

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Διδακτορική διατριβή του Π. Α. Καββαδά**

**Μελέτη του ρόλου της ιντεγκρινοσυνδεόμενης κινάσης στην  
πνευμονική ίνωση**

**2010**

**«Μελέτη του ρόλου της ιντεγκρινοσυνδεόμενης κινάσης  
στην πνευμονική ίνωση»**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

<b>Κουρέτας Δημήτριος</b>	Καθηγητής, Φυσιολογία Ζωων Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
<b>Σταθόπουλος Κωνσταντίνος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιολογική Χημεία Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Πατρών
<b>Χαρώνης Αριστείδης</b>	Ερευνητής Β΄, Ιστολογία Τομέας Ιστολογίας ΠΒΕΑΑ

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

<b>Κουρέτας Δημήτριος:</b>	Καθηγητής, Φυσιολογία Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
<b>Σταθόπουλος Κωνσταντίνος:</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιολογική Χημεία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
<b>Χαρώνης Αριστείδης:</b>	Ερευνητής Β΄, Τομέας Ιστολογίας, ΠΒΕΑΑ
<b>Μαρκουλάτος Παναγιώτης:</b>	Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
<b>Μαμούρης Ζήσης:</b>	Καθηγητής, Γενετική Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
<b>Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος:</b>	Καθηγητής, Πνευμολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
<b>Δανιήλ Ζωή:</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια, Πνευμολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Υποψήφιος Διδάκτορας: Καββαδάς Παναγιώτης**

**Θέμα διδακτορικής διατριβής: «Μελέτη του ρόλου της  
ιντεγκρινοσυνδεόμενης κινάσης στην πνευμονική ίνωση»**

## **ISBN DATA**

# **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**Υποψήφιος διδάκτορας: Καββαδάς Παναγιώτης**

**Έτος ολοκλήρωσης διδακτορικής διατριβής: 2010**

Μελέτη του ρόλου της ιντεγκρινοσυνδεόμενης κινάσης στην πνευμονική  
ίνωση, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: XX**

**Συνολικός αριθμός σελίδων: 136**

**Αριθμός Πινάκων: 7**

**Αριθμός εικόνων: 35**

**Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 122**

Η ίνωση είναι μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή και τη μειωμένη αποικοδόμηση συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος, κυρίως κολλαγόνου. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του κολλαγόνου, και επομένως έχουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της ινωγένεσης, είναι οι μυοϊνοβλάστες. Από άποψη μοριακού μηχανισμού, η ίνωση παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το μηχανισμό επούλωσης τραυμάτων. Ο μηχανισμός επούλωσης περιλαμβάνει μια αρχική φάση φλεγμονής, μια φάση πολλαπλασιασμού των μυοϊνοβλαστών και αύξησης της παραγωγής κολλαγόνου και τέλος την αναγέννηση του ιστού που συνοδεύεται από την απόπτωση των μυοϊνοβλαστών και την αποικοδόμηση της περίσσειας του κολλαγόνου. Στην ίνωση, οι μυοϊνοβλάστες παραμένουν ενεργοί και η παραγωγή κολλαγόνου συνεχίζεται με αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής και τελικά την απώλεια της λειτουργικότητας του ιστού.

Ίνωση μπορεί πρακτικά να εκδηλωθεί σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς. Κατά συνέπεια, αν και υπάρχουν ινωτικοί μηχανισμοί που είναι κοινοί για όλους τους ιστούς, υπάρχουν ταυτόχρονα σημαντικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν ιστοεξειδίκευση. Τα τελευταία χρόνια, η προέλευση των μυοϊνοβλαστών είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που έχει αρχίσει να θεωρείται ότι παρουσιάζει ιστοεξειδίκευση αφού πιθανές πηγές των μυοϊνοβλαστών έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να είναι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί όπως το επιθήλιο, το ενδοθήλιο, κύτταρα του μυελού των οστών, προϋπάρχοντες ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, λιποαποταμιευτικά κύτταρα κλπ.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην ίνωση του πνευμονικού ιστού αφού η ίνωση του πνεύμονα αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό μιας μεγάλης οικογένειας ασθενειών, των νόσων του διάμεσου πνευμονικού χώρου. Η συνηθέστερη από τις ασθένειες αυτές είναι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση για την οποία δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία ενώ και οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την εκδήλωση και την εξέλιξη της νόσου παραμένουν άγνωστοι. Στα άγνωστα στοιχεία σχετικά με την πνευμονική ίνωση συμπεριλαμβάνεται και η προέλευση των ινοβλαστών αφού μέχρι στιγμής υπάρχουν αλληλοσυγκρουόμενα στοιχεία που εμπλέκουν, σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, διάφορες πηγές όπως το επιθήλιο, το ενδοθήλιο, τους ήδη υπάρχοντες ινοβλάστες καθώς και κύτταρα από το μυελό των οστών. Ο ακριβής προσδιορισμός της πηγής ή του ποσοστού συμμετοχής της κάθε πηγής των



μυοϊνοβλαστών στην πνευμονική ίνωση θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικός για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου.

Η ιντεγκρινοσυνδεδεμένη κινάση (integrin-linked kinase, ILK) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, λόγω της αλληλεπίδρασής της με το κυτταροπλασματικό τμήμα των  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ -υπομονάδων των ιντεγκρινών, η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση λειτουργιών όπως η κίνηση, η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, η αντοχή στις μηχανικές πιέσεις και η διατήρηση της συνοχής του ιστού. Παράλληλα, έχει προταθεί ότι η ILK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B (Akt) καθώς και ότι φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 $\beta$  κάτι που σημαίνει ότι, έστω και έμμεσα, η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση και άλλων κυτταρικών λειτουργιών όπως η απόπτωση και η αγγειογένεση.

Στην ίνωση, η ILK έχει μελετηθεί εκτεταμένα στα νεφρά και σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ. Και στις δύο περιπτώσεις εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την παραγωγή μυοϊνοβλαστών. Στη νεφρική ίνωση, η ILK μεσολαβεί, σε απόκριση στον TGF- $\beta$ , την έναρξη της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT), μιας διαδικασίας μέσω της οποίας επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες. Στην ηπατική ίνωση, μεσολαβεί μια παρόμοια διαδικασία μέσω της οποίας λιποαποταμιευτικά κύτταρα μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες. Στην πνευμονική ίνωση, ο ρόλος της ILK δεν είχε μελετηθεί μέχρι τώρα.

Για να μελετήσουμε το ρόλο της ILK στην πνευμονική ίνωση διεξάγαμε τόσο μια *in vitro* όσο και μια *in vivo* προσέγγιση. Για την *in vitro* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα της σειράς A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο TGF- $\beta$  ώστε να επαχθούν ινωτικά χαρακτηριστικά και EMT. Αρχικά, δείξαμε ότι η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF- $\beta$  μέσω ενός smad-εξαρτώμενου μηχανισμού. Ακολούθως, για να προσδιορίσουμε το ρόλο της ILK στο κυψελιδικό EMT χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του siRNA. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, σε αντίθεση με τη νεφρική ίνωση, η ILK δεν εμπλέκεται στην έναρξη του EMT αλλά σε μεταγενέστερα στάδια όπως αυτό της έκφρασης μεσεγχυματικών δεικτών και πιθανώς σε αυτό της κυτταρικής μετανάστευσης. Παράλληλα, με την τεχνική του siRNA μελετήσαμε και το κατά

πόσο η ILK εμπλέκεται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ILK εμπλέκεται στη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, στην επέκταση των επιθηλιακών κυττάρων και στην κυτταρική μετανάστευση. Τέλος, σε αντίθεση με ότι ισχύει σε άλλους κυτταρικούς τύπους, δεν εμπλέκεται στην προστασία από την απόπτωση.

Για την *in vivo* μελέτη χρησιμοποιήσαμε αρχικά το μοντέλο υπερέκφρασης του TGF- $\beta$  μέσω αδenoϊών από το οποίο δεν προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της μπλεομυκίνης στο οποίο δείξαμε ότι μετά από μια αρχική αύξηση, η ILK μειώνεται στα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα και ξανααυξάνεται κατά τα τελευταία χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Για να αποσαφηνίσουμε τους λόγους της αυξομείωσης της ILK προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας και διπλού ανοσοφθορισμού ώστε να προσδιορίσουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν την ILK στα διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η μείωση της ILK στα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα οφείλεται στη νέκρωση/απόπτωση διαφόρων επιθηλιακών πληθυσμών ενώ η μεταγενέστερη αύξηση στην εισροή κυττάρων που εκφράζουν την ILK όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού καθώς και ένας υποπληθυσμός μυοϊνοβλαστών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ILK είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που μπορεί να έχει διαφορετικούς ρόλους στην ινωτική απόκριση ανάλογα με τον εκάστοτε ιστό. Πιστεύουμε ότι η διαπίστωση αυτή ενισχύει την άποψη ότι τα μόρια κλειδιά και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ινωτική απόκριση πρέπει να εξετάζονται ξεχωριστά για κάθε ιστό.

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Ιστολογίας του Τομέα Βασικής Έρευνας Ι του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, υπό τον Δρ. Αριστείδη Χαρόνη, από τον Ιανουάριο του 2006 έως τα τέλη του 2009. Χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας μέσω του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003. Επιστημονικός Υπεύθυνος του έργου ήταν ο Δρ. Πασχάλης Σιδεράς, διευθυντής του Κέντρου Ανοσολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Δεδομένου ότι οι άνθρωποι που νιώθω την υποχρέωση να ευχαριστήσω για τη συμβολή τους, άμεση ή έμμεση, στην πραγματοποίηση αυτού του διδακτορικού είναι αρκετοί και ο τρόπος συμβολής του καθενός διαφορετικός, κατέληξα στη μέθοδο της ευχαριστίας με χρονολογική σειρά.

Πιστεύω ότι πάντα θα αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Έλενα Γεωργιάτσου καθώς και τη Δρ. Αγγελική Λυμπεροπούλου που ήταν οι άνθρωποι που με δίδαξαν για πρώτη φορά το πώς δουλεύει κανείς σε έναν εργαστηριακό πάγκο.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει φυσικά στον Δρ. Άρη Χαρόνη που, για ανεξιχνίαστους μέχρι στιγμής λόγους, με επέλεξε για το διδακτορικό αυτό και με ανέχτηκε για τέσσερα περίπου χρόνια. Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Δημήτρη Κουρέτα και Κώστα Σταθόπουλο που με μεγάλη προθυμία δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της ΤΣΕ και επέλυσαν άμεσα όλα τα γραφειοκρατικά θέματα που προέκυψαν κατά καιρούς.

Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τα ζωικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν στο κέντρο ανοσολογίας του ΠΒΕΕΑ από τις ομάδες των Δρ. Πασχάλη Σιδερά και Δρ. Ευάγγελου Ανδρεάκου. Ξεχωριστή μνεία οφείλω να κάνω στους Δρ. Ελίνα Προδρομίδα, Δρ. Εύη Πρωτοπαπαδάκη καθώς και στους διδακτορικούς φοιτητές Χαρούλα Ξηρακιά και Ειρήνη Αποστόλου που δούλεψαν με τα ζωικά μοντέλα αλλά και στον Δρ. Σταύρο Γιαγκλή για τη βοήθεια του με τη RT RT PCR.

Τόσο στα παλαιότερα μέλη του τμήματος Ιστολογίας όπως η Δρ. Κατερίνα Κυπραίου, η Αύρα Αλμπέρτη, η Βαλέρια Καλτεζιώτη, η Άννα Αγαπάκη και η Φανή Καραγιάννη που μου δίδαξαν πολλά από τα πράγματα που χρειάστηκαν για τη διεκπεραίωση του διδακτορικού μου, όσο και στα νεότερα όπως ο Δρ. Πάνος Πολίτης, η Νίκη Πράκουρα, η Μαρία Οικονομάκη, ο Θανάσης Στεργιόπουλος και η Ράνια Τροχάτου που αποδείχθηκαν πολύ υπομονετικοί, οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ. Η λίστα των ανθρώπων που με βοήθησαν με αναλώσιμα είναι πολύ μεγάλη για να την παραθέσω αλλά τους ευχαριστώ και αυτούς εξίσου καθώς και τη Δρ. Ελένη Ριγανά και τον Δρ. Σταμάτη Παγκάκη από τη μονάδα imaging του ΠΒΕΕΑ για τη βοήθεια με το confocal imaging και με διάφορα λογισμικά επεξεργασίας εικόνας.

Τέλος, επειδή, καλώς ή κακώς, για εμένα οι άνθρωποι θα είναι πάντα πιο σημαντικοί από τα ερευνητικά ιδρύματα, τον εργαστηριακό εξοπλισμό και τα project αισθάνομαι πολύ τυχερός γιατί μου δόθηκε η ευκαιρία να γνωρίσω ανθρώπους που τους θεωρώ πια φίλους μου. Ελένη, Άγγελε, Μαρία, Έλενη ευχαριστώ για την **παρέα**.

## Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	21
A. Ίνωση.....	22
Ορισμός της ίνωσης.....	22
Ίνωση και διαδικασία επούλωσης τραυμάτων.....	23
Κοινοί και εξειδικευμένοι μηχανισμοί ίνωσης.....	26
Η προέλευση των μυοϊνοβλαστών.....	27
B. Πνεύμονας.....	30
Δομή και λειτουργία.....	30
Πνευμονική ίνωση.....	32
Παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης.....	34
Πηγές μυοϊνοβλαστών στην πνευμονική ίνωση.....	37
Ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης.....	39
Γ. Ιντεγκρινοσυνδεόμενη κινάση.....	41
Δομή και λειτουργία.....	41
Ιντεγκρινοσυνδεόμενη κινάση και ίνωση.....	46
Ιντεγκρινοσυνδεόμενη κινάση και επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή.....	48
Ιντεγκρινοσυνδεόμενη κινάση και πνεύμονας.....	53
Δ. Ινωτικά συστήματα εκτός πνεύμονα.....	54
Νεφρική ίνωση.....	54
Διαβήτης τύπου II.....	54
2. Σκοπός.....	56
3. Υλικά και μέθοδοι.....	58
A. Υλικά.....	59
Αντισώματα.....	59
Small interference RNA (siRNA).....	60
Primers.....	60
Κυτοκίνες/ Αναστολείς μονοπατιών επαγόμενα από κυτοκίνες.....	60
Κυτταρική σειρά.....	61
Εκχύλισμα πρωτεϊνών από ζωικό μοντέλο υπερέκφρασης TGF-β.....	61
Ζωικό μοντέλο μπλεομυκίνης.....	61
Διάφορα διαλύματα.....	62

B. Μέθοδοι.....	63
Επάωση κυτταροκαλλιέργειας με κυτοκίνες και αναστολείς μονοπατιών που επάγονται από κυτοκίνες .....	63
Μείωση της έκφρασης της ILK με siRNA .....	63
Απόπτωση .....	64
Κυτταρική μετανάστευση .....	64
Κυτταρική επέκταση (cell spreading) .....	65
Μοντέλο μπλεομυκίνης .....	66
Εκχύλιση πρωτεϊνών και Western blotting.....	67
Εκχύλιση RNA και Real time RT PCR .....	70
Χρώση κολλαγόνου με τη χρωστική Picro-sirius red.....	71
Ανοσοϊστοχημική χρώση.....	72
Ανοσοφθορισμός .....	73
4. Αποτελέσματα .....	75
A. In vitro .....	76
Επαγωγή ινωτικών χαρακτηριστικών και EMT σε A549 κύτταρα .....	76
Η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF-β.....	80
Ο TGF-β επάγει την αύξηση της ILK μέσω ενός smad2/3-εξαρτώμενου μηχανισμού .....	82
ILK και κυψελιδικό EMT.....	88
Επιπτώσεις της αποσιώπησης της ILK σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες .	91
B. In vivo .....	97
Δημιουργία μοντέλου υπερέκφρασης TGF-β.....	97
Ποσοτικοποίηση της ILK στο μοντέλο υπερέκφρασης του TGF-β .....	98
Δημιουργία μοντέλου μπλεομυκίνης.....	100
Εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης στο μοντέλο της μπλεομυκίνης .....	101
Ποσοτικοποίηση της ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης .....	103
Κατανομή της ILK στον ινωτικό πνεύμονα.....	105
Κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν την ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης	107
Γ. Ινωτικά συστήματα εκτός πνεύμονα.....	113
Νεφρική ίνωση.....	113
Διαβήτης τύπου II .....	114
5. Συζήτηση.....	115
6. Βιβλιογραφία.....	123

### **Κατάλογος πινάκων**

**Πίνακας 1:** Κυριότεροι ιστοί που προσβάλλονται από ίνωση και πιθανά αίτια (*Wynn, 2008*).

**Πίνακας 2:** Κλινικά και παθολογικά (μοριακά-κυτταρικά) χαρακτηριστικά των ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου (*Green, 2002*).

**Πίνακας 3:** Πιθανές πηγές προέλευσης των κολλαγόνο-παραγωγών κυττάρων στον ινωτικό πνεύμονα (*Kisseleva and Brenner, 2008*).

**Πίνακας 4:** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφόρων ζωικών μοντέλων πνευμονικής ίνωσης (*Moore and Hogaboam, 2008*).

**Πίνακας 5:** Χημικοί αναστολείς των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τον TGF-β και οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 6:** Ομάδες ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Στα κοντρόλ ζώα χορηγήθηκαν αδενοϊοί ανασυνδυασμένοι με το GFP γονίδιο. Στα πειραματικά ζώα χορηγήθηκαν αδενοϊοί ανασυνδυασμένοι με το γονίδιο του TGF-β1. Η χορήγηση των αδενοϊών έγινε είτε ενδορινικά είτε ενδοτραχειακά.

**Πίνακας 7:** Ομάδες ζώων και χρονικά διαστήματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μοντέλο της μπλεομυκίνης. Στα κοντρόλ ζώα χορηγήθηκε PBS ενώ στα πειραματικά διάλυμα μπλεομυκίνης σε PBS (150 mg/kg).

## Κατάλογος εικόνων

**Εικόνα 1:** Επιθήλιο και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός. Διακρίνονται ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα μακρομόρια του εξωκυττάριου στρώματος (*Alberts et al., 2002*).

**Εικόνα 2:** Φυσιολογική επούλωση τραύματος και ινωτική διαδικασία. Η έκθεση σε παθογόνο ερέθισμα πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης που αποτελείται από τρεις φάσεις: φλεγμονή, φάση πολλαπλασιασμού και αναγέννηση του ιστού. Σε περίπτωση χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο παράγοντα ενεργοποιείται η ινωτική διαδικασία (*Wynn, 2007*).

**Εικόνα 3:** Ορισμένες από τις πιθανές πηγές μυοϊνοβλαστών. Διακρίνονται οι τοπικοί ινοβλάστες, τα Hepatic stellate cells, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα με προέλευση από το μυελό των οστών (*Kisseleva and Brenner, 2008*).

**Εικόνα 4:** Η δομή του αναπνευστικού συστήματος. Α) Ρινική και στοματική κοιλότητα, φάρυγγας, λάρυγγας, τραχεία, βρόγχοι, πνεύμονες, καρδιά, πλευρά. Β) βρογχικό δέντρο, διάφραγμα, πλευρική κοιλότητα και μεμβράνη. Γ) Βρογχιόλια και κυψελίδες.

**Εικόνα 5:** Η αναπνευστική μοίρα. Διακρίνονται τα αναπνευστικά βρογχιόλια, οι κυψελιδικοί πόροι και οι κυψελίδες. Κάτω, σε μεγέθυνση, το κυψελιδικό τοίχωμα και οι δομές που αποτελούν το φραγμό αίματος-αέρα.

**Εικόνα 6:** Η οικογένεια των ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου αριθμεί πάνω από 200 μέλη. Έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα διάφορα αίτια όπως η σαρκοείδωση, λοιμώξεις του αναπνευστικού, η ανοσοκαταστολή, διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου, φάρμακα και ακτινοβολία, περιβαλλοντικοί παράγοντες, αγγειακές νόσοι. Ένα μεγάλο ποσοστό των ILDs έχει άγνωστα αίτια. Οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθείς (*Green, 2002*).

