

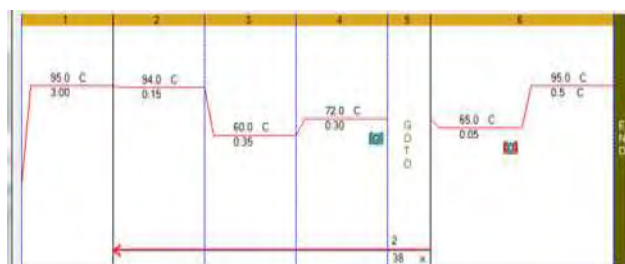
Καλή ανάδευση, Διαιρείται σε κλάσματα των 500 μL και φυλάσσεται στους -20 ° C.

2.3.2. Καθορισμός του γονοτύπου στα ποντίκια Smyd3

Ο καθορισμός του γονοτύπου στα ποντίκια Smyd3- knockout γίνεται με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματικού χρόνου (real time-PCR) με ειδικούς υποκινητές GTGCCAATGAATCGTCTGACC και ATACAGCGCGTTCGTGATTAGC για το γονίδιο Smyd3 και CCAATGTGTCCGTCGTGGATCT και GTTGAAGTCGCAGGAAGACAACC για το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Μετά από ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του DNA με nano drop, ακολουθεί αραιώση των δειγμάτων στα 25 ng/μl, ώστε όλα να έχουν την ίδια συγκέντρωση για την RT-PCR. Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση με προσθήκη ειδικού διαλύματος Eva Green και των εκκινητών με βάση τον παρακάτω πίνακα(2.3.2.1) και στην συνέχεια το μείγμα προστίθεται στο πιάτο και μπαίνει στο μηχάνημα και τρέχει το πρόγραμμα με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο (εικόνα 2.3.2.2)

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο DNA	1 μl
Eva Green	10μl
Εκκινητής 1	1: 1 μl
Εκκινητής 2	2: 1 μl
dsH ₂ O	7 μl
Συνολικός όγκος	20 μl

Πίνακας 2.3.2.1: Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.



Εικόνα 2.3.2.2: Πρόγραμμα της real-time PCR
για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου.

Συλλέγονται τα αποτελέσματα και με βάση την αναλογία της έκφρασης του γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς, όσα είναι πάνω από 2 είναι knock-out ποντίκια, ίσο με 1 είναι ετερόζυγα και όσα είναι κοντά στο μηδέν είναι αγρίου τύπου.

2.3.3.Μοντέλο της μπλεομυκίνης με οροτραχειακή ένεση στα ζώα

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Μπλεομυκίνη

Διάλυση 15mg (κάθε φιαλίδιο περιέχει 15 mg) σε 1 ml saline και στη συνέχεια προσθήκη φυσιολογικού ορού μέχρι τον τελικό όγκο των 28 ml ($V_f = 28\text{ml}$).

15mg 15 mg / ml ή 22,5 U / ml 0536 mg / ml ή 0,8U / ml

Αναισθητικός παράγοντας:

Για 1,5ml Rompun-κεταμίνη:

Rompun 100μl (10 mg / kg *i.p.*)

Κεταμίνη 300 μl (100 mg / kg *i.p.*)

Ατροπίνη 100 μl (0,05mg / kg *e.p.*)

Συμπλήρωση όγκου στο 1,5 ml με ενέσιμο νερό.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΩΡΟΥ-ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΜΠΛΕΟΜΥΚΙΝΗΣ

Όλες οι διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στο χειρουργείο.

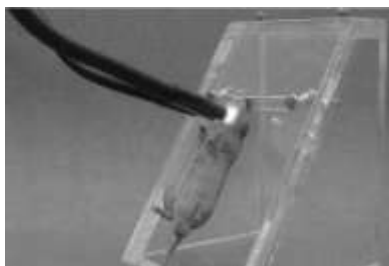
ο Καθαρισμός με 70% EtOH του χώρου εργασίας και του εξοπλισμού (λαρυγγοσκόπιο, πλατφόρμα για το ποντίκι, κ.α.)

ο Ενεργοποίηση της ηλεκτρικής κουβέρτας θέρμανσης (επίπεδο 2) και της πηγής φωτός οπτικών ινών (χαμηλού επιπέδου).

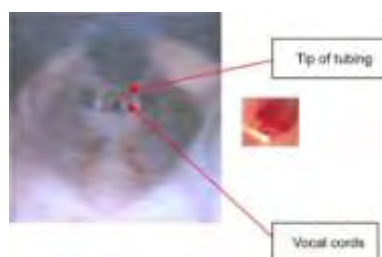
ο Καταγραφή του βάρους και της ημερομηνία στο ημερολόγιο (ημέρα 0).

ο Χορήγηση στο ζώο τη κατάλληλη ποσότητα του αναισθητικού παράγοντα με ενδοπεριτοναϊκή ένεση και αναμονή μέχρι την πλήρη αναισθησία. Για ένα αρσενικό ποντίκι 25gr, ένεση 100 μl.

ο Τοποθέτηση του ζώου στην ειδική πλατφόρμα (εικόνα 2.3.3.1) και ρύθμιση της οπτικής ίνας ώστε να φανεί εύκολα η τραχεία (εικόνα 2.3.3.2).



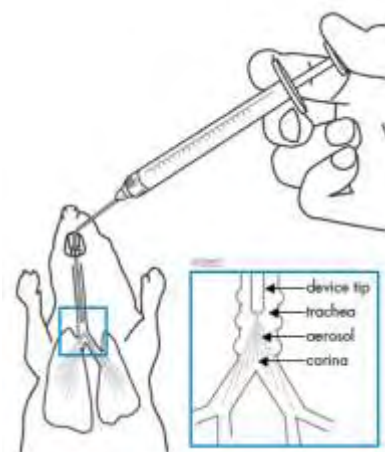
Εικόνα 2.3.3.1: Πλατφόρμα και οπτική ίνα που τοποθετούνται στο ποντίκι



Εικόνα 2.3.3.2: Εικόνα της τραχείας με την βοήθεια της οπτικής ίνας.

ο Χορήγηση της κατάλληλης ποσότητα μπλεομυκίνης (50 μ l) ανά ποντίκι με πιπέτα ακριβώς πάνω από την τραχεία. Ταυτόχρονα κλείνεται η μύτη του ποντικιού και η τραχεία αρχίζει να ανοιγοκλείνει πολύ έντονα. Τότε εγχύεται το περιεχόμενο ακριβώς πάνω από την τραχεία και απελευθερώνεται η μύτη ώστε το ποντίκι να αναπνεύσει και η ουσία να οδηγηθεί στον πνεύμονα. Η ομάδα ελέγχου λαμβάνει 50 μ l saline με την ίδια διαδικασία (ημέρες 0).

ο Τοποθέτηση του ζώου σε μια ηλεκτρική κουβέρτα θέρμανσης. Αυτό βοηθά στη γρήγορη ανάρρωση του ζώου και να αποφεύγεται το φαινόμενο της υποθερμίας. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, είναι απαραίτητη η χρήση φυσιολογικού ορού μεταξύ των βλεφάρων του ποντικιού για να αποφευχθεί η βλάβη του κερατοειδούς και τύφλωση.



ο Θυσία των ποντικιών την 14^η ημέρα και συλλογή αίματος, BALF, και πνευμόνων.

ΕΥΘΑΝΑΣΙΑ ΖΩΟΥ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ

ο Θανάτωση σε ένα ποτήρι με ξηρό πάγο

ο Ψεκασμός ζώου με 70% αιθανόλη

ο Αποκοπή περιτοναϊκής περιοχής και προσεκτική αφαίρεση του δέρματος

- ο Λήψη αίματος από την κοιλιακή αορτή.
- ο Προσθήκη του αίματος αργά και προσεκτικά, σε ένα σωλήνα με 0.5M EDTA pH = 8 για την αποφυγή της πήξης και τοποθέτηση στον πάγο. Ο όγκος του EDTA θα είναι ίσος με 10% του όγκου του αίματος.
- ο Αποκοπή του διαφράγματος, η πρύμνη σε όλη τη διαδρομή προς το λαιμό ώστε να εκτεθεί η τραχεία.
- ο Διασωλήνωση της τραχείας με καθετήρα.
- ο Ένεση στον καθετήρα με 1ml saline στους πνεύμονες (χ 3 φορές). Το υγρό που επαναρροφάται από τους πνεύμονες είναι το βρογχοκυψελιδικό υγρό που παρασέρνει τα κύτταρα του πνεύμονα. Διατήρηση σε πάγο.
- ο Πλύση του πνεύμονα με έγχυση 5-10 ml PBS στη δεξιά πλευρά της καρδιάς.
- ο Απομόνωση αριστερού λοβού με ράμμα
- ο Αποκοπή αριστερού λοβού, έξω σε ένα σωλήνα σε 2 μέρη και αμέσως μετά σε υγρό άζωτο.
- ο Διασωλήνωση της τραχείας με καθετήρα και απαλό δέσιμο με ράμματα.
- ο Έγχυση 1 ml φορμαλίνης.
- ο Αφαίρεση καθετήρα και δέσιμο της τραχείας χωρίς να διαρρεύσει η φορμαλίνη.
- ο Απομόνωση όλου του συστήματος (τραχεία- λοβοί πνεύμονα- καρδιά).
- ο Τοποθέτηση τους σε ένα σωλήνα με 4% φορμαλίνη για 24 ώρες και στη συνέχεια πλύση με 1χ PBS και διατήρηση στους 4°C. Ενσωμάτωση των ιστών σε παραφίνη και κασέτες.

2.3.4.Μέτρηση κυττάρων από τα βρογχοκυψελιδικό υγρό

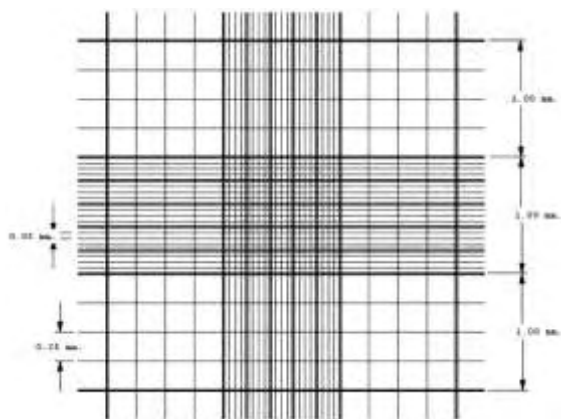
Η διαδικασία συνεχίζεται με την επεξεργασία των δειγμάτων

BALF1: Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε 1200 rpm, 4°C. Αφαίρεση υπερκειμένου και τοποθέτηση σε siliconised σωλήνες και αποθήκευση στους -80 ° C. Επαναιώρηση του ιζήματος σε BALF2-3

BALF2-3: Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 1200 rpm, 4 ° C. Αφαίρεση υπερκειμένου.

Στα ιζήματα των BALF1 και BALF2-3 προστίθενται ίση ποσότητα από το διάλυμα Gey's, ένα διάλυμα που διασπά τα ερυθροκύτταρα για την πιο εύκολη παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακολουθεί ανάμειξη και επώαση στον πάγο για 5 min, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 1200 rpm, 4 ° C. Πλύση και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 ml PBS. Ακολουθεί η μέτρηση με την πλάκα Neubauer.

Αρχικά πραγματοποιείται αραιώση 1:1 με tripan, μια χρωστική που βάφει τα νεκρά κύτταρα ώστε να μετρηθούν μόνο τα ζωντανά από αυτά. Τοποθέτηση του δείγματος ανάμεσα στην πλάκα και στην καλυπτρίδα. Μέτρηση με τη βοήθεια του μικροσκοπίου τα μεγάλα στρογγυλά και αρκετά φωτεινά κύτταρα.