**Εικόνα 7:** Δομή και αλληλεπιδράσεις της ILK. Η ILK σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεΐνες που είτε συνδέονται με τον κυτταροσκελετό είτε συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Η αμινοτελική περιοχή αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων η ILKAP και η PINCH η οποία συνδέεται και με τους υποδοχείς



κινασών τυροσίνης (receptor tyrosine kinase). Το καρβοξυτελικό άκρο διαθέτει ενζυμική δραστικότητα και φωσφορυλιώνει υποστρώματα όπως η Akt και η GSK3β ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά με τη β ιντεγκρίνη και διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων η α και β παρβίνες και η παξιλλίνη. Οι παρβίνες και η παξιλλίνη συνδέουν το σύμπλοκο, άμεσα ή έμμεσα, με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Το κεντρικό τμήμα διαθέτει ένα PH-like μοτίβο μέσω του οποίου αλληλεπιδρά με την PIP3. ILKAP: ILK associated protein, ANK: ankyrin repeat, PH: pleckstrin homology, PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (*Hannigan et al., 2005*).

**Εικόνα 8:** Σηματοδότηση μέσω της ILK. Η ILK φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την 3-κινάση της φωσφατίδουλοϊνοσοτόλης (PI3K) ενώ αναστέλλεται από τις φωσφατάσες ILK-associated protein (ILKAP) και Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN). Η ενεργοποιημένη ILK φωσφορυλιώνει τις Akt και Glycogen-synthase kinase-3β (GSK3β) ενεργοποιώντας την πρώτη και απενεργοποιώντας τη δεύτερη. Κατά συνέπεια, ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, το EMT, τη μετανάστευση κλπ (*Legate et al., 2006*).

**Εικόνα 9:** Οι σύνδεσμοι ενός επιθηλιακού κυττάρου με ένα γειτονικό κύτταρο και τη βασική μεμβράνη. Η πλευρική σύνδεση επιτυγχάνεται μέσω των tight junctions (claudins), των adherent junctions (cadherins), των δεσμοσωματίων (cadherins, desmogleins, desmoplakins) και των gap junctions (connexins). Η σύνδεση με τη βασική μεμβράνη επιτυγχάνεται μέσω της ιντεγκρινών οι οποίες συνδέονται με τα νημάτια ακτίνης ή τα ημι-δεσμοσωμάτια που είναι μέλη των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού (*Alberts et al., 2002*).

**Εικόνα 10:** Το νεφρικό EMT μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα βασικά στάδια: 1) την απώλεια των συνδέσμων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, 2) την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και την έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών, 3) τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης από μεταλλοπρωτεϊνάσες και 4) τη μετανάστευση των μετασχηματισμένων κυττάρων (*Yang and Liu, 2001*).

**Εικόνα 11:** Σύνοψη των σηματοδοτικών μονοπατιών που μεσολαβούν το EMT. Οι υποδοχείς κινάσων τυροσίνης (RTKs) σε συνδυασμό με τις ιντεγκρίνες, πυροδοτούν το EMT σε διάφορες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Ο TGF- $\beta$  επάγει το EMT in vivo και in vitro μέσω SMAD-dependent και independent μονοπατιών. Νέα στοιχεία εμπλέκουν στο EMT τόσο το Notch όσο και το Wnt signaling ενώ είναι πιθανό να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες όπως ο Endothelin-A-receptor (ET-aR) και οι Matrix metalloproteases (*Thiery and Sleeman, 2006*).

**Εικόνα 12:** Ο TGF- $\beta$  επάγει το EMT στα επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα. Ανάλυση κατά western για την E-καντερίνη και τη βιμεντίνη έπειτα από επώαση με TGF- $\beta$ 1 για 24, 48 και 72 ώρες. Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 13:** Ο TGF- $\beta$  επάγει την αλλαγή σχήματος στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (α) διατηρούν στενή επαφή με τα γειτονικά τους κύτταρα. Έπειτα από 48 ώρες επώαση με TGF- $\beta$  (β) τα κύτταρα χάνουν τη στενή μεταξύ τους διασύνδεση και αποκτούν ατρακτοειδές σχήμα.

**Εικόνα 14:** Ο TGF- $\beta$  επάγει την έκφραση ινωτικών δεικτών στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Στα φυσιολογικά κύτταρα η  $\alpha$ -SMA (α) και η ινωδονεκτίνη ( $\gamma$ ) είναι πρακτικά ανιχνεύσιμες. Έπειτα από 48 ώρες επώαση με TGF- $\beta$  παρατηρείται δραματική αύξηση τόσο της  $\alpha$ SMA (β) όσο και της ινωδονεκτίνης (δ).

**Εικόνα 15:** Ανάλυση κατά western για την ILK έπειτα από επώαση με TGF- $\beta$  για 24, 48 και 72 ώρες. Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 16:** Ο TGF- $\beta$  επάγει την αύξηση της ILK μέσω ενός smad-dependent μηχανισμού. Η αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF- $\beta$  (ζώνες 3,4 από δεξιά) σε σχέση με τα κοντρόλ κύτταρα (ζώνες 1,2 από δεξιά) αναστέλλεται παρουσία του αναστολέα (ζώνες 7,8 από δεξιά). Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 17:** Η επαγωγή της ILK από τον TGF- $\beta$  δεν μεσολαβείται από την erk. Η αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF- $\beta$  (ζώνες 3,4 από δεξιά) σε σχέση με τα κοντρόλ κύτταρα (ζώνες 1,2 από δεξιά) διατηρείται παρουσία του αναστολέα (ζώνες 7,8 από δεξιά) ο οποίος φαίνεται να αυξάνει ως ένα σημείο τα επίπεδα της ILK στα κοντρόλ κύτταρα (ζώνες 5,6). Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 18:** Η επαγωγή της ILK από τον TGF- $\beta$  δεν μεσολαβείται από την Pi3k. Η αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF- $\beta$  (ζώνες 3,4 από δεξιά) σε σχέση με τα κοντρόλ κύτταρα (ζώνες 1,2 από δεξιά) διατηρείται παρουσία του αναστολέα (ζώνες 7,8 από δεξιά). Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 19:** Η αύξηση της ILK από τον TGF- $\beta$  δεν μεσολαβείται από την p38 MAPK αφού η παρουσία του αναστολέα (ζώνη 4 από δεξιά) δεν επηρεάζει την αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF- $\beta$  (ζώνη 2 από δεξιά). Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 20:** Μείωση των επιπέδων της ILK με τη μέθοδο του siRNA. Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς .

**Εικόνα 21:** Ο ρόλος της ILK στο κυψελιδικό EMT. Η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF- $\beta$  (ζώνες 3,4 από αριστερά) σε σχέση με τα κοντρόλ κύτταρα που αποτελούνται από κύτταρα που έχουν επωαστεί με μη ειδικό siRNA (ζώνη 2 από αριστερά) και από μη κατεργασμένα κύτταρα (ζώνη 1 από αριστερά). Η κατεργασία των κυττάρων με siILK οδηγεί σε δραματική μείωση της ILK τόσο παρουσία όσο και απουσία TGF- $\beta$  (ζώνες 5-8). Η μείωση της ILK δεν επηρεάζει τη μείωση της E-καντερίνης από τον TGF- $\beta$  (ζώνες 7,8 από αριστερά). Αντίθετα, η αύξηση της βιμεντίνης σε απόκριση στον TGF- $\beta$  επηρεάζεται από την απουσία της ILK αφού απουσία ILK (ζώνες 7,8) η αύξηση της βιμεντίνης είναι σημαντικά μικρότερη απ' ό τι παρουσία της ILK (ζώνες 3,4). Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της  $\beta$ -ακτίνης.

**Εικόνα 22:** Επίδραση της μείωσης της ILK στο κυτταρικό σχήμα. Τα κοντρόλ κύτταρα (α) διατηρούν στενή επαφή μεταξύ τους. Στα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK (β) τα κύτταρα αρχίζουν και χάνουν τη μεταξύ τους διασύνδεση.

**Εικόνα 23:** Επίδραση της μείωσης της ILK στην κυτταρική εξάπλωση. Τα κοντρόλ κύτταρα (α) αρχίζουν και εξαπλώνονται άμεσα. Αντίθετα, στα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK (β) η εξάπλωση των κυττάρων καθυστερεί σημαντικά. Τα μη εξαπλωμένα κύτταρα διακρίνονται από τα εξαπλωμένα βάσει του σχήματός τους. Τα μη εξαπλωμένα κύτταρα διατηρούν σφαιρικό σχήμα ενώ τα εξαπλωμένα σχήματα αρχίζουν και γίνονται τραπεζοειδή.

**Εικόνα 24:** Επίδραση της μείωσης της ILK στην κυτταρική μετανάστευση. Στα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK, 72 ώρες μετά τη δημιουργία του κενού μεταξύ των κυττάρων, παρατηρείται καθυστέρηση στο κλείσιμο του κενού (δ) σε σχέση με τα κοντρόλ κύτταρα στο ίδιο χρονικό διάστημα (β).

**Εικόνα 25:** Επίδραση της μείωσης της ILK στην κυτταρική επιβίωση. Δεν παρατηρείται διαφορά στον αριθμό των κυττάρων που είναι θετικά στην ανεξίνη 5 μεταξύ των κοντρόλ κυττάρων (β) και των κυττάρων που έχουν επωαστεί με siILK (δ).

**Εικόνα 26:** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στην ενδοτραχειακή χορήγηση TGF-β. Οι 5 πρώτες ζώνες από αριστερά αντιστοιχούν στα κοντρόλ ζώα και οι τρεις τελευταίες στα πειραματικά. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 27:** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στην ενδορινική χορήγηση TGF-β. Οι 5 πρώτες ζώνες από αριστερά αντιστοιχούν στα πειραματικά ζώα και οι τέσσερις τελευταίες στα κοντρόλ. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

**Εικόνα 28:** χρώση του πνευμονικού κολλαγόνου με *micro-sirius red*. Στον κοντρόλ πνεύμονα (α) και στη μέρα δύο (β) παρατηρούμε τη φυσιολογική δομή του πνεύμονα καθώς και τη φυσιολογική κατανομή του κολλαγόνου στον ιστό. Από τη μέρα εννιά (γ) αρχίζει η έντονη εναπόθεση κολλαγόνου αλλά οι δομές του πνεύμονα διατηρούνται ανέπαφες σε ένα βαθμό. Στις μέρες 15 (δ) και 23 (ε) η παραγωγή κολλαγόνου φτάνει στο μέγιστο με τη φυσιολογική αρχιτεκτονική του πνεύμονα να έχει πλήρως καταστραφεί.

**Εικόνα 29:** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς. Τα κοντρόλ ζώα αντιπροσωπεύονται με τον όρο PBS και τα πειραματικά με τη σύντμηση της μπλεομυκίνης, BLEO.

**Εικόνα 30:** Ανοσοϊστοχημεία για την ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Στο φυσιολογικό πνεύμονα (α, β) παρατηρείται έντονη χρώση για την ILK στα κυψελιδικά τοιχώματα (α) και στο βρογχικό επιθήλιο. Κατά την ημέρα 9 (γ, δ) εμφανίζονται οι πρώτες ινωτικές εστίες (γ) ενώ λόγω της τοξικότητας της

μπλεομυκίνης καταστρέφεται μεγάλο μέρος των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (δ). Την ημέρα 15 (ε, στ) ο ιστός χαρακτηρίζεται από την παρουσία εκτεταμένων ινωτικών εστιών με αυξημένη ετερογένεια σε σχέση με την ILK αφού υπάρχουν τόσο ILK αρνητικές (ε) όσο και ILK θετικές περιοχές (στ).

**Εικόνα 31:** Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των κυττάρων τύπου I κατά την ημέρα 9. ILK: πράσινο, α-πρωτεΐνη των κυττάρων τύπου I: κόκκινο, DAPI: μπλε. Κατά την ημέρα 9 παρατηρείται εκτεταμένη καταστροφή των κυττάρων τύπου I στα οποία υπάρχει ILK. Εκτός από τα κύτταρα τύπου I ILK υπάρχει και σε κύτταρα που επιβιώνουν της μπλεομυκίνης και δεν είναι θετικά για τον δείκτη των τύπου I κυττάρων (σημειώνονται με βέλη 2 χαρακτηριστικά παραδείγματα στο μεγεθυμένο ένθετο πάνω αριστερά).

**Εικόνα 32:** Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των κυττάρων τύπου II κατά την ημέρα 9. ILK: πράσινο, επιφανειοδραστικός παράγοντας B (SPB): κόκκινο, DAPI: μπλε. Ο δείκτης των τύπου II κυττάρων και η ILK (χαρακτηριστικά παραδείγματα υποδεικνύονται με βέλη στο μεγεθυμένο ένθετο κάτω αριστερά) συνεντοπίζονται σε κύτταρα αποτέλεσμα που δείχνει ότι τα κύτταρα τύπου II εκφράζουν ILK.

**Εικόνα 33:** Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των μυοϊνοβλαστών κατά την ημέρα 15. ILK: πράσινο, α-SMA: κόκκινο, DAPI: μπλε. Ο δείκτης των μυοϊνοβλαστών και η ILK συνεντοπίζονται σε ορισμένα κύτταρα στις ινωτικές εστίες αποτέλεσμα που δείχνει ότι υπάρχουν μυοϊνοβλάστες που εκφράζουν ILK.

**Εικόνα 34:** Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των μυοϊνοβλαστών κατά την ημέρα 15. ILK: πράσινο, α-SMA: κόκκινο, DAPI: μπλε. Η πλειονότητα των μυοϊνοβλαστών δεν εκφράζουν ILK.

**Εικόνα 35:** Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την ημέρα 15. ILK: πράσινο, δείκτης λευκοκυττάρων (CD45): κόκκινο, DAPI: μπλε. Σημαντικός αριθμός κυττάρων του ανοσοποιητικού εκφράζει την ILK (τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εκφράζουν ILK υποδεικνύονται με βέλος).

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## A. ΙΝΩΣΗ

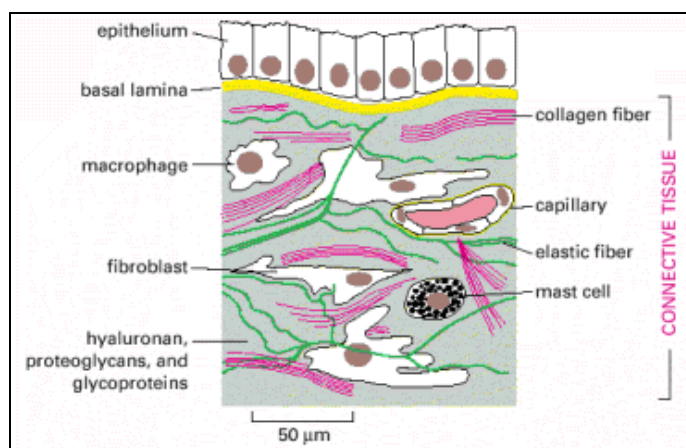
### 1. Ορισμός της ίνωσης

Η ίνωση είναι μια παθολογική διαδικασία για την οποία υπάρχει ένας σχετικά μεγάλος αριθμός ορισμών. Ο πιο επίσημος ίσως ορισμός που έχει δοθεί μέχρι στιγμής, είναι ότι ως ίνωση ορίζεται η αυξημένη εναπόθεση συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος, που οδηγεί στην καταστροφή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ιστού και στην υπονόμευση της λειτουργίας του (*Mutsaers et al., 1997*) λόγω του ότι το φυσιολογικό παρέγχυμα αντικαθίσταται από συνδετικό ιστό που συγκροτείται από τα μόρια του στρώματος και λοιπές δομές καθώς και μόρια που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο.

Το εξωκυττάριο στρώμα (Extracellular Matrix, ECM) είναι ένα περίπλοκο δίκτυο μακρομορίων που καταλαμβάνει μεγάλο μέρος των ιστών γεμίζοντας το χώρο που δεν υπάρχουν κύτταρα, βρισκόμενο πάντα σε στενή επαφή με τις κυτταρικές επιφάνειες. Προσδίδει ισχύ στους στηρικτικούς ιστούς και ταυτόχρονα βοηθά στην επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον του ρυθμίζοντας τη μεταγωγή σημάτων προς και από το κύτταρο. Τα μακρομόρια που αποτελούν το εξωκυττάριο στρώμα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις ινώδεις πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν το κολλαγόνο, την ελαστίνη, τη λαμινίνη και την ινωδονεκτίνη (fibronectin) καθώς και τις πρωτεογλυκάνες που είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με αρνητικά φορτισμένους πολυσακχαρίτες, τις γλυκοζαμινογλυκάνες (glycoaminoglycans, GAGs). Το κολλαγόνο θεωρείται η σημαντικότερη από αυτές τις πρωτεΐνες καθώς βρίσκεται σε όλα τα ζώα ενώ στα θηλαστικά αντιπροσωπεύει το 25% της συνολικής μάζας των πρωτεϊνών τους. Λόγω της αφθονίας και της σημαντικότητας του κολλαγόνου, σε πολλές περιπτώσεις οι όροι παραγωγή κολλαγόνου και παραγωγή του συνόλου των μορίων του εξωκυττάριου στρώματος θεωρούνται ταυτόσημοι κάτι που ισχύει και για την παρούσα εργασία.

Τα μόρια του εξωκυττάριου στρώματος παράγονται σε τοπικό επίπεδο, κατά κύριο λόγο από κύτταρα μέσα στο στρώμα, που ονομάζονται ινοβλάστες (*Alberts et al., 2002*). Η παραγωγή αυτή είναι συνεχής γιατί ταυτόχρονα τα μακρομόρια του εξωκυττάριου στρώματος αποικοδομούνται από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται Matrix Metalloproteinases (MMPs) και από κολλαγενάσες. Υπό φυσιολογικές

συνθήκες, τόσο η σύνθεση όσο και η αποικοδόμηση είναι διαδικασίες που γίνονται με πολύ αργούς ρυθμούς. Προφανώς, οι ινοβλάστες είναι κεντρικά μόρια στην ινωτική διαδικασία και η προέλευση καθώς και οι μηχανισμοί ενεργοποίησής τους αποτελούν πρωτεύοντα ζητούμενα στην έρευνα σχετικά με την ίνωση.



**Εικόνα 4: Επιθήλιο και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός. Διακρίνονται ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα μακρομόρια του εξωκυττάριου στρώματος (Alberts et al., 2002).**

## 2. Ίνωση και διαδικασία επούλωσης τραυμάτων

Για να κατανοήσει κανείς το πότε, γιατί και μέσω ποιων μηχανισμών πυροδοτείται η ινωτική διαδικασία, θα πρέπει να ανατρέξει στη διαδικασία επούλωσης τραύματος αφού η ίνωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια διαδικασία επούλωσης τραύματος που έχει ξεφύγει από τον έλεγχο του οργανισμού. Η καταστροφή τμήματος του ιστού, οφειλόμενη σε οποιοδήποτε χρόνιο ή οξύ παθογόνο ερέθισμα, συμπεριλαμβανομένων μολύνσεων, αυτοάνοσων αντιδράσεων και μηχανικών τραυμάτων, πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης του τραύματος που είναι μια θεμελιώδης βιολογική διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού.