Η εικόνα του μικροσκοπίου όπου μετρώνται τα κύτταρα στο κεντρικό τετράγωνο και στα 4 γύρω-γύρω. Ο τελικός υπολογισμός των κυττάρων βγαίνει με βάση την αναλογία των 5 πεδίων.

2.3.5. Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης από το βρογχοκυψελιδικό υγρό

Πρόκειται για μια φασματοφωτομετρική αντίδραση που πραγματοποιείται με την μέθοδο Bradford. Αρχικά λοιπόν, σε ένα ειδικό πιάτο προστίθεται 5 μ l από το κάθε δείγμα και 245 μ l από την χρωστική του Bradford, επώαση στο σκοτάδι για 5 min και μέτρηση στα 595 nm. Για τη πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα BSA με γνωστή συγκέντρωση και διαδοχικές αραιώσεις με PBS.

2.3.6. Μέτρηση κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό

- Προσθήκη 25-50 ml από το balf σε 1 ml 0,5M οξικού οξέος.
- Πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις του rat tail collagen (1 mg/ml). σε 1 ml οξικού οξέος.
- Σε όλα τα δείγματα προστίθεται 1ml direct red (120 μ g/ml). Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στα 10000 rpm για 10 min.
- Προσθήκη 200 μ l από το υπερκείμενο στο πιάτο φασματοφωτόμετρου και φωτομέτρηση στα 540 nm.

Η ποσότητα του κολλαγόνου υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη της αντίδρασης.

2.3.7. Ιστολογία –Ιστοί -Χρώσεις

Αφού έχουμε απομονωθεί οι ιστούς κατά τη διάρκεια της θυσίας των ζώων, αφαιρείται η καρδιά και η τραχεία και κόβεται ο πνεύμονας σε 4 λοβούς.

Στη συνέχεια, οι ιστοί παραφινολοιούνται αρχικά σε ένα ειδικό μηχάνημα και στη συνέχεια ακολουθεί η σκίνωση με υγρή παραφίνη που κάτω από τους 62 °C στερεοποιείται. Έτσι έχουμε τους παραφινολοιημένους ιστούς στις κασέτες.

Το επόμενο στάδιο αφορά το κόψιμο τομών από αυτούς τους ιστούς στο μικροτόμο. Πρώτα τριμμάρονται οι ιστοί για να απομακρυνθούν οι πρώτες στρώσεις παραφίνης, τοποθετούνται σε ψυχρό μέρος για μικρό χρονικό διάστημα γιατί βοηθάει στο κόψιμο μια καλής τομής. Ακολουθεί κόψιμο τομών στα 5 μm, και τοποθέτηση σε ειδικό μπανάκι με νερό στους 42 °C ώστε να «ανοίξει» καλά η τομή. Απευθείας από εκεί τοποθετούνται σε ειδικά πλακάκια τα οποία αφήνονται να στεγνώσουν στους 42 °C για πολλές ώρες ώστε να εξασφαλισθεί ότι θα κολλήσει σωστά στο πλακάκι και δεν θα υπάρχει αέρας ή νερό γεγονός που θα δυσκολέψει την οπτική στο μικροσκόπιο.

2.3.8.Χρώση αιματοξυλίνης-εοσίνη

Η χρώση αυτή βάφει τον πυρήνα των κυττάρων μπλε και το κυτταρόπλασμα ροζ.

- Οι ιστοί αρχικά από-παραφινολοιούνται σε ξυλένιο(3x 10 min)
- Στην συνέχεια ενυδατώνονται διαδοχικά σε αιθυλική αλκοόλη 100 % (3 min), 96 % αιθανόλη (2x2 min), 70 % αιθανόλη (2 min), 50 % αιθανόλη (2min).
- Γρήγορη πλύση σε απιονισμένο νερό.
- Τοποθέτηση ιστών σε αιματοξυλίνη για 2 min και πλύση σε καθαρό νερό.
- Τοποθέτηση σε acid alcohol για λίγα sec και πλύση σε νερό.
- Τοποθέτηση σε Scott's διάλυμα για 3 min και πλύση σε νερό.
- Γρήγορη πλύση σε 50% και 70% αιθανόλη.
- Τοποθέτηση στην εοσίνη για 3 min και πλύση σε νερό.
- Ακολουθεί αφυδάτωση των ιστών από 70% αιθανόλη σε 100% αιθανόλη και τελική εμβάπτυση σε ξυλένιο.

Κάλυψη πλακιδίων με DPX και παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

3. Αποτελέσματα

3.1. In silico αναζήτηση ενός πιθανού ρόλου επιγενετικών ενζύμων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης

Έχουμε εκτελέσει μια μετα-ανάλυση για το προφίλ έκφρασης γονιδιώματος του ανθρώπου από ασθενείς με ΙΠΙ και ποντικών σύμφωνα με το πειραματικό μοντέλο πνευμονικής ίνωσης.

Ο στόχος της *in silico* αναζήτησης ήταν να διερευνηθούν τα προφίλ έκφρασης των 84 βασικών γονιδίων (εικόνα 3.1.1), που κωδικοποιούν ένζυμα γνωστά ή προβλεπόμενα τα οποία τροποποιούν το γονιδιωματικό DNA και τις ιστόνες, ρυθμίζοντας την προσβασιμότητα της χρωματίνης και συνεπώς την έκφραση των γονιδίων στόχων τους, από δεδομένα σε ανθρώπους ασθενείς με IPF και σε ποντίκια.

Με βάση την αναζήτηση στο NCBI GEO βρήκαμε δεδομένα για ασθενείς με ΙΠΙ και από πειράματα σε ποντίκια με το μοντέλο της μπλεομυκίνης.

GEO	Platform	n per group	k to retrieve RAW data
GSE485	GPL81	n=2 (x2)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE485
GSE2640	GPL339	n=2 (x3)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE2640
GSE4231	GPL3331	n=2/7	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE4231
GSE8553	GPL891	n=4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE8553
GSE16846	GPL339	n=3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE16846
GSE18800	GPL1261	n=4-5	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE18800
GSE25640	GPL1261	n=3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE25640
GSE34814	GPL13912	n=2-3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE34814
GSE37635	GPL6885	n=6-7	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE37635
GSE40151	GPL1261	n=8	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE40151
GSE42301	GPL2894	n=3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42301
GSE43695	GPL6246	n=6	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE43695

Εικόνα 3.1.2: Συγκεντρωτικός πίνακας με τις βάσεις δεδομένων που αφορούν δεδομένα από πειράματα *in vivo* με βάση το μοντέλο της μπλεομυκίνης.

Γονίδιο	Κατηγορία- Λειτουργία
Kdm1a	λυσίνη (K)-διμεθυλάση 1A
Kdm4a	λυσίνη (K)-διμεθυλάση 4A
Kdm4c	λυσίνη (K)-διμεθυλάση 4C
Kdm5b	λυσίνη (K)-διμεθυλάση 5B
Kdm5c	λυσίνη (K)-διμεθυλάση 5C
Kdm6b	KDM1 λυσίνη (K)-διμεθυλάση 6B
Dnmt1	DNA μεθυλοτρανσφεράση (κυτοσίνη-5) 1
Dnmt3a	DNA μεθυλοτρανσφεράση 3A
Dnmt3b	DNA μεθυλοτρανσφεράση 3B
Atf2	Ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Cdyl	Ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Ciita	Ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Csrp2bp	Ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Eso1	Ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Eso2	Ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Hat1	Αμινοτρανσφεράση της ιστόνης
Kat2a	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 2A
Kat2b	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 2B
Kat5	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 5
Kat6a	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 6A
Kat6b	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 6B
Kat7	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 7
Kat8	K(λυσίνη) ακετυλοτρανσφεράση 8
Ncoa1	ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Ncoa3	ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Ncoa6	ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης
Hdac1	διακετυλάση ιστόνης 1
Hdac10	διακετυλάση ιστόνης 10
Hdac11	διακετυλάση ιστόνης 11
Hdac2	διακετυλάση ιστόνης 2
Hdac3	διακετυλάση ιστόνης 3
Hdac4	διακετυλάση ιστόνης 4
Hdac5	διακετυλάση ιστόνης 5
Hdac6	διακετυλάση ιστόνης 6
Hdac7	διακετυλάση ιστόνης 7
Hdac8	διακετυλάση ιστόνης 8
Hdac9	διακετυλάση ιστόνης 9
Carm1	αργινίνη μεθυλοτρανσφεράση 1
Dot1l	H3 μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Ehmt1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης 1
Ehmt2	λυσίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 2
Kmt2c	λυσίνη-K-μεθυλοτρανσφεράση 2C
Prmt1	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 1
Prmt2	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 2
Prmt3	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 3
Prmt5	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 5
Prmt6	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 6
Prmt7	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 7
Prmt8	αργινίνη-N-μεθυλοτρανσφεράση 8
Setdb2	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Smyd1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Smyd3	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Suv39h1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Aurka	φωσφορυλίωση ιστόνης
Aurkb	φωσφορυλίωση ιστόνης
Aurkc	φωσφορυλίωση ιστόνης
Nek6	φωσφορυλίωση ιστόνης
Pak1	φωσφορυλίωση ιστόνης
Rps6ka3	φωσφορυλίωση ιστόνης
Rps6ka5	φωσφορυλίωση ιστόνης
Dzip3	ουβικτινίωση ιστόνης
Mysm1	ουβικτινίωση ιστόνης
Rnf2	ουβικτινίωση ιστόνης
Rnf20	ουβικτινίωση ιστόνης
Ube2a	ουβικτινίωση ιστόνης
Ube2b	ουβικτινίωση ιστόνης
Usp16	ουβικτινίωση ιστόνης πεπτιδάση 16
Usp21	ουβικτινίωση ιστόνης πεπτιδάση 21
Usp22	ουβικτινίωση ιστόνης πεπτιδάση 22
Ash1l	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Kmt2e	λυσίνη (K)μεθυλοτρανσφεράση 2E
Nsd1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd1a	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd1b	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd2	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd3	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd4	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd5	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd6	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Setd7	λυσίνη μεθυλοτρανσφεράση
Setd8	λυσίνη μεθυλοτρανσφεράση
Setdb1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Suv420h1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Whsc1	μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης

Εικόνα 3.1.1

Αυτά είναι τα 84 γονίδια που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Αναλύθηκαν επίσης γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες στην επικράτεια SET, τα οποία περιέχουν όλα μία ομόλογη περιοχή που επιδεικνύει δραστηριότητα της ιστόνης μεθυλοτρανσφεράσης σε ορισμένα μέλη της οικογένειας.

Με βάση όλες τις βάσεις δεδομένων έχουμε τις συγκεντρωτικές τιμές των logFC για την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν τις επιγενετικές αλλαγές. Οι τιμές των logFC δείχνουν αν υπάρχει αύξηση ή μείωση της έκφρασης των γονιδίων ανάμεσα σε ασθενείς και ποντίκια με πνευμονική ίνωση και στην ομάδα ελέγχου δηλαδή τους φυσιολογικούς ανθρώπους και τα ποντίκια με έγχυση saline αντίστοιχα.

Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή των γονιδίων είναι να έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους σε σχέση με τα αντίστοιχα από τις ομάδες ελέγχου. Στατιστικά σημαντικές διαφορές δηλαδή, το $p < 0,05$ και να βρίσκονται στα πρώτα 20 γονίδια που τροποποιείται η έκφραση τους. Έχουμε συγκεντρώσει πόσες διαφορετικές βάσεις δεδομένων εντοπίσαμε το ίδιο προφίλ έκφρασης για κάθε γονίδιο, είτε υπερέκφρασης είτε υποέκφρασης.

Στον παρακάτω πίνακα συμπεριλαμβάνονται οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια από δεδομένα που προέρχονται όταν τα ποντίκια έχουν εκτεθεί σε μπλεομυκίνη από την 1^η έως την 7^η μέρα του πειραματικού μοντέλου (Εικόνα 3.1.4, 3.1.5) και οι Εικόνες 3.1.6, 3.1.7α δεδομένα της 14^{ης} μέρας του μοντέλου

Enzyme	Effect	Times Id
Nek6	UPregulated	x7
Esco2	UPregulated	x6
Aurka	UPregulated	x5
Aurkb	UPregulated	x4
Dzip3	UPregulated	x4
Rps6ka3	UPregulated	x4
Dnmt3a	UPregulated	x3
Hdac6	UPregulated	x3
Kdm5c	UPregulated	x2
Whsc1	UPregulated	x2

Εικόνα 3.1.4: Γονίδια που υπερεκφράζονται από την 1^η - 7^η μέρα του μοντέλου

Enzyme	Effect	Times Id
Hdac11	DWregulated	x7
Hdac5	DWregulated	x4
Prmt8	DWregulated	x4
Smyd3	DWregulated	x3
Kmt2e	DWregulated	x2
Kmt2c	DWregulated	x2
Kdm6b	DWregulated	x2
Smyd1	DWregulated	x2
Rps6ka5	DWregulated	x2

Εικόνα 3.1.5: Γονίδια που υποεκφράζονται από την 1^η - 7^η μέρα του μοντέλου.

Enzyme	Effect	Times Id
Aurka	UPregulated	x4
Aurkb	UPregulated	x3
Esco2	UPregulated	x3
Nek6	UPregulated	x3
Dzip3	UPregulated	x2
Kat2a	UPregulated	x2
Rps6ka3	UPregulated	x2
Whsc1	UPregulated	x2

Enzyme	Effect	Times Id
Ash1l	DWregulated	x2
Hdac11	DWregulated	x2
Kmt2c	DWregulated	x2
Kmt2e	DWregulated	x2
Nsd1	DWregulated	x2
Smyd1	DWregulated	x2
Suv420h1	DWregulated	x2

Εικόνα 3.1.6: Γονίδια που υπερεκφράζονται από την 14^η μέρα του μοντέλου

Εικόνα 3.1.7: Γονίδια που υποεκφράζονται από την 14^η μέρα του μοντέλου.

Από δεδομένα της **21^{ης} μέρας.**

Enzyme	Effect	Times Id
Nek6	UPregulated	x3
Esco2	UPregulated	x2

Enzyme	Effect	Times Id
Hdac11	DWregulated	x2
Suv420h1	DWregulated	x2

Εικόνα 3.1.8: Γονίδια που υπερεκφράζονται από την 21^η μέρα του μοντέλου.

Εικόνα 3.1.9: Γονίδια που υποεκφράζονται από την 21^η μέρα του μοντέλου.

Συγκεντρωτικά απ' όλα τα δεδομένα ανεξάρτητα από τη χρονική στιγμή του μοντέλου οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων καθορίζονται ως εξής.

Enzyme	Effect	Times Id
Nek6	UPregulated	x17
Esco2	UPregulated	x13
Aurka	UPregulated	x12
Aurkb	UPregulated	x10
Dzip3	UPregulated	x9
Rps6ka3	UPregulated	x8
Dnmt3a	UPregulated	x7
Whsc1	UPregulated	x7
Hdac6	UPregulated	x4
Pak1	UPregulated	x4

Enzyme	Effect	Times Id
Hdac11	DWregulated	x14
Suv420h1	DWregulated	x7
Kmt2e	DWregulated	x6
Hdac10	DWregulated	x5
Hdac5	DWregulated	x5
Kmt2c	DWregulated	x5
Prmt8	DWregulated	x5
Smyd3	DWregulated	x5
Kdm6b	DWregulated	x4
Rps6ka5	DWregulated	x4
Smyd1	DWregulated	x4
Ash1l	DWregulated	x3
Kdm5b	DWregulated	x3

Εικόνα 3.1.10: Γονίδια που υπερεκφράζονται συνολικά στην διάρκεια του μοντέλου.

Εικόνα 3.1.11: Γονίδια που υποεκφράζονται συνολικά στην διάρκεια του μοντέλου.

Αντίστοιχα σε δεδομένα από **ανθρώπινα δείγματα με πνευμονική ίνωση** τα επίπεδα έκφρασης είναι ως εξής.

Enzyme	Effect	Times Id
DZIP3	UPregulated	x6
AURKB	UPregulated	x5
KDM5B	UPregulated	x3
CIITA	UPregulated	x3
PRMT8	UPregulated	x3
AURKA	UPregulated	x3
PAK1	UPregulated	x3
ESCO2	UPregulated	x2
HDAC4	UPregulated	x2
EHMT2	UPregulated	x2
PRMT6	UPregulated	x2
SMYD3	UPregulated	x2

Enzyme	Effect	Times Id
MYSM1	DWregulated	x4
NCOA3	DWregulated	x3
KDM4C	DWregulated	x2
CSR2BP	DWregulated	x2
KAT6A	DWregulated	x2
KAT6B	DWregulated	x2
HDAC5	DWregulated	x2
DOT1L	DWregulated	x2
SETDB2	DWregulated	x2
USP16	DWregulated	x2
ASH1L	DWregulated	x2

Εικόνα 3.1.12: Γονίδια που υπερεκφράζονται σε ασθενείς με ΙΠΠ.

Εικόνα 3.1.13: Γονίδια που υποεκφράζονται σε ασθενείς με ΙΠΠ.

Με μια μικρή σύγκριση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μεταξύ ανθρώπινων δειγμάτων που νοσούν και ποντικών που έχουν νοσήσει με βάση το μοντέλο, υπάρχουν κάποια που ακολουθούν το ίδιο πρότυπο έκφρασης και στα δυο και κάποια που έχουν ακριβώς το αντίθετο.

Enzyme	Effect	Times Id	Είδη
AURKA	UPregulated	x3	Άνθρωπος
Aurka	UPregulated	x12	Ποντίκι
AURKB	UPregulated	x5	Άνθρωπος
Aurkb	UPregulated	x10	Ποντίκι
DZIP3	UPregulated	x6	Άνθρωπος
Dzip3	UPregulated	x9	Ποντίκι
ESCO2	UPregulated	x2	Άνθρωπος
Esco2	UPregulated	x13	Ποντίκι
PAK1	UPregulated	x3	Άνθρωπος
Pak1	UPregulated	x4	Ποντίκι

Enzyme	Effect	Times Id	Είδη
ASH1L	DWregulated	x2	Άνθρωπος
Ash1l	DWregulated	x3	Ποντίκι
HDAC5	DWregulated	x2	Άνθρωπος
Hdac5	DWregulated	x5	Ποντίκι

Εικόνα 3.1.15: Γονίδια που υποεκφράζονται κοινά σε ασθενείς και ποντίκια με IPF.

Εικόνα 3.1.14: Γονίδια που υπερεκφράζονται κοινά σε ασθενείς και ποντίκια με IPF.

Enzyme	Effect	Times Id	Είδη
KDM5B	UPregulated	x3	Άνθρωπος
Kdm5b	DWregulated	x3	Ποντίκι
SMYD3	UPregulated	x2	Άνθρωπος
Smyd3	DWregulated	x5	Ποντίκι
PRMT8	UPregulated	x3	Άνθρωπος
Prmt8	DWregulated	x5	Ποντίκι

Εικόνα 3.1.16: Γονίδια που εμφανίζουν αντίθετα προφίλ έκφρασης σε ασθενείς και ποντίκια με IPF.

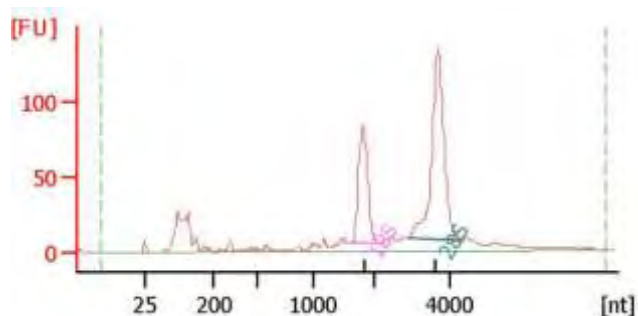
3.2. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται σε επιγενετικές αλλαγές στην παθογένεια της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης *in vivo* σε ποντίκια

Στόχος είναι η ποσοτικοποίηση της έκφρασης και η ταυτοποίηση των 84 γονιδίων που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις σε δείγματα cDNA από ιστούς ζώων που έχει γίνει έγχυση με μπλεομυκίνη και saline. Αυτή η διαδικασία

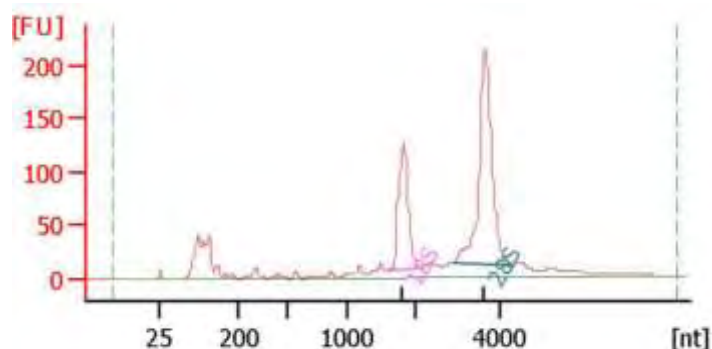
πραγματοποιείται με το RT² Prolifer PCR Array. Πρόκειται για μια τεχνική που έχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιεί ταυτόχρονα την έκφραση για τα 84 αυτά γονίδια, 5 γονίδια αναφοράς, 1 γονίδιο ελέγχου για DNA, 3 γονίδια ελέγχου για την αντίστροφη μεταγραφή και 3 θετικού ελέγχου. Έτσι, συμπληρώνονται 96 γονίδια που ελέγχονται ταυτόχρονα για κάθε δείγμα cDNA. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 3 δείγματα ζώων με saline και 3 με μπλεομυκίνη. Στη συνέχεια, αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ποντικών που είχαν ενεθεί με λάδι (ομάδα ελέγχου-3 δείγματα) και με τετραχλωράνθακα (3 δείγματα) για την επαγόμενη ηπατική ίνωση.

Αρχικά ελέγχθηκε η ποιότητα των RNA δειγμάτων από πνεύμονες ποντικών που είχαν πάρει saline (ομάδα ελέγχου) και ποντικών που είχαν πάρει μπλεομυκίνη και είχαν θυσιαστεί στις 14 ημέρες (εικόνες 3.2.1, 3.2.2). Για την ποιότητα των RNA δειγμάτων τα 18S και 28S παίζουν σημαντικό ρόλο, γι' αυτό βασικό κριτήριο είναι αυτές οι δύο κορυφές. Δείγματα με RIN πάνω από 6 θεωρούνται κατάλληλα για μικροσυστοιχίες ή άλλες αντίστοιχες τεχνικές που απαιτούν εξαιρετικά καλά δείγματα με ελάχιστα σπασίματα κλπ.

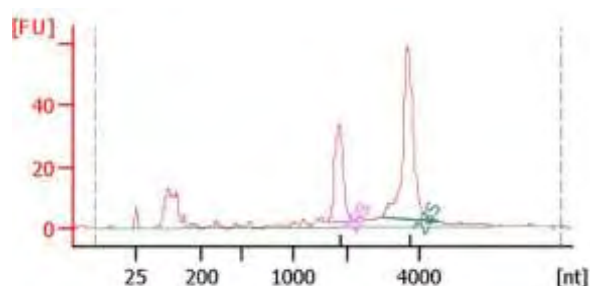
Εικόνα 3.2.1: Ανάλυση της ποιότητας των RNA δειγμάτων από ιστούς ζώων που είχαν υποστεί έγχυση με saline (3 δείγματα).