Η διαδικασία χωρίζεται σε τρία στάδια: 1) **φλεγμονή και αιμόσταση**, 2) **φάση πολλαπλασιασμού**, 3) **αναγέννηση** (Wynn, 2007). Η αρχική απόκριση προέρχεται από τα κατεστραμμένα επιθηλιακά ή/και ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία απελευθερώνουν μόρια (κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες) που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα και το σχηματισμό θρόμβου. Η ενεργοποίηση της θρομβοποίησης οδηγεί, μεταξύ άλλων, στη δημιουργία μιας λεπτής αθηρωματικής πλάκας που μαζί με την ινωδονεκτίνη σχηματίζουν μια προσωρινή επιφάνεια που λειτουργεί ως βάση πάνω στην οποία προσελκύονται κύτταρα του ανοσοποιητικού

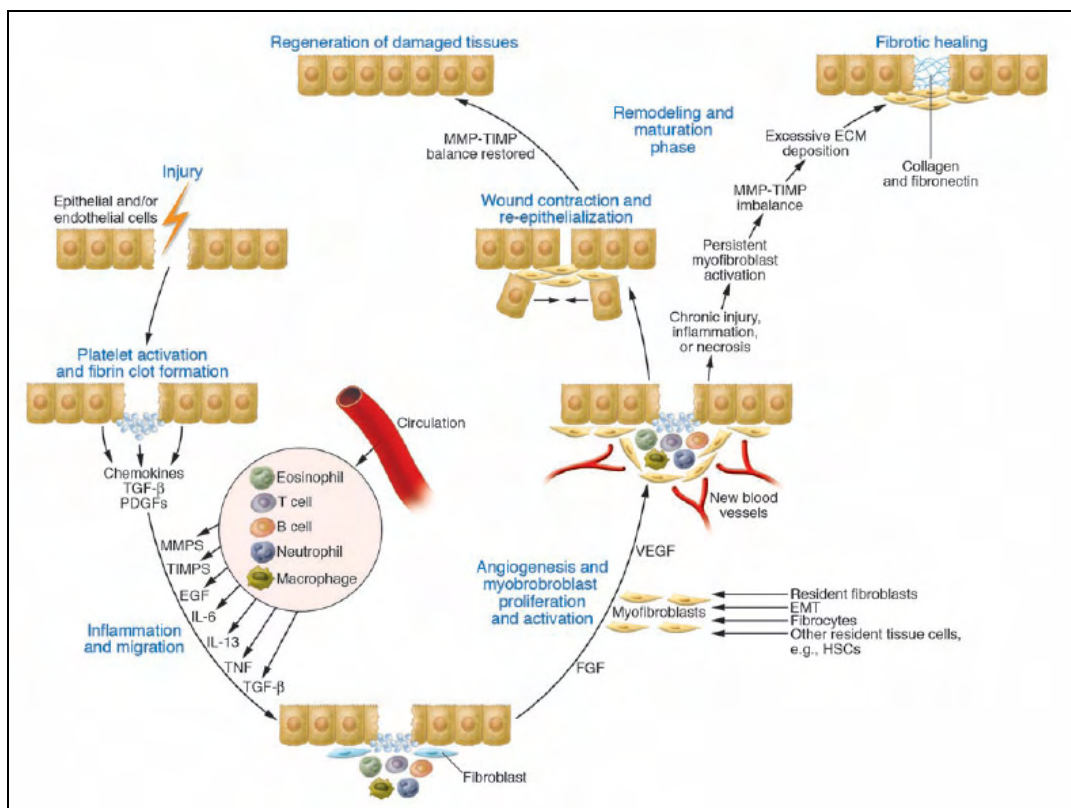


συστήματος που φθάνουν στο σημείο του τραύματος μέσω της κυκλοφορίας (φάση φλεγμονής). Στα αρχικά στάδια της φάσης της φλεγμονής ο κυρίαρχος κυτταρικός πληθυσμός είναι τα ουδετερόφιλα αλλά στη συνέχεια δίνουν τη θέση στους στα μακροφάγα. Μεταξύ των άλλων λειτουργιών τους, που περιλαμβάνουν την καταστροφή βακτηρίων, την απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων κλπ, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού εκκρίνουν με τη σειρά τους κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ιντερλευκίνες, κλπ). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης και τη συνεχή παρουσία αυτών των μορίων που αποτελούν βασικούς μεσολαβητές τόσο της φυσιολογικής, όσο και της ινωτικής διαδικασίας.

Ένα από τα αποτελέσματα της δράσης του TGF-beta, του PDGF αλλά και της ιντερλευκίνης 1 είναι η προσέλκυση ινοβλαστών στο σημείο του τραύματος και ο πολλαπλασιασμός τους. Συνήθως, η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από τη μετατροπή των ινοβλαστών σε ένα άλλο, αλλά αρκετά συγγενές κυτταρικό είδος, τους **μυοϊνοβλάστες**. Για την προέλευση και τη φύση των κυττάρων αυτών θα γίνει λόγος στη συνέχεια. Οι ινοβλάστες ή/και οι μυοϊνοβλάστες παράγουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου, με σκοπό την προσωρινή επούλωση του τραύματος (φάση πολλαπλασιασμού).

Το τελικό στάδιο της φυσιολογικής διαδικασίας περιλαμβάνει την αναγέννηση του ιστού, δηλαδή την αντικατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων από νέα που θα προκύψουν από τον πολλαπλασιασμό γειτονικών, φυσιολογικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από την αποικοδόμηση της περίσσειας των μορίων του στρώματος από MMPs και κολλαγενάσες και τη μείωση του αριθμού των ινοβλαστών με απόπτωση ώστε να επανέλθει η δυναμική ισορροπία μεταξύ παραγωγής και αποικοδόμησης του εξωκυττάρου στρώματος. Είναι προφανές ότι ο μηχανισμός επούλωσης τραυμάτων είναι ένας εξαιρετικά πολύπλοκος μηχανισμός, με τη συμμετοχή πολλών μορίων που προϋποθέτει την αυστηρή ρύθμιση της ενεργοποίησης και της απενεργοποίησης διάφορων κυτταρικών πληθυσμών με προεξέχοντα αυτόν των ινοβλαστών.

Στην περίπτωση της ίνωσης, που κατά κανόνα είναι αποτέλεσμα χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο παράγοντα, ο αυστηρά ελεγχόμενος μηχανισμός επούλωσης τραύματος ουσιαστικά χαλαρώνει αφού η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε επαναλαμβανόμενους κύκλους της διαδικασίας επούλωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, σε κάθε κύκλο, να συσσωρεύονται ποσότητες κολλαγόνου που δεν μπορούν να αποικοδομηθούν. Η τελική κατάληξη είναι μια παθολογική κατάσταση όπου οι μυοϊνοβλάστες είναι συνεχώς ενεργοί παράγοντας κολλαγόνο με αποτέλεσμα την καταστροφή, αρχικά της δομής και τελικά της λειτουργικότητας του ιστού λόγω της αντικατάστασης του παρεγχύματος από συνδετικό ιστό.



**Εικόνα 5: Φυσιολογική επούλωση τραύματος και ινωτική διαδικασία. Η έκθεση σε παθογόνο ερέθισμα πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης που αποτελείται από τρεις φάσεις: φλεγμονή, φάση πολλαπλασιασμού και αναγέννηση του ιστού. Σε περίπτωση χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο παράγοντα ενεργοποιείται η ινωτική διαδικασία (Wynn, 2007).**

### 3. Κοινοί και εξειδικευμένοι μηχανισμοί ίνωσης

Ίνωση μπορεί να εκδηλωθεί σε όλους τους ιστούς είτε επηρεάζοντας ένα συγκεκριμένο όργανο όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ κλπ, είτε έχοντας μια ευρύτερη κατανομή όπως στην αθηροσκλήρωση και στις ασθένειες του συνδετικού ιστού, είτε ως δευτερεύον σύμπτωμα όπως στο άσθμα (Mutsaers et al., 1997).

**Πίνακας 5: Κυριότεροι ιστοί που προσβάλλονται από ίνωση και πιθανά αίτια (Wynn, 2008).**

<b>Ιστός</b>	<b>Πιθανά αίτια</b>
Ήπαρ	Ηπατίτιδα (ιικής προέλευσης), αλκοολισμός, σχιστοσωμίαση
Πνεύμονας	Νόσοι διάμεσου πνευμονικού χώρου (Interstitial lung diseases, ILDs)
Νεφρό	Διαβήτης, υπέρταση
Πάγκρεας	Πιθανώς αυτοάνοσες ή/και κληρονομικές ασθένειες
Έντερο	Σύνδρομο Chron, παθογόνοι μικροοργανισμοί
Εγκέφαλος	AIDS, Alzheimer's
Καρδιά/Αγγεία	Έμφραγμα, υπέρταση, αθηροσκλήρωση

Παρόλο που ίνωση εκδηλώνεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς υπάρχουν ορισμένα ινωτικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά (Mutsaers et al., 1997):

I. Η ίνωση είναι αποτέλεσμα χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο ερέθισμα και εκδηλώνεται σε βάθος χρόνου

II. Χαρακτηρίζεται από αυξημένη σύνθεση και εναπόθεση συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος

III. Χαρακτηρίζεται από μειωμένη αποικοδόμηση των συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος λόγω μείωσης της έκφρασης των MMPs και αύξησης της έκφρασης των αναστολέων των MMPs, των Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs)

IV. Η ίνωση και η διαδικασία επούλωσης τραύματος έχουν κοινούς βασικούς μεσολαβητές όπως οTGF-β και ο Platelet-Derived Growth factor (PDGF).

Αντίθετα, λόγω της πολυπλοκότητας του φαινομένου και του πλήθους των ιστών όπου εκδηλώνεται, είναι αναπόφευκτο να υπάρχουν χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν ιστοεξειδίκευση. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι αρκετά προφανή, όπως τα αρχικά ερεθίσματα, ο χρόνος που χρειάζεται για να εκδηλωθεί το

φαινόμενο σε κάποιον ιστό αλλά ιστοεξειδίκευση παρουσιάζουν και διάφοροι μηχανισμοί, που σε άλλους ιστούς είναι αρκετά σημαντικοί για την παθογένεση της ίνωσης ενώ σε άλλους όχι, π.χ. το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης είναι πολύ σημαντικό για την ίνωση του νεφρού ή της καρδιάς αλλά όχι για του δέρματος. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που πλέον είναι καινά αποδεκτό ότι παρουσιάζουν ιστοεξειδίκευση είναι οι πηγές προέλευσης των ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών στον εκάστοτε ινωτικό ιστό.