RNA Area: 977.3
 RNA Concentration: 550 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.60

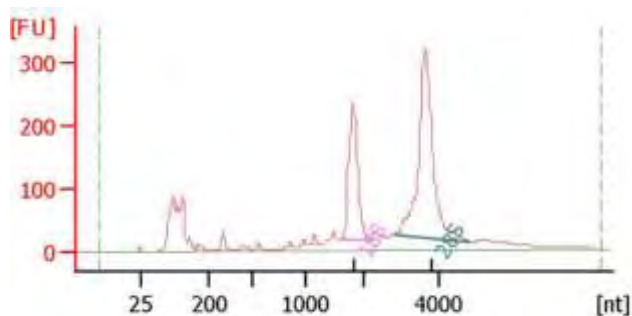


RNA Area: 1,448.9
 RNA Concentration: 815 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.9
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.70

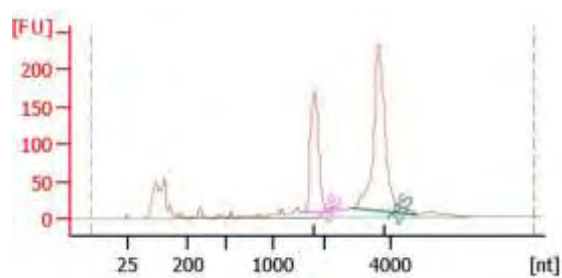


RNA Area: 404.3
 RNA Concentration: 228 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.0
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.70

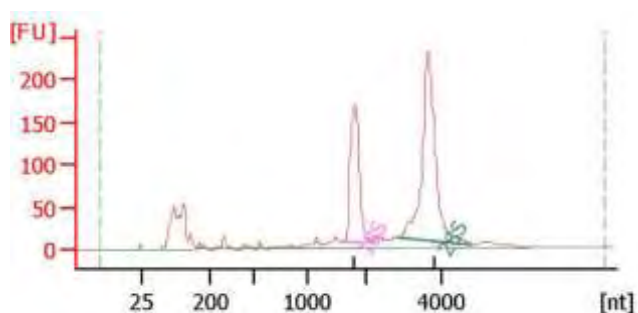
Εικόνα 3.2.2: Ανάλυση της ποιότητας των RNA δειγμάτων από ιστούς ζώων που είχαν υποστεί έγχυση με μπλεομυκίνη(3 δείγματα).



RNA Area: 2,900.2
 RNA Concentration: 1,632 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.9
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

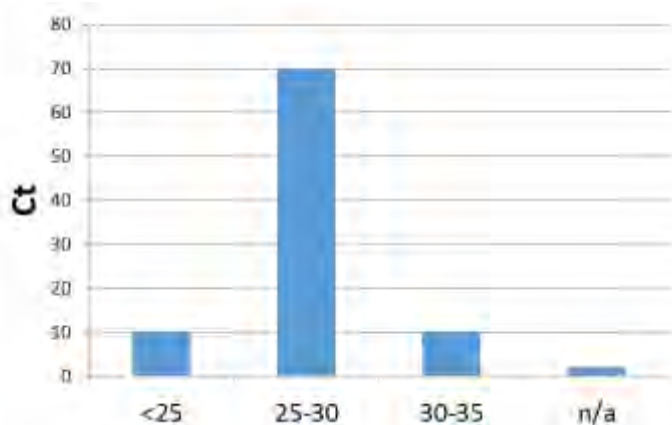


RNA Area: 1,847.0
 RNA Concentration: 1,040 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.9
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

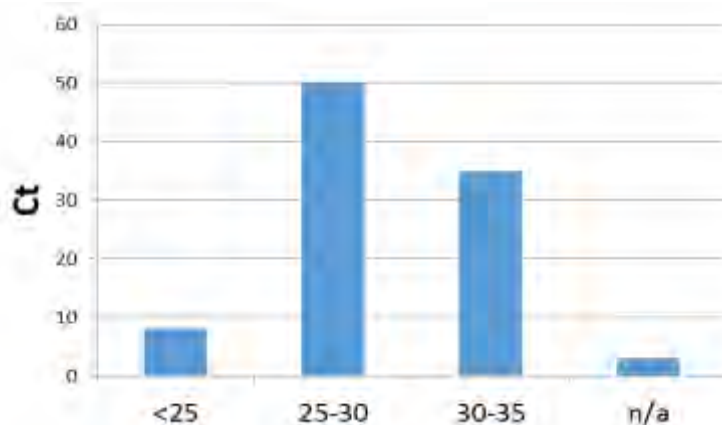


RNA Area: 1,808.2
 RNA Concentration: 1,018 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.80

Ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση το πρόγραμμα της εταιρείας. Στα παρακάτω σχήματα φαίνονται οι κύκλοι στους οποίους αντιστοιχεί η έκφραση των γονιδίων. Όσο πιο χαμηλοί κύκλοι τόσο πιο υψηλή είναι η έκφραση των γονιδίων αυτών.

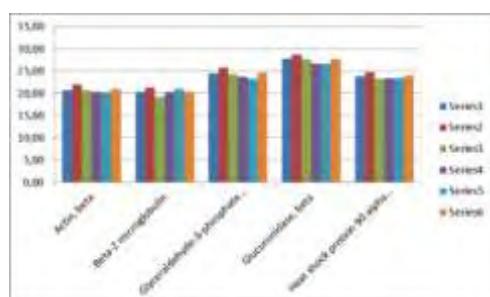


Εικόνα 3.2.3: Η έκφραση των γονιδίων (κύκλοι PCR) στα δείγματα του πνεύμονα.

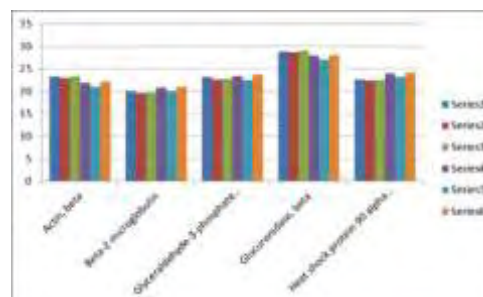


Εικόνα 3.2.4: Η έκφραση των γονιδίων (κύκλοι RCR) στα δείγματα του ήπατος.

Η κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων έγινε με τα εξής γονίδια αναφοράς ακτίνη, B2m(β2-μικροσφαιρίνη), GAPDH, Glu και Heat shock. Η έκφραση αυτών των γονιδίων αναφοράς στα 6 δείγματα του πνεύμονα (3 δείγματα ελέγχου και 3 δείγματα με μπλεομυκίνη) και στα 6 δείγματα του ήπατος (3 δείγματα ελέγχου και 3 δείγματα με τετραχλωράνθρακα) φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα. Η έκφραση των γονιδίων αναφοράς περιμένουμε να είναι ομοιόμορφη και στα 6 δείγματα του κάθε οργάνου.



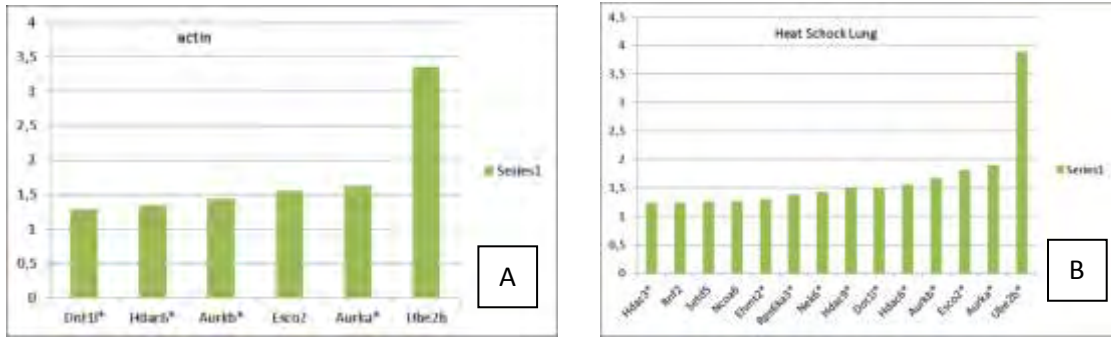
Εικόνα 3.2.5: Έκφραση των γονιδίων αναφοράς στα δείγματα του πνεύμονα.



Εικόνα 3.2.6: Έκφραση των γονιδίων αναφοράς στα δείγματα του ήπατος.

3.2.1. Γονίδια που υπερεκφράζονται στην πνευμονική ίνωση.

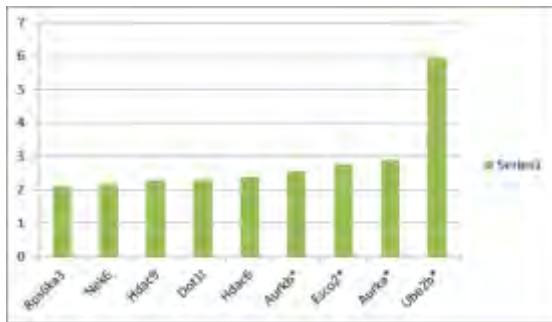
Στην συνέχεια αναλύθηκε η έκφραση των 84 γονιδίων στα δείγματα του πνευμόνων με μπλεομυκίνη συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου, δηλαδή των πνευμόνων που είχαν ενεθεί με saline. Παρατίθεται αυτή η σύγκριση με κανονικοποίηση των δειγμάτων ως προς τα διαφορετικά γονίδια αναφοράς. Η σύγκριση αυτή έχει θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Όταν η σύγκριση αποφέρει σε θετικά αποτελέσματα σημαίνει ότι τα γονίδια υπερεκφράζονται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, άρα υπερεκφράζονται στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Αντίστοιχα όταν τα αποτελέσματα είναι αρνητικά, τότε τα γονίδια υποεκφράζονται στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση.



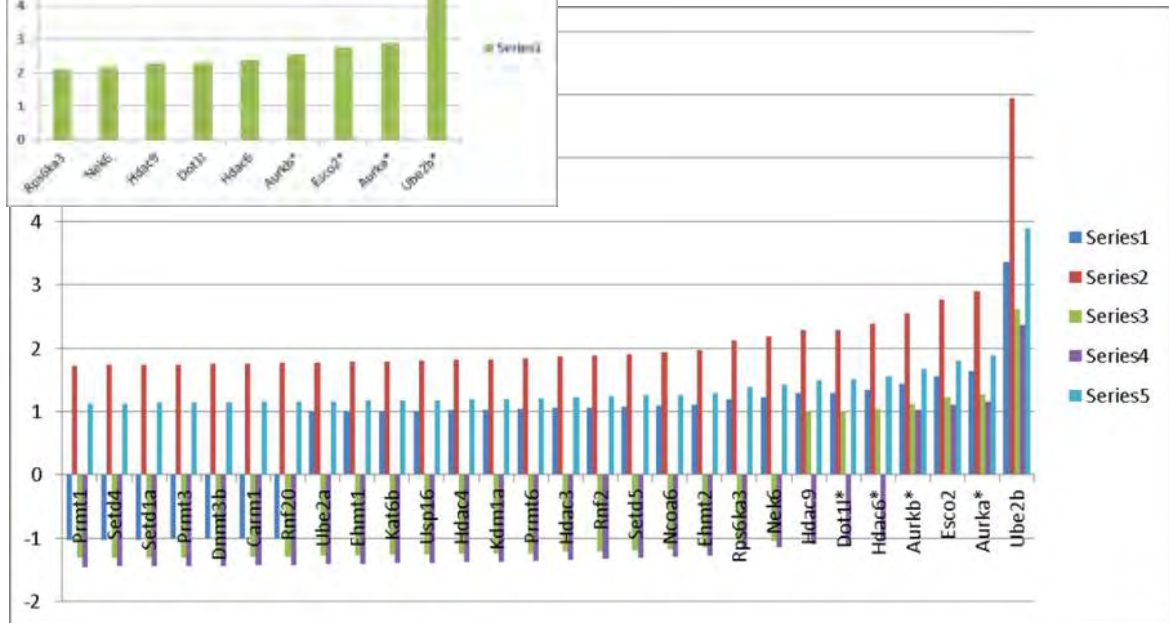
B2M

Εικόνα 3.2.1.1: Υπερέκφραση γονιδίων στην ΙΙΙ με κανονικοποίηση του γονιδίου αναφοράς Α)Ακτίνη, Β)Heatshock, Γ) B2m(β2- μικροσφαιρίνη).