#### **4. Η προέλευση των μυοϊνοβλαστών**

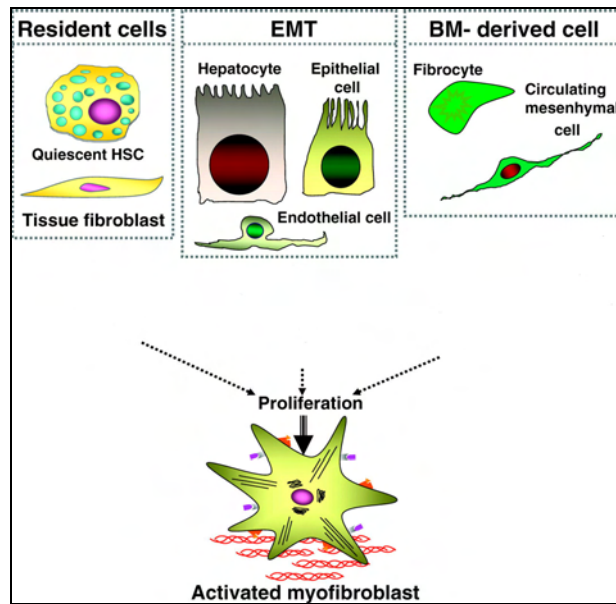
Όπως προαναφέρθηκε, οι μυοϊνοβλάστες θεωρούνται ένα από τα κύτταρα κλειδιά στη διαδικασία της ίνωσης. Ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '70 ως τα κύτταρα που βοηθούν στη συστολή του ιστού ώστε να κλείσει μια πληγή γεγονός που τα καθιστούσε τα βασικά κυτταρικά στοιχεία στη διαδικασία επούλωσης τραυμάτων (*Gabbiani et al., 1971, Gabbiani et al., 1972*). Πλέον, αν και οι μυοϊνοβλάστες έχουν πλήρως χαρακτηριστεί, τόσο σε μορφολογικό όσο και σε βιοχημικό επίπεδο, ένας πλήρης ορισμός, κοινά αποδεκτός, εξακολουθεί να μην υπάρχει. Θεωρείται ένας κυτταρικός τύπος που έχει μερικά κοινά χαρακτηριστικά τόσο με τους ινοβλάστες όσο και με τα λεία μυϊκά κύτταρα με τη διάκριση μεταξύ των τριών ειδών να βασίζεται σε δομικά χαρακτηριστικά (*Schurch et al., 1998*).

Σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ίνωση, οι μυοϊνοβλάστες είναι τα κύτταρα που παράγουν τα συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος. Αυτή η αντικατάσταση των ινοβλαστών από τους μυοϊνοβλάστες συμβαίνει επειδή, όπως έχει ήδη ειπωθεί, ο ρυθμός με τον οποίο οι ινοβλάστες παράγουν κολλαγόνο είναι πάρα πολύ αργός και δεν θα μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες μιας διαδικασίας όπως η επούλωση τραύματος (*Darby and Hewitson, 2007*). Ο μηχανισμός μετατροπής των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί αλλά είναι πιθανό ότι βασικοί μεσολαβητές της διαδικασίας είναι ο TGF- $\beta$ , ο PDGF αλλά και μέλη του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (*Petrov et al., 2000* και *Jester et al., 2002*).

Εξαιτίας του κεντρικού ρόλου των μυοϊνοβλαστών στην παθογένεση της ίνωσης, πολλές προσπάθειες εύρεσης μιας μορφής θεραπείας για την ίνωση έχουν στραφεί

στους μηχανισμούς ενεργοποίησης και τις πηγές προέλευσής τους. Σε μια προσπάθεια καταγραφής και κατηγοριοποίησης των πηγών, προτάθηκε ότι οι μυοϊνοβλάστες προέρχονται από τρεις βασικές πηγές: από κύτταρα που προέρχονται από τον **μυελό των οστών**, από τους ήδη υπάρχοντες **τοπικούς ινοβλάστες** και από επιθηλιακά κύτταρα μέσω της διαδικασίας της **Επιθηλιακής προς Μεσεγχυματικής Μετάβασης** (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), (*Kisseleva and Brenner, 2008*). Εν τούτοις, όλο και περισσότεροι κυτταρικοί πληθυσμοί φαίνεται πως μπορούν, υπό ορισμένες συνθήκες, να ενεργοποιηθούν και να μετατραπούν σε κύτταρα που παράγουν κολλαγόνο. Ορισμένοι από αυτούς τους πληθυσμούς είναι τα λιποαποταμιευτικά κύτταρα (Hepatic stellate cells, HSCs) του ήπατος (*Friedman, 2000*), τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της Ενδοθηλιακής προς Μεσεγχυματικής Μετάβασης (Endothelial to Mesenchymal Transition, EnMT), (*Zeisberg et al., 2007*), τα τύπου II κύτταρα των κυψελίδων (Type II pneumocytes), (*Simon et al., 1993*) και τα περικύτταρα (pericytes), (*Lin et al., 2008*).

Είναι προφανές ότι ένας σχετικά μεγάλος αριθμός κυτταρικών πληθυσμών επιδεικνύει αυξημένη πλαστικότητα με αποτέλεσμα υπό ορισμένες συνθήκες και με την κατάλληλη σηματοδότηση τα κύτταρα αυτά να μπορούν να μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά κύτταρα με δυνατότητες παραγωγής κολλαγόνου. Ανάλογα με τον ιστό, οι διάφορες πιθανές πηγές ινοβλαστών συνεισφέρουν σε διαφορετικό βαθμό στην παραγωγή ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών κάτι που σημαίνει πως μια θεραπευτική αγωγή που θα στοχεύει την παραγωγή των μυοϊνοβλαστών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη το ποιες είναι οι βασικές πηγές προέλευσης των ινοβλαστών σε κάθε ιστό.



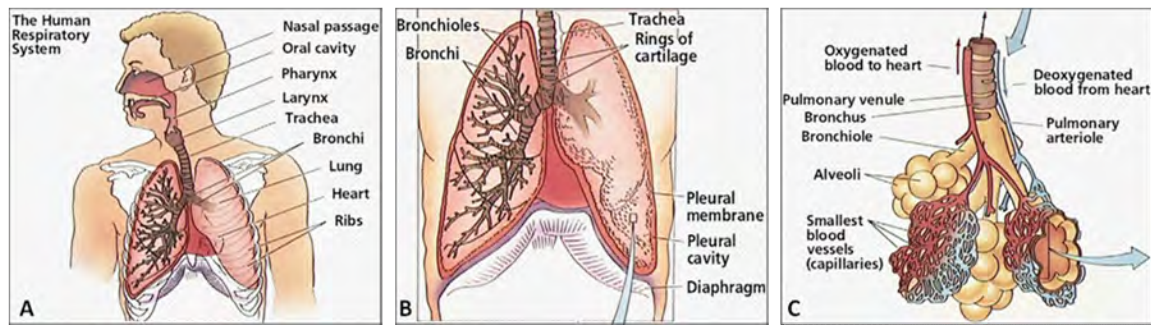
Εικόνα 6: Ορισμένες από τις πιθανές πηγές μυοϊνοβλαστών. Διακρίνονται οι τοπικοί ινοβλάστες, τα Hepatic stellate cells, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα με προέλευση από το μυελό των οστών (*Kisseleva and Brenner, 2008*).

## **B. ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ**

### **1. Δομή και λειτουργία**

Το αναπνευστικό σύστημα περιλαμβάνει τους πνεύμονες και ένα σύστημα σωλήνων που συνδέουν τις περιοχές ανταλλαγής αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον. Συνήθως, διαιρείται σε δύο κατηγορίες: τη **μεταφορική μοίρα** και την **αναπνευστική μοίρα**. Η μεταφορική μοίρα αποτελείται από τη ρινική κοιλότητα, το ρινοφάρυγγα, το λάρυγγα, την τραχεία, τους βρόγχους, τα βρογχιόλια και τα τελικά βρογχιόλια και εξυπηρετεί δύο κύριες λειτουργίες: 1) παρέχει τη δίοδο μέσω της οποίας ο αέρας κυκλοφορεί προς και από τους πνεύμονες, 2) εξασφαλίζει τον κλιματισμό του αναπνεόμενου αέρα. Το μεγαλύτερο μέρος της μεταφορικής μοίρας καλύπτεται από ψευδοπολύστοιβο κυλινδρικό κροσσωτό επιθήλιο (από τη ρινική κοιλότητα ως τους βρόγχους). Βαθύτερα στο βρογχικό δέντρο της μεταφορικής μοίρας το επιθήλιο τροποποιείται σε μονόστοιβο κυλινδρικό.

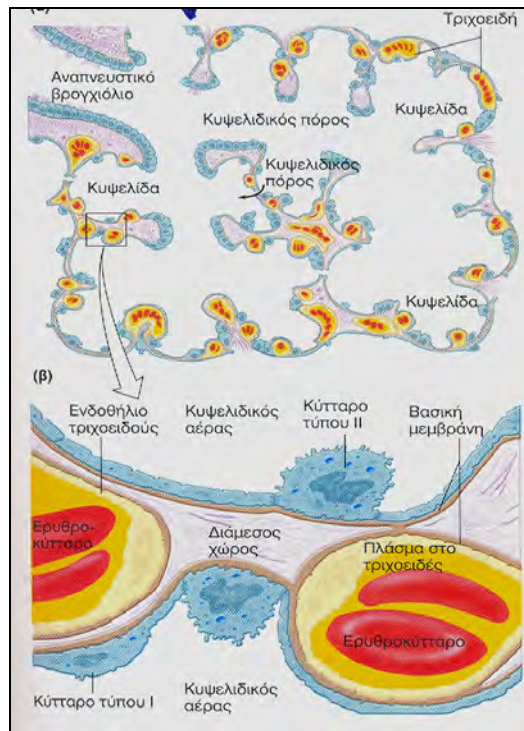
Στην αναπνευστική μοίρα (βλέπε εικ. 5) γίνεται η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα του αίματος. Αποτελείται από τα αναπνευστικά βρογχιόλια, τους κυψελιδικούς πόρους και τις κυψελίδες. Οι κυψελίδες αποτελούν την κατάληξη του βρογχικού δέντρου και είναι οι δομές όπου επιτελείται η ανταλλαγή αερίων. Ο ατμοσφαιρικός αέρας στις κυψελίδες χωρίζεται από το αίμα στα τριχοειδή αγγεία των κυψελιδικών τοιχωμάτων από τον λεγόμενο **φραγμό αίματος-αέρα**. Ο φραγμός αίματος-αέρα αποτελείται από το κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων των κυψελιδικών τοιχωμάτων και τις βασικές τους μεμβράνες, από το κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών και τις βασικές τους μεμβράνες και από έναν λεπτό χώρο που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, τριχοειδή και υγρό που ονομάζεται διάμεσος πνευμονικός χώρος (pulmonary interstitium), (*Juncueira et al., 1989*).