Γ



Το τελευταίο γράφημα παρουσιάζει την έκφραση των γονιδίων ταυτόχρονα και στα 5 γονίδια αναφοράς,

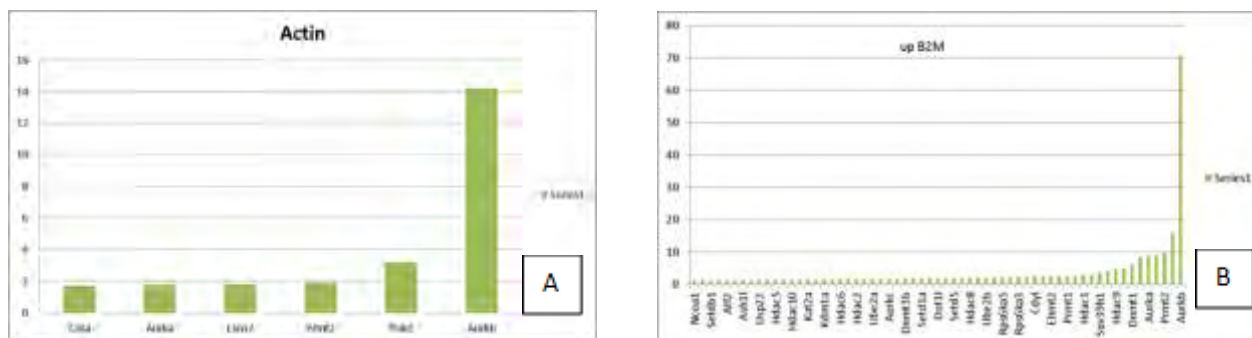


ενώ έχουν τονιστεί αυτά των οποίων η έκφραση είναι αυξημένη σε όλα τα γονίδια αναφοράς.

Εικόνα 3.2.1.2: Έκφραση των γονιδίων κανονικοποιημένα με όλα τα γονίδια αναφοράς. Σημειώνονται τα γονίδια που υπερεκφράζονται (Aurkb, Esco2, Aurka, Ube2b) και με τα 5 γονίδια αναφοράς στην ΙΙΙ.

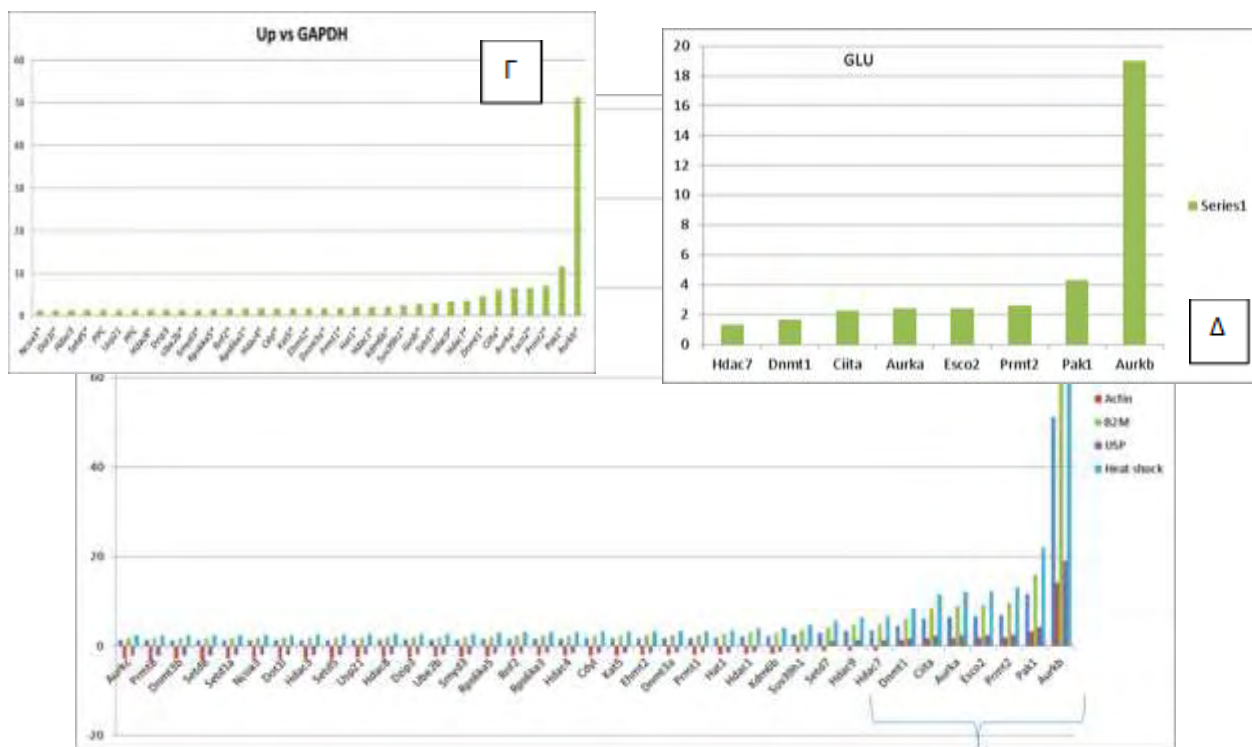
3.2.2. Γονίδια που υπερεκφράζονται στην ηπατική ίνωση.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αντίστοιχα γραφήματα της υπερέκφρασης των γονιδίων στην ηπατική ίνωση.



Εικόνα 3.2.2.1: Υπερέκφραση των γονιδίων στην Η.Ι με κανονικοποίηση του γονιδίου αναφοράς Α)Ακτίνη, Β) B2m, Γ)GAPDH, Δ)Glu

Το αντίστοιχο γράφημα για την ηπατική ίνωση παρουσιάζει την υπερέκφραση των γονιδίων ταυτόχρονα και στα 5 γονίδια αναφοράς, ενώ έχουν τονιστεί τα γονίδια των οποίων η έκφραση είναι αυξημένη σε όλα τα γονίδια

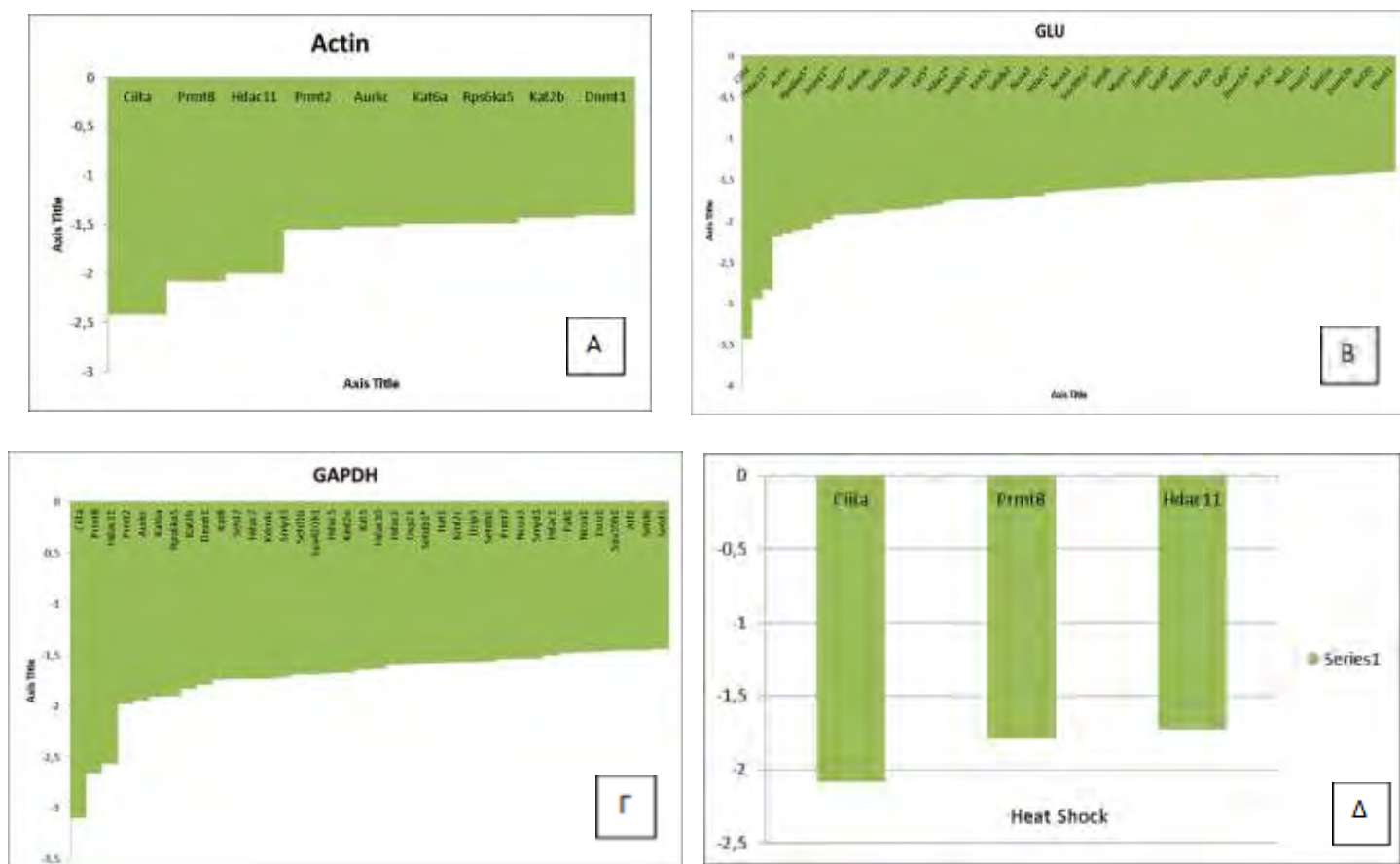


αναφοράς.

Εικόνα 3.2.2.2: Έκφραση των γονιδίων κανονικοποιημένα με όλα τα γονίδια αναφοράς. Σημειώνονται τα γονίδια (Dnmt1, Ciita, Aurka, Esco2, Prmt2, Pak1, Aurkb) που υπερεκφράζονται και με τα 5 γονίδια αναφοράς στην Η.Ι.

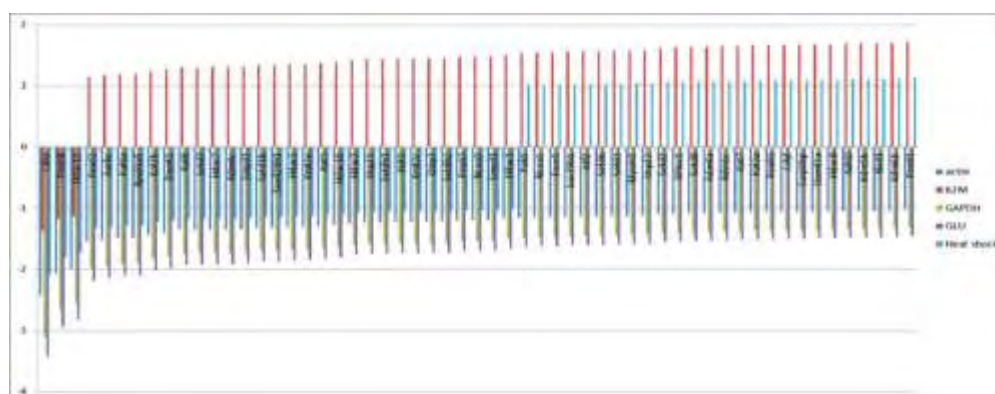
3.2.3. Μείωση της έκφρασης των γονιδίων στην πνευμονική ίνωση

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα γονίδια που υποεκφράζονται στην πνευμονική ίνωση με βάση τα γονίδια αναφοράς.



Εικόνα 3.2.3.1: Υπόεκφραση των γονιδίων στην Ι.Π.Ι με κανονικοποίηση του γονιδίου αναφοράς Α)Ακτίνη, Β) Glu, Γ)GAPDH, Δ)Heat Shock

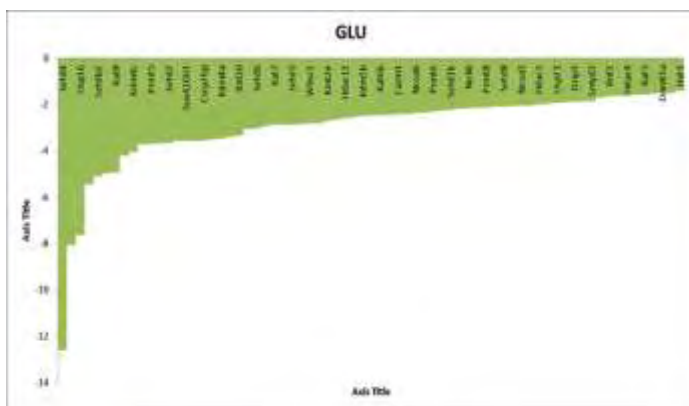
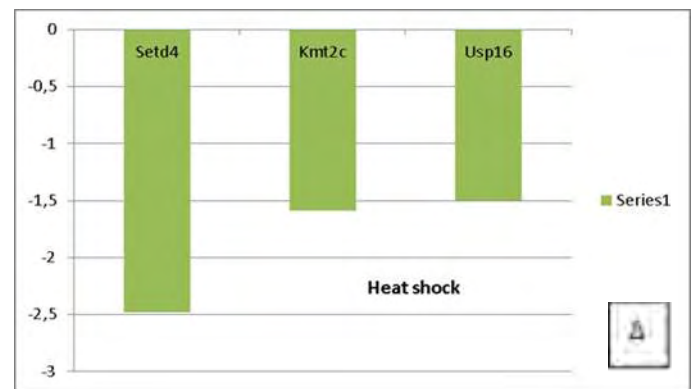
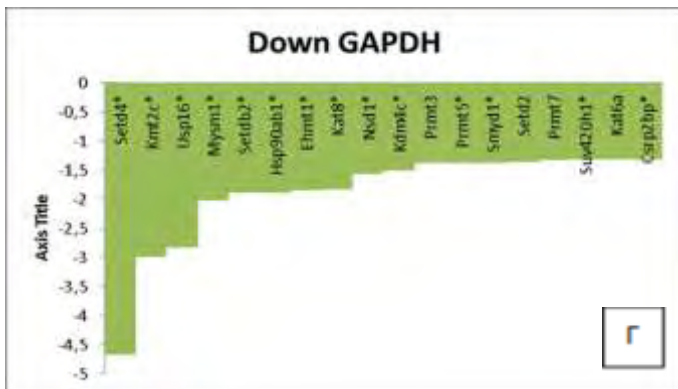
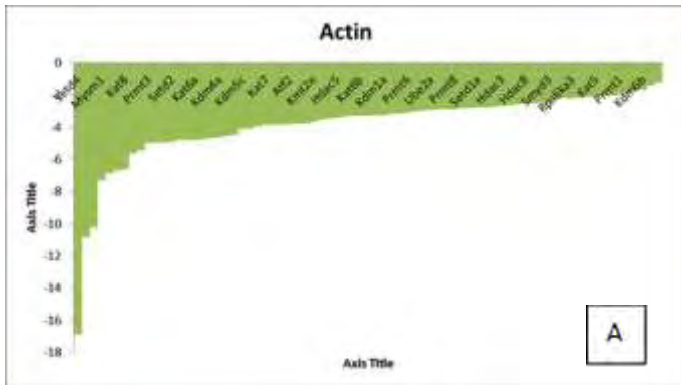
Η υποέκφραση των γονιδίων αυτών στην πνευμονική ίνωση ταυτόχρονα σε όλα τα γονίδια αναφοράς, τονίζει ποιά γονίδια εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο.



Εικόνα 3.2.3.2: Έκφραση των γονιδίων κανονικοποιημένα με όλα τα γονίδια αναφοράς. Σημειώνεται τα γονίδια (Ciita, Prmt8, Hdac11) που υποεκφράζονται και με τα 5 γονίδια αναφοράς στην Ι.Π.Ι.

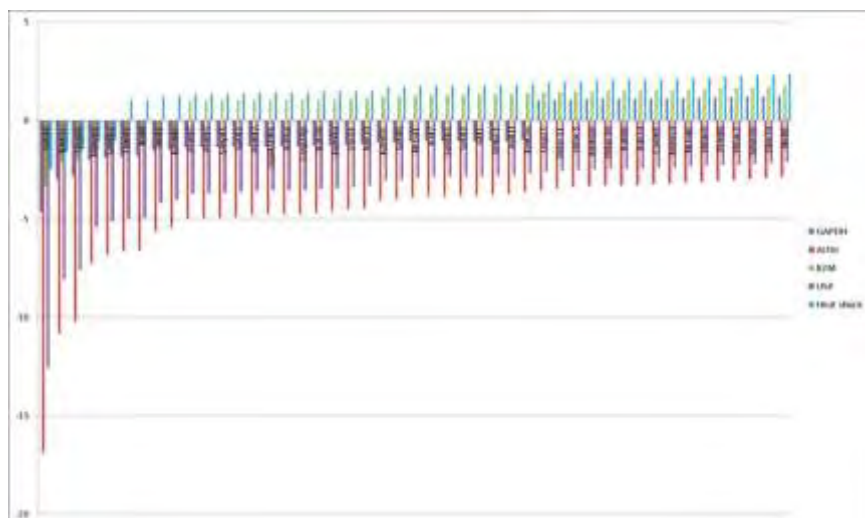
3.2.4. Μείωση της έκφρασης των γονιδίων στην ηπατική ίνωση

Ακόμα τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ηπατική ίνωση στα διαφορετικά γονίδια αναφοράς παρατίθενται στα παρακάτω γραφήματα.



Εικόνα 3.2.3.1: Υπόεκφραση των γονιδίων στην Η.Ι με κανονικοποίηση του γονιδίου αναφοράς Α)Ακτίνη, Β)B2m, Γ)GAPDH, Δ)HeatShock, Ε) Glu

Στο επόμενο γράφημα τονίζονται τα γονίδια που υποεκφράζονται σε όλα τα γονίδια αναφοράς στην ηπατική ίνωση.



Εικόνα 3.2.3.2:

Σημειώνονται τα γονίδια (Setd4, Kmt2c, Usp16, Mym1, Setdb2, Dnmt1) που υποκεκφράζονται και με τα 5 γονίδια αναφοράς στην Η.Π.

3.3. Σύγκριση του επιπέδου έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται σε επιγενετικές αλλαγές στην ίνωση του πνεύμονα και του ήπατος.

Στη συνέχεια έγινε μια μικρή σύγκριση των γονιδίων που υπερεκφράζονται σε όλα τα γονίδια αναφοράς μεταξύ της πνευμονικής και ηπατικής ίνωσης, προσπαθώντας να βρεθούν κοινά μονοπάτια μεταξύ των 2 ασθενειών. Η σύγκριση στηρίζεται σε γονίδια που εμφανίζουν ίδιο πρότυπο σε τουλάχιστον 3 από τα γονίδια αναφοράς.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια, των οποίων η έκφραση αυξάνεται (πίνακας 3.3.1.) και μειώνεται (πίνακας 3.3.2)

Γονίδια
Aurka
Aurkb
Esco2
Ube2b
Dot1l
Hdac9
Rps6ka3
Ehtm2
Hdac3
Setd5
Hdac4

Γονίδια
Kmt2c
Setbd2
Kat8
Nsd1
Kdm4c
Prmt5
Smyd1
Suv20h1
Kmt2e
Ash1l
Whsc1
Kdm5c
Setd3
Ncoa1

Εικόνα 3.3.1: Γονίδια που υπερεκφράζονται
3.3.2: Γονίδια που υποεκφράζονται σε πνευμονική και ηπατική ίνωση
πνευμονική και ηπατική ίνωση

Εικόνα
νται σε

3.4. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των επιγενετικών ενζύμων και της *in silico* αναζήτησης στην παθόγεια της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση.

Τέλος, πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των δεδομένων από την *in silico* αναζήτηση γονιδίων που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις στην παθόγεια της πνευμονικής ίνωσης και στην ποσοτικοποίηση των γονιδίων αυτών *in vivo* σε επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Πρώτα η σύγκριση που αφορά την υπερέκφραση των γονιδίων αυτών και δεύτερον αντίστοιχα την υποέκφραση. Η παραπάνω σύγκριση στηρίζεται σε γονίδια που τουλάχιστον σε 3 γονίδια αναφοράς εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης

Συγκρίνοντας τους πίνακες 3.1.10:Γονίδια που υπερεκφράζονται στην πνευμονική ίνωση από την *in silico* αναζήτηση και 3.2.1.2:Γονίδια που υπερεκφράζονται στην ΙΙΙ από την ποσοτικοποίηση της έκφρασης τους με RT²ProliferArrayPCR, παρουσιάζουμε τα κοινά γονίδια, των οποίων αυξάνεται η έκφραση στην ΙΙΙ.

Γονίδια	Περιγραφή-Λειτουργία
Aurka	Ser-Thr κινάση A
Aurkb	Ser-Thr κινάση B
Esco2	Εγκαθίδρυση της αδελφής χρωματίδας N-ακετυλοτρανσφεράσης 2
Nek6	Κινάση 6
Hdac6	Διακετυλάση ιστόνης
Rsp6ka3	Ριβοσωμική κινάση S6

Πίνακας 3.4.1: Κοινά γονίδια που υπερέκφραζονται από την σύγκριση δεδομένων και της *in vivo* ποσοτικοποίησης σε πειραματικό μοντέλο ίνωσης.

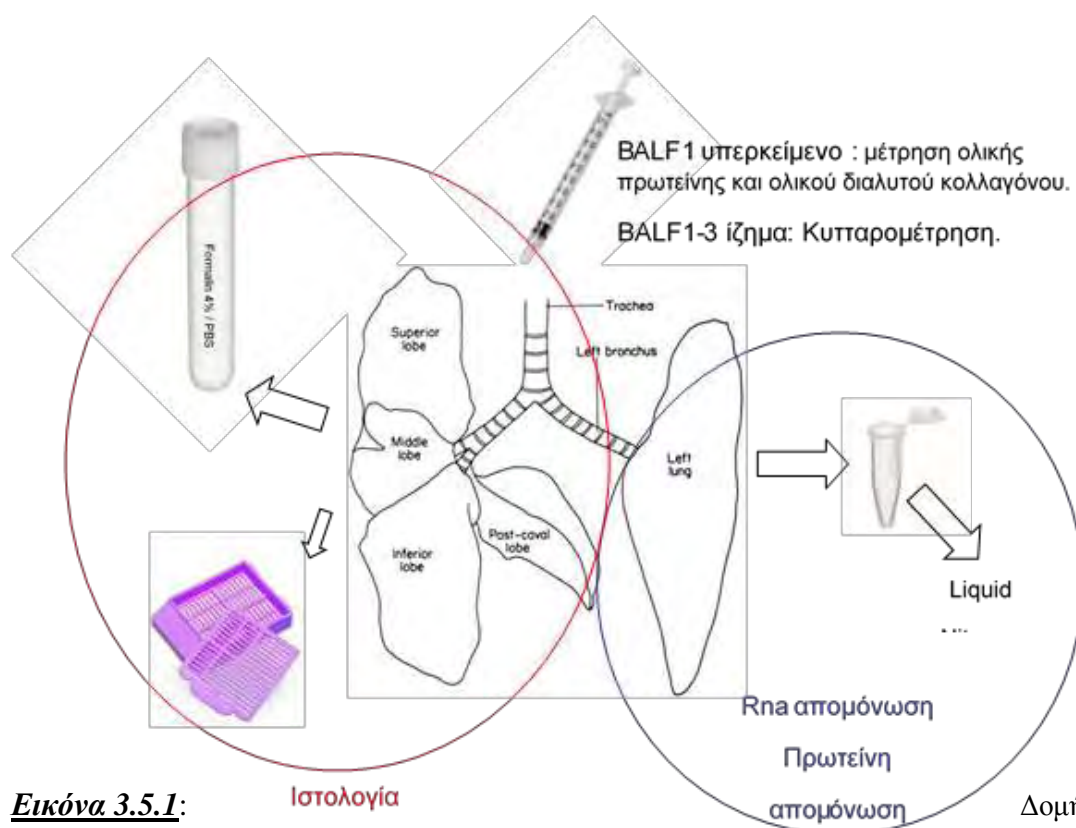
Στην συνέχεια, συγκρίνουμε αντίστοιχα τους πίνακες 3.1.11 και 3.2.3.2 και παρουσιάζουμε τα κοινά γονίδια, των οποίων η έκφραση μειώνεται στην ΙΙΙ.