**Εικόνα 4: Η δομή του αναπνευστικού συστήματος. Α) Ρινική και στοματική κοιλότητα, φάρυγγας, λάρυγγας, τραχεία, βρόγχοι, πνεύμονες, καρδιά, πλευρά. Β) βρογχικό δέντρο, διάφραγμα, πλευρική κοιλότητα και μεμβράνη. Γ) Βρογχιόλια και κυψελίδες.**

Τα κυψελιδικά τοιχώματα καλύπτονται εξωτερικά από δύο ειδών επιθηλιακά κύτταρα. Τα **κύτταρα τύπου I** και τα **κύτταρα τύπου II** ή μεγάλα κυψελιδικά ή διαφραγματικά κύτταρα. Τα κύτταρα τύπου I είναι εξαιρετικά λεπτά και καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της κυψελιδικής επιφάνειας (πάνω από το 90%). Επειδή ο βασικός τους ρόλος είναι να παρέχουν έναν φραγμό με ελάχιστο πάχος, εκτός του ότι είναι εξαιρετικά λεπτά, τα κυτταροπλασματικά τους οργανίδια συγκεντρώνονται γύρω από τον πυρήνα αφήνοντας μεγάλη επιφάνεια του κυτταροπλάσματος ελεύθερη. Θεωρούνται πλήρως διαφοροποιημένα, έχουν μικρές δυνατότητες πολλαπλασιασμού και αυτοεπιδιόρθωσης ενώ υπόκεινται εύκολα σε τραυματισμούς και καταστροφές. Τα κύτταρα τύπου II, παρόλο που καλύπτουν πολύ μικρό μέρος της κυψελιδικής επιφάνειας, αποτελούν τον πολυπληθέστερο επιθηλιακό τύπο στα κυψελιδικά τοιχώματα αλλά και γενικότερα στον πνεύμονα. Βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ των κυττάρων τύπου I στα σημεία όπου τα κυψελιδικά τοιχώματα ενώνονται και σχηματίζουν γωνίες. Σε αντίθεση με τα τύπου I, τα κύτταρα τύπου II μπορούν και πολλαπλασιάζονται ώστε να καλύπτουν απογυμνωμένες από κύτταρα περιοχές - αποτέλεσμα κάποιου τραυματισμού – με νέα κύτταρα. Επίσης, μπορούν να συνθέσουν διάφορα συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος όπως ινωδονεκτίνη, κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες (Crouch, 1990). Ο πιο σημαντικός τους ρόλος υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι η παραγωγή και η έκκριση μιας ουσίας που ονομάζεται **επιφανειοδραστικός παράγοντας του πνεύμονα** που απλώνεται πάνω στις κυψελιδικές επιφάνειες ελαττώνοντας την επιφανειακή κυψελιδική τάση.





**Εικόνα 5:** Η αναπνευστική μοίρα. Διακρίνονται τα αναπνευστικά βρογχόλια, οι κυψελιδικοί πόροι και οι κυψελίδες. Κάτω, σε μεγέθυνση, το κυψελιδικό τοίχωμα και οι δομές που αποτελούν το φραγμό αίματος-αέρα.

## 2. Πνευμονική ίνωση

Η πνευμονική ίνωση δεν θεωρείται ασθένεια αλλά ένα σύνολο ετερογενών χαρακτηριστικών που αποτελούν καθυστερημένα συμπτώματα μιας μεγάλης οικογένειας ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου, των **Interstitial Lung Diseases, ILDs** (Green, 2002).

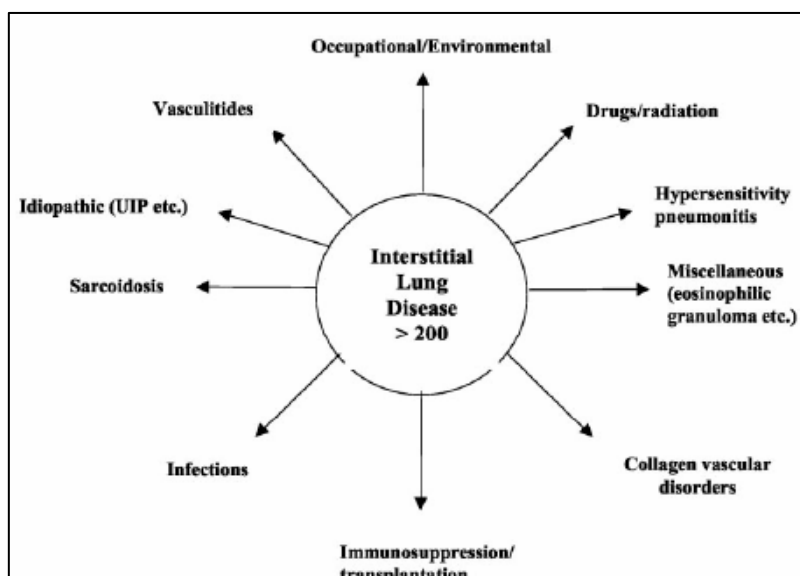
**Πίνακας 6:** Κλινικά και παθολογικά (μοριακά-κυτταρικά) χαρακτηριστικά των ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου (Green, 2002).

Χαρακτηριστικά	Κλινικά	Παθολογικά
	Προοδευτική δύσπνοια	Ίνωση του διάμεσου χώρου με αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου, ελαστίνης
	Μη παραγωγικός βήχας	Αλλοίωση αρχιτεκτονικής του διάμεσου χώρου

	Μη φυσιολογικός ήχος πνεύμονα κατά την ακρόαση	Χρόνια φλεγμονή του διάμεσου χώρου
	Μη φυσιολογικά ευρήματα σε ακτινογραφία θώρακος	Υπερπλασία των τύπου II κυττάρων
	Μειωμένη πνευμονική χωρητικότητα, αυξημένη κυψελιδική-αρτηριακή διαφορά πίεσης	Υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων

Εξετάζοντας τα παθολογικά χαρακτηριστικά της πνευμονικής ίνωσης, όπως αυτά περιγράφονται στον πίνακα 2, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι αυτό που συμβαίνει στην πνευμονική ίνωση στο επίπεδο των κυψελίδων είναι ότι η υπερπαραγωγή μακρομορίων του εξωκυττάριου στρώματος και η εναπόθεσή τους στον ενδιάμεσο χώρο οδηγεί στην πάχυνση και τη σκλήρυνση του χώρου αυτού. Με τη σειρά του, ο φραγμός αίματος-αέρα γίνεται πιο παχύς δυσχεραίνοντας την ανταλλαγή αερίων κάτι που οδηγεί στην προοδευτική μείωση και τελικά στην απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας.

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από διακόσιες ILDs οι οποίες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στις **ILDs με γνωστό αίτιο** και στις **ιδιοπαθείς ILDs**, δηλαδή ασθένειες με άγνωστο αίτιο, που ονομάζονται εναλλακτικά Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs). Τα αίτια των ILDs περιλαμβάνουν διάφορους παράγοντες όπως περιβαλλοντικοί, φάρμακα και ακτινοβολίες. Γενετικοί παράγοντες, αγγειακές παθήσεις και διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου έχουν επίσης εμπλακεί στην παθογένεση των ILDs τα τελευταία χρόνια.



Εικόνα 6: Η οικογένεια των ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου αριθμεί πάνω από 200 μέλη. Έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα διάφορα αίτια όπως η σαρκοειδωση, λοιμώξεις του αναπνευστικού, η ανοσοκαταστολή, διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου, φάρμακα και ακτινοβολία, περιβαλλοντικοί παράγοντες, αγγειακές νόσοι. Ένα μεγάλο ποσοστό των ILDs έχει άγνωστα αίτια. Οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθείς (Green, 2002).

Οι περιπτώσεις ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (**Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF**) αντιστοιχούν στο 46,2% των συνολικών διαγνώσεων σε άνδρες και γυναίκες ενώ επιδημιολογικά στοιχεία από τις Ηνωμένες Πολιτείες κάνουν λόγο για 80,9 περιστατικά ανά 100.000 άτομα στους άντρες και 62,2 στις γυναίκες (Coultas *et al.*, 1994). Ο μέσος όρος ζωής των ατόμων στα οποία γίνεται διάγνωση για IPF είναι 2,8-4,2 χρόνια ενώ δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία. Τα στοιχεία αυτά υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα της εύρεσης νέων στρατηγικών προσέγγισης της πνευμονικής ίνωσης καθώς την ανακάλυψη μορίων που θα μπορέσουν να λειτουργήσουν ως φαρμακευτικοί στόχοι (Maher *et al.*, 2007).

### 3. Παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης

Όπως και στους υπόλοιπους ιστούς, η ίνωση στον πνεύμονα θεωρείται μια διαδικασία επούλωσης τραύματος που έχει ξεφύγει από τον έλεγχο του οργανισμού. Αυτό σημαίνει ότι ενώ σε περιπτώσεις περιορισμένου τραυματισμού, ο οργανισμός μπορεί να ανταπεξέλθει και να αποκαταστήσει τη φυσιολογική δομή των κυψελιδικών τοιχωμάτων κυρίως μέσω του πολλαπλασιασμού των κυττάρων τύπου II που στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα τύπου I, σε περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης στο παθογόνο ερέθισμα, η συνεχής καταστροφή του κυψελιδικού επιθηλίου ή/και του αγγειακού ενδοθηλίου οδηγεί στην απορρύθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης με τελικό αποτέλεσμα την ίνωση και την καταστροφή της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του ιστού.

Οι κύριοι μεσολαβητές της πνευμονικής ίνωσης είναι μια σειρά αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών με προεξέχοντες τον TGF- $\beta$ , την ιντερλευκίνη 1 $\beta$  και τον Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Ο TGF- $\beta$  μπορεί να επάγει μια σειρά από προϊνωτικές διαδικασίες όπως η προσέλκυση και ο πολλαπλασιασμός ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών, η αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου και των υπολοίπων συστατικών του στρώματος, η επαγωγή των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών και η μείωση της αποικοδόμησης του κολλαγόνου. Οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες ενεργοποιούνται μέσω ενός SMAD3 ελεγχόμενου μηχανισμού. Ο TNF $\alpha$  συνδέεται κυρίως με τη φλεγμονή που συνήθως προηγείται της ίνωσης αλλά από μόνος του δεν μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα ή σε εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου. Αντίθετα, υπερέκφραση της ιντερλευκίνης 1 $\beta$  προκαλεί εκτεταμένη καταστροφή των κυψελίδων, έντονη φλεγμονή ενώ προσελκύει μυοϊνοβλάστες οδηγώντας σε μεγάλη αύξηση παραγωγής κολλαγόνου (Gauldie *et al.*, 2007). Σε κάθε περίπτωση, το τελικό αποτέλεσμα της έκθεσης στους παράγοντες αυτούς είναι ο υπερπολλαπλασιασμός των κυττάρων τύπου II, η προσέλκυση ινοβλαστών και ο σχηματισμός ινωτικών εστιών. Η σταδιακή αύξηση των ινωτικών εστιών οδηγεί στην επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας (King *et al.*, 2001).