Γονίδια	Περιγραφή-Λειτουργία
Hdac11	Διακετυλάση ιστόνης 11
Suv420h1	Ακετυλοτρανσφεράση ιστόνης – καταστολέας ποικιλοχρωμίας(dros)
Hdac10	Διακετυλάση ιστόνης 10
Kmt2e	Μεθυλοτρανσφεράση 2E-λευχαιμία
Prmt8	Μεθυλοτρανσφεράση 8
Kmt2c	Μεθυλοτρανσφεράση 2C- λευχαιμία
Hdac5	Διακετυλάση ιστόνης 5
Rps6ka5	Ριβοσωμική κινάση S6
Smyd3	Μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Smyd1	Μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Ash11	Μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
Kdm5b	Διμεθυλάση- καρκίνος
Kdm6b	Διμεθυλάση ιστόνης

Πίνακας 3.4.2: Κοινά γονίδια που υποεκφράζονται από τη σύγκριση δεδομένων και της *in vivo* ποσοτικοποίησης σε πειραματικό μοντέλο ίνωσης.

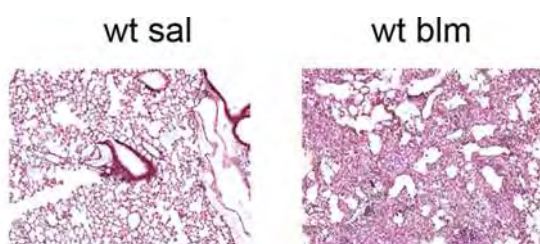
3.5.Βελτίωση του πειραματικού προτύπου της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης *in vivo*.

Αρχικά όπως περιγράφεται παραπάνω, μια ομάδα ποντικών αγρίου τύπου ενέθηκαν οροτραχειακά με μπλεομυκίνη 0,026 units και μια ομάδα με saline. Μετά τη θυσία των ζώων μετά από 14 μέρες συλλέχθηκαν τα δείγματα όπως φαίνεται παρακάτω, και με τις κατάλληλες διεργασίες αξιολογήθηκαν οι δείκτες της νόσου της πνευμονικής ίνωσης.



Εικόνα 3.5.1: Ιστολογία του πνεύμονα και ο τρόπος συλλογής κατά τη θυσία των ζώων κατά την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση

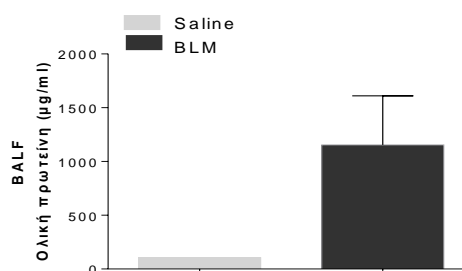
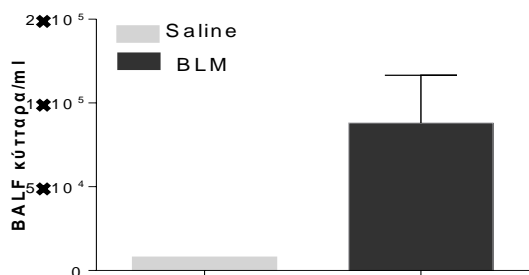
Στους ιστούς που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη-εοσίνη, που δείχνει την χαρακτηριστική αρχιτεκτονική της πνευμονικής ίνωσης όπως στην εικόνα 3.5.2, όπου φαίνονται τα δίκτυα που ενώνονται λόγω της αύξησης του κολλαγόνου, μειώνοντας τον χώρο των φυσιολογικών κυψελίδων, γεγονός που προκαλεί τη δυσκολία της φυσιολογικής διάτασης των πνευμόνων και δυσκολίας στην αναπνοή.



Εικόνα 3.5.2: Χρώση των ιστών με αιματοξυλίνη-εοσίνη. Δεξιά η

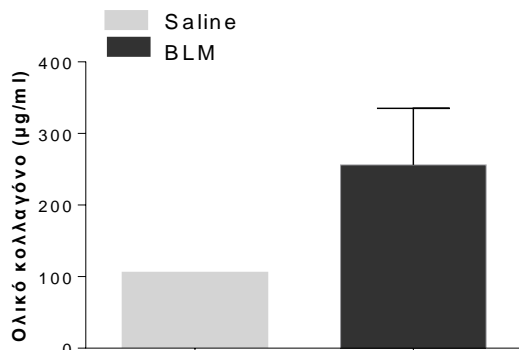
χαρακτηριστική μικροσκοπική εμφάνιση της πνευμονικής ίνωσης.

Στην συνέχεια, παρουσιάζονται οι διαφορές των δειγμάτων μεταξύ ποντικών με πνευμονική ίνωση και ποντικών της ομάδας ελέγχου όσον αφορά τα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού υγρού του πνεύμονα, την ολική πρωτεΐνη καθώς και το διαλυτό κολλαγόνο. Και οι τρεις αυτές μετρήσεις αποτελούν δείκτες της νοσηρότητας των ζώων.



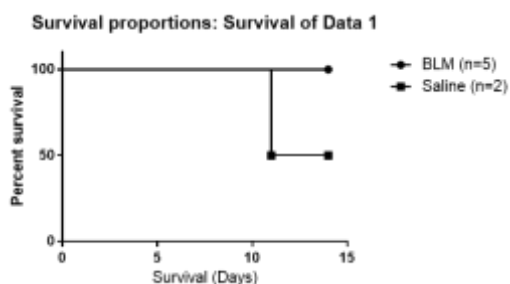
Εικόνα 3.5.3: Διάγραμμα μέτρησης κυττάρων από το balf σε ζώα με saline και ίνωση(μπλεομυκίνη)

Εικόνα3.5.4: Διάγραμμα μέτρησης ολικής πρωτεΐνης από το balf

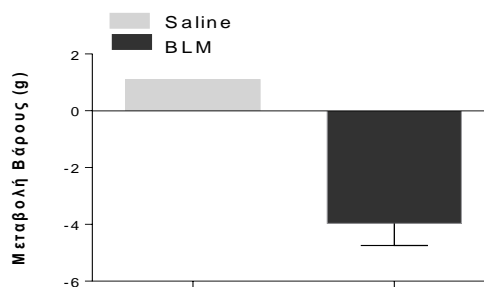


Εικόνα3.5.5: Διάγραμμα μέτρησης ολικού διαλυτού Κολλαγόνου σε balf ζώων

Τέλος παρουσιάζονται δύο βασικά χαρακτηριστικά που έχουν να κάνουν με την κατάσταση των ζώων όπως η επιβίωση των ποντικών που πήραν μέρος στο πειραματικό μοντέλο, καθώς και η αλλαγή που παρατηρείται στο βάρος τους.



Εικόνα 3.5.6: Διάγραμμα επιβίωσης των ποντικών από το μοντέλο της μπλεομυκίνης



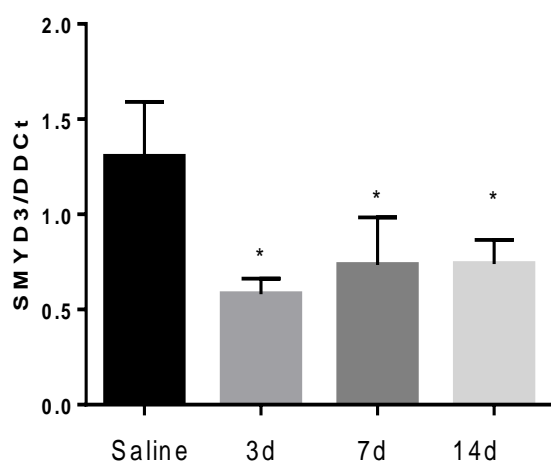
Εικόνα 3.5.7: Διάγραμμα της μεταβολής του βάρους από την 1^η έως την 14^η μέρα.

3.6. *In vivo* μελέτη του πιθανού ρόλου του SMYD3 στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση

3.6.1. Ρόλος του SMYD3 στην ίνωση

Θυμίζουμε ότι από την *in silico* μελέτη σε δεδομένα από ποντίκια με πνευμονική ίνωση, το γονίδιο *Smyd3* υποεκφράζεται, δηλαδή η έκφραση του μειώνεται στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη ΙΠΙ σε σχέση με τα ποντίκια που έχουν ενεθεί με saline (ομάδα ελέγχου). Αυτή η τροποποίηση της έκφρασης του γονιδίου στην ίνωση επιβεβαιώθηκε από την ποσοτικοποίηση του γονιδίου (κεφ.3.2.)

Ωστόσο πραγματοποιείται *in vivo* ποσοτικοποίηση του SMYD3 με real-time PCR σε δείγματα από ποντίκια αγρίου τύπου που είχαν εγχυθεί οροτραχειακά με μπλεομυκίνη και saline, καθώς και σε δείγματα με ενδοτραχειακή έγχυση και θυσία των ζώων σε διάφορες χρονικές στιγμές.

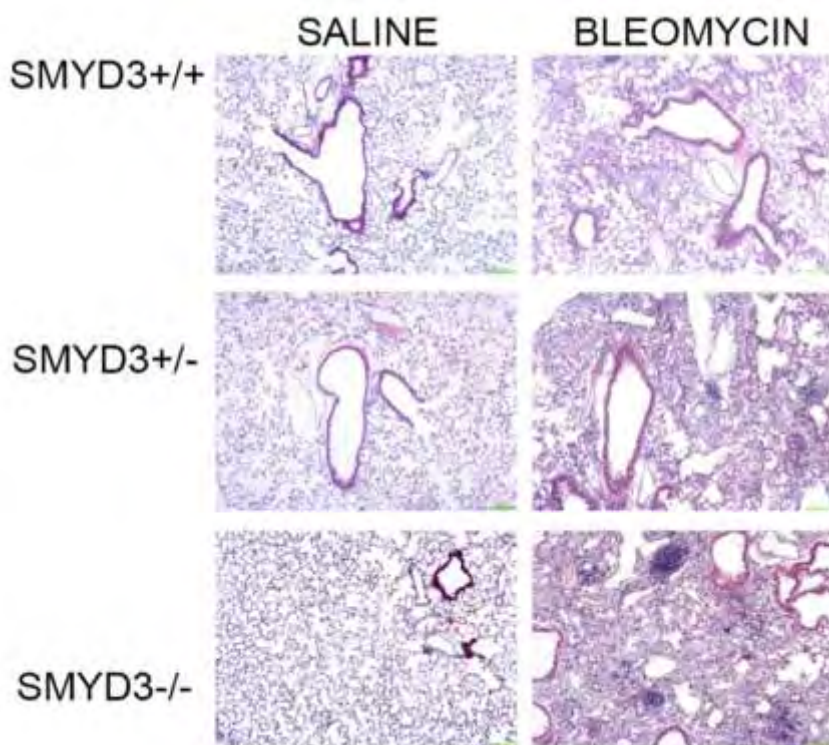


Εικόνα 3.6.1: Διάγραμμα της *in vivo* ποσοτικοποίησης της έκφρασης του SMYD3 σε διάφορα χρονικά σημεία του μοντέλου.