Εκτός από τους βασικούς μεσολαβητές που προαναφέραμε, στους οποίους μπορούν να συμπεριληφθούν και ο PDGF και το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Kuba *et al.*, 2006) υπάρχουν διάφορα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει και θεωρούνται εξίσου σημαντικά στην παθογένεση της πνευμονικής

ίνωσης. Τα βασικότερα θεωρούνται αυτά της **απόπτωσης**, του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (**Endoplasmic Reticulum, ER stress**) καθώς και αναπτυξιακά μονοπάτια όπως αυτό του **Wnt** και του **Notch** (*Corvol et al., 2009*).

**Απόπτωση:** Η απόπτωση θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες της παθογένεσης της πνευμονικής ίνωσης. Τόσο το εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι των Bcl-2 πρωτεϊνών, που πυροδοτείται από ενδοκυττάρια στρεσογόνα ερεθίσματα όπως η καταστροφή του DNA, όσο και το εξωτερικό μονοπάτι του Tumor necrosis factor υποδοχέα (TNF-receptor) ενεργοποιούνται κατά την ίνωση (*Drakopanagiotakis et al., 2008*). Το αν η απόπτωση έχει προ ή αντι-ινωτικό ρόλο εξαρτάται από το είδος των κυττάρων που επηρεάζει. Για παράδειγμα, η αυξημένη απόπτωση επιθηλιακών κυψελιδικών κυττάρων που παρατηρείται κατά τα αρχικά στάδια της ίνωσης επιδεινώνει την κατάσταση του πνεύμονα ενώ η μειωμένη απόπτωση των μυοϊνοβλαστών σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία ινωτικών εστιών. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η απόπτωση θεωρείται ο μηχανισμός που πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης τραυμάτων αφού το αρχικό συμβάν είναι η καταστροφή επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων (*Scotton and Chambers, 2007*).

**ER stress:** Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα ενδοκυτταρικό οργανίδιο όπου επιτελούνται σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών, η αναδίπλωση και τελική τροποποίησή τους καθώς και η αποθήκευση και ο έλεγχος της ομοιόστασης του ασβεστίου. Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ένα φαινόμενο που εκδηλώνεται όταν κάποια από τις λειτουργίες του οργανιδίου διαταράσσεται π.χ. όταν στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου συσσωρεύονται μη αναδιπλωμένες (unfolded) ή μη σωστά αναδιπλωμένες (misfolded) πρωτεΐνες. Η διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική λειτουργία και την ομοιόσταση του κυττάρου (*Shroder, 2008*). Τα τελευταία δύο χρόνια, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι το ER stress συμβάλλει στην πνευμονική ίνωση. Τα μέχρι τώρα στοιχεία δείχνουν αυξημένη έκφραση των δεικτών ER stress σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση και εντοπισμό των δεικτών αυτών στα κύτταρα τύπου II. Έχει προταθεί ότι μία έντονη αντίδραση ER stress στα κύτταρα τύπου II θα μπορούσε να είναι τα αίτια της απόπτωσης των κυττάρων αυτών και επομένως της πυροδότησης της ινωτικής διαδικασίας (*Korfei et al., 2008*).

Αναπτυξιακά μονοπάτια: Γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του πνεύμονα και διάφορα εμβρυονικά μονοπάτια έχουν συνδεθεί τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη των ILDs. Σε πνεύμονες ασθενών που έχουν διαγνωστεί με IPF, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με το Wnt, το Notch και το Sonic Hedgehog μονοπάτι. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών μπορεί να συνδεθεί είτε με το EMT είτε με την προσπάθεια αναγέννησης των κατεστραμμένων κυτταρικών πληθυσμών γεγονός που θα δικαιολογούσε την επαναλειτουργία αναπτυξιακών μονοπατιών (*Selman et al., 2008*).

#### **4. Πηγές μυοϊνοβλαστών στην πνευμονική ίνωση**

Όπως και στους υπόλοιπους ινωτικούς ιστούς, ο μυοϊνοβλάστης είναι το κύτταρο κλειδί στη διαδικασία της ιωγένεσης αφού οι μυοϊνοβλάστες είναι αυτοί που παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του κολλαγόνου και των υπόλοιπων μορίων του εξωκυττάριου στρώματος. Αρχικά, ως πηγή προέλευσης των μυοϊνοβλαστών θεωρήθηκαν οι πνευμονικοί ινοβλάστες που εντοπίζονται στους βρόγχους, τα αγγεία και στον διάμεσο πνευμονικό χώρο. Πλέον, γνωρίζουμε ότι οι προϋπάρχοντες πνευμονικοί ινοβλάστες δεν αποτελούν τη μοναδική πηγή μυοϊνοβλαστών -και επομένως κολλαγόνου- αλλά υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να μετατραπούν σε κολλαγονοπαραγωγά κύτταρα. Το ποιο ακριβώς είναι αυτοί οι πληθυσμοί και σε τι ποσοστό συνεισφέρει ο καθένας στη συνολική αύξηση του αριθμού των ινοβλαστών είναι κάτι που μέχρι στιγμής δεν έχει αποσαφηνισθεί αλλά οι τρεις πιθανότερες πηγές θεωρούνται οι προϋπάρχοντες ινοβλάστες, τα επιθηλιακά κύτταρα μέσω του EMT και κύτταρα με προέλευση από τον μυελό των οστών χωρίς πάντως να μπορεί αποκλειστεί η συνεισφορά και από άλλες κυτταρικές πηγές.

Τα τελευταία χρόνια έχει δημοσιευτεί μεγάλος αριθμός εργασιών που πραγματεύεται το αν και πόσο καθεμία από τις τρεις παραπάνω πηγές μυοϊνοβλαστών συνεισφέρει στην παραγωγή κολλαγόνου στην πνευμονική ίνωση. Τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών έρχονται συχνά σε αντίθεση μεταξύ τους. Παραδείγματος χάριν, το 2006 προτάθηκε ότι τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, μέσω του EMT, συμβάλλουν στην αύξηση του αριθμού των μυοϊνοβλαστών αφού παρατηρήθηκε έκφραση

μεσεγχυματικών δεικτών σε επιθηλιακά κύτταρα *in vivo* (Kim *et al.*, 2006). Τον επόμενο χρόνο, μια νέα εργασία πάνω στην προέλευση των μυοϊνοβλαστών στην πνευμονική ίνωση υποστήριξε ότι συμβαίνει EMT στον ινωτικό πνεύμονα αλλά σε πολύ μικρό βαθμό, συνεισφέροντας ελάχιστα στη συνολική παραγωγή κολλαγόνου (Wu *et al.*, 2007). Άλλες εργασίες υποστηρίζουν ότι το EMT δεν συμβάλλει καθόλου στην παραγωγή ινοβλαστών στην πνευμονική ίνωση (Yamada *et al.*, 2008). Αντίστοιχα αντικρουόμενα δεδομένα υπάρχουν και για τους μυοϊνοβλάστες που προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών. Σύμφωνα με ορισμένες εργασίες, τα κύτταρα αυτά, κατά την εκδήλωση της ίνωσης, μπορούν μέσω της κυκλοφορίας να καταλήξουν στον πνεύμονα και να διαφοροποιηθούν σε διάφορους μεσεγχυματικούς κυτταρικούς τύπους μεταξύ των οποίων και οι μυοϊνοβλάστες (Andersson-Sjoland *et al.*, 2008). Άλλες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι η συμβολή των κυττάρων αυτών – όπως και του EMT – στο συνολικό πληθυσμό των μυοϊνοβλαστών είναι μεν υπαρκτή αλλά πάρα πολύ περιορισμένη (Tanjore *et al.*, 2009). Αν στα στοιχεία αυτά συνυπολογίσει κανείς τη δυνατότητα των κυττάρων τύπου II να παράγουν κολλαγόνο αλλά και την ύπαρξη άλλων κυττάρων πληθυσμών που σε άλλα ινωτικά συστήματα έχουν δείξει αυξημένη πλαστικότητα και δυνατότητα διαφοροποίησης σε μεσεγχυματικά κύτταρα, γίνεται προφανές ότι η προέλευση των μυοϊνοβλαστών είναι μεν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο όσον αφορά την αντιμετώπιση της ίνωσης αλλά προς το παρόν απέχουμε πολύ από το να έχουμε μια σαφή εικόνα του ποιοι κυτταρικοί πληθυσμοί ενεργοποιούνται και σε τι βαθμό (βλέπε πίνακα 3). Ίσως το αρχικό ερέθισμα, ο ιστός, το εκάστοτε κυτταρικό περιβάλλον και τα εκάστοτε διαθέσιμα σηματοδοτικά μόρια επηρεάζουν τον κυτταρικό πληθυσμό που θα ενεργοποιηθεί κάθε φορά κάτι που θα έκανε ακόμη πιο περίπλοκη την αποσαφήνιση του ινωτικού μηχανισμού τόσο στον πνεύμονα όσο και στους υπόλοιπους ιστούς.

**Πίνακας 7: Πιθανές πηγές προέλευσης των κολλαγόνο-παραγωγών κυττάρων στον ινωτικό πνεύμονα (Kisseleva and Brenner, 2008).**

Πιθανή πηγή	Προτεινόμενο ποσοστό
Πνευμονικοί ινοβλάστες	60-80%
EMT	10-15%

Κύτταρα μυελού των οστών	25-35%
Λοιπές πηγές	?

## 5. Ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης

Για τη μελέτη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης αλλά και της πνευμονικής ίνωσης συνολικά, έχει δημιουργηθεί μια σειρά ζωικών μοντέλων στο ποντίκι με τη βοήθεια των οποίων