3.6.2.Επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση σε ποντίκια με γονότυπο SMYD3

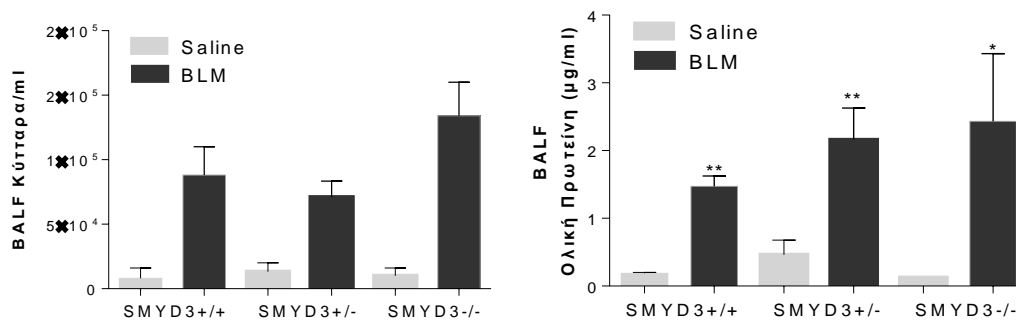
Αρχικά, έγινε αναπαραγωγή των ποντικών αγρίου τύπου, ετερόζυγων, knock-out SMYD3 ώστε το πείραμα να περιέχει ζώα από όλους τους γονοτύπους από την ίδια γενιά. Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ως προς το γονίδιο SMYD3, αγρίου τύπου, ετερόζυγα και ομόζυγα ελέγχθηκαν για τη γενική κατάσταση του πνεύμονα τους και την αναπνευστική λειτουργία με την τεχνική του villy. Δεν υπήρχε καμία διαφορά σε σχέση με τα φυσιολογικά, άρα ότι αποτέλεσμα αφορά τη λειτουργία των πνευμόνων οφείλεται στην επαγόμενη πνευμονική ίνωση και δεν προέρχεται από γενετική τροποποίηση ή ευαισθησία.

Μετά τον καθορισμό του γονοτύπου των ποντικών, έγινε διαχωρισμός των ζώων και ποντίκια με γονότυπο SMYD3 $+/+$ (άγριου τύπου), SMYD3 $+/-$ (ετερόζυγα knock-out) και SMYD3 $-/-$ (ομόζυγα knock-out) ενέθηκαν με μπλεομυκίνη και saline οροταχειακά σύμφωνα με το αντίστοιχο μοντέλο όπως και παραπάνω. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν την 14^η μέρα και συλλέχθηκαν τα δείγματα από το βρογχοκυψελιδικό υγρό και τους ιστούς των πνευμόνων. Οι τομές των ιστών έγιναν χρώση με αιματοξυλίνη – εοσίνη (Εικόνα 6.2.1) ώστε να δούμε τη μικροσκοπική εικόνα των πνευμόνων, αξιολογώντας το επίπεδο νοσηρότητας της ΙΠΙ στους διαφορετικούς γονοτύπους των SMYD3- ποντικών.



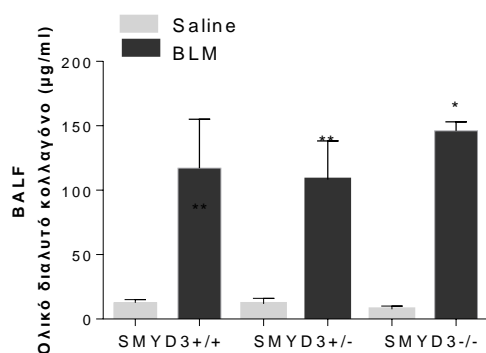
Εικόνα 3.6.2.1: Οι ιστοί των πνευμόνων έγιναν χρώση με αιματοξυλίνη-εοσίνη. Χαρακτηριστικός δείκτης της ΙΠΙ.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα γραφήματα της μέτρησης κυττάρων(εικόνα 3.6.2.2), ολικής πρωτεΐνης(εικόνα 3.6.2.3) και κολλαγόνου(εικόνα 3.6.2.4) στα βρογχοκυψελιδικά υγρά από τους πνεύμονες των ζώων



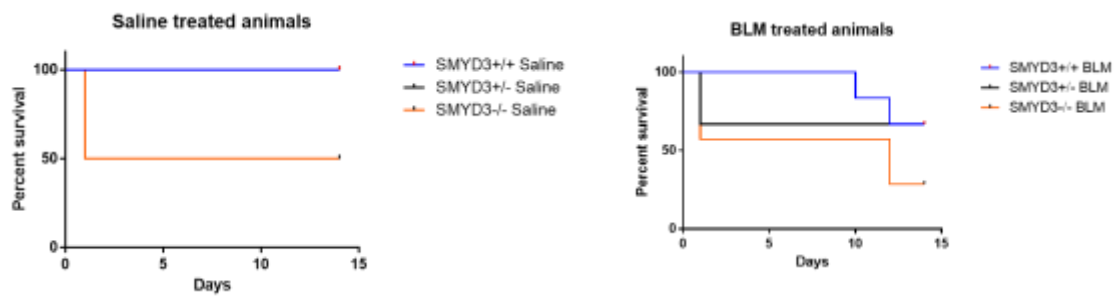
Εικόνα 3.6.2.2: Διάγραμμα μέτρησης κυττάρων στο balf.

Εικόνα 3.6.2.3: Διάγραμμα μέτρησης ολικής πρωτεΐνης στο balf



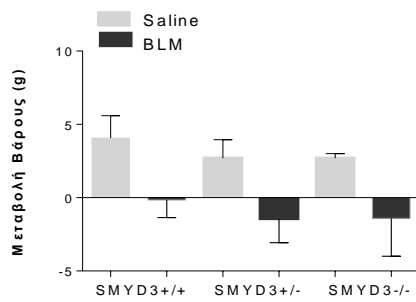
Εικόνα 3.6.2.4: Διάγραμμα μέτρησης διαλυτού Κολλαγόνου στο balf.

Τέλος παρουσιάζεται η καμπύλη επιβίωσης των ζώων (εικόνα 3.6.2.5) από το μοντέλο και η καμπύλη τους βάρους (εικόνα 3.6.2.6) με βάση τη διαφορά από την 1^η μέρα έως και την 14^η μέρα στα ζώα που ενέθηκαν με saline και σε αυτά με μπλεομυκίνη.



Εικόνα 3.6.2.5α: Καμπύλη επιβίωσης ποντικών με έγχυση saline

Εικόνα 3. 6.2.5β: Καμπύλη επιβίωσης ποντικών με έγχυση μπλεομυκίνης



Εικόνα3.6.2.6: Διάγραμμα μεταβολής του βάρους των ποντικών κατά την διάρκεια του μοντέλου.

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Αρχικά, από την *in silico* μελέτη και την ποσοτικοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλιώσεις, ακετυλιώσεις) σε *in vivo* πειράματα, βρέθηκε ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων που η έκφραση τους αλλάζει στην ΙΠΙ, είτε αυξάνεται είτε μειώνεται. Αυτό σημαίνει ότι πιθανόν με κάποιο τρόπο μέσω ενός μονοπατιού, να εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γονίδια που η έκφραση τους τροποποιείται με τον ίδιο τρόπο στην πνευμονική κ ηπατική ίνωση. Ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών και η εναπόθεση κολλαγόνου είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό σε όλες τις μορφές ίνωσης. Οπότε, κοινά γονίδια που υπερκεράζονται μπορούν να κρύβουν πιο γενικούς μηχανισμούς στη δημιουργία μυοϊνοβλαστών, ανεξάρτητα από το όργανο στο οποίο βρίσκονται και πιο πιθανόν να έχουν να κάνουν με τη συμπεριφορά του ινοβλάστη.

Επιλέχθηκε προς περαιτέρω μελέτη το γονίδιο SMYD3, μια μεθυλο-τρανσφεράση, γιατί η έκφραση του μειώνεται σε ποντίκια αγρίου τύπου που ενέθηκαν με μπλεομυκίνη και επιπλέον πρόσφατα βρέθηκε ότι παίζει ρόλο σε άλλες ασθένειες όπως καρκίνος κλπ.

Στην συνέχεια, μετά από επαγωγή πειραματικής ίνωσης με μπλεομυκίνη παρατηρήθηκε επιδείνωση της νόσου στα SMYD3^{-/-} ποντίκια σε σχέση με τα SMYD3^{+/-}, SMYD3^{+/+}. Συγκεκριμένα τα SMYD3^{-/-} ποντίκια παρουσίασαν αυξημένη θνησιμότητα, αύξηση της φλεγμονής και της ίνωσης όπως φαίνεται από την ιστολογία αλλά και από τις ποσοτικές μετρήσεις (BALF κύτταρα, πρωτεΐνη, κολλαγόνο και βάρος ζώων). Η μη εξαγωγή σημαντικής διαφοράς μεταξύ των διαφόρων γενοτύπων οφείλεται στο χαμηλό αριθμό ζώων SMYD3^{-/-}. λόγω της αυξημένης θνησιμότητάς τους.

Περαιτέρω έρευνα πρέπει να στραφεί και στα υπόλοιπα γονίδια που διαφοροποιούνται στην ίνωση, στην εύρεση της συμβολή τους στην ασθένεια. Ακόμα για το γονίδιο SMYD3, χρειάζεται να γίνει επανάληψη του αρχικού αυτού πειράματος με περισσότερα ζώα, όπως επίσης και *in vitro* πειράματα σε ινοβλάστες. Σε περίπτωση σημαντικής συμβολής του SMYD3 στην παθογένεια της νόσου, μελλοντικός στόχος είναι η εύρεση του μηχανισμού εμπλοκής του μέσω της μελέτης των γονιδίων στόχων του SMYD3.

Βιβλιογραφία

- Comer, S. B., Ba, M., Singer, A.C. & Gerthoffer, T. W. (2015). Epigenetic targets for novel therapies of lung diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 147, 91–110.
- Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F.P., Li, M., Yagyu, R. & Nakamura, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature Cell Biology*, 6, (8), 731-40.
- Peserico, A., Germani, A., Sanese, P., Barbosa, A.J., Virgilio, V., Fittipaldi, R., Fabini, E., Bertucci, C., Varchi, G., Moyer, M.P., Caretti, G., Del Rio, A. & Simone, C. (2015). A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol*, 230, (10), 2447-60.
- Williamson, D.J., Sadofsky, R.L. & Hart, P.S. (2014). The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis. *Experimental Lung Research*, 41, (2), 1–17.
- Wynn, A.T. & Ramalingam R. T. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, 18, (7), 1028-1040.
- Wynn, T.A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 208, (7), 1339-50.
- Yang, V. I. & Schwartz, A. D. (2015). Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research*, 165, (1), 48-60.

Διαδικτυακή βιβλιογραφία

- <http://jem.rupress.org/content/208/7/1339/F3.expansion.html>.
- <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber>.
- www.researchgate.net Cell Counting with Neubauer Chamber.
- <https://www.celgene.com/the-potential-of-epigenetics>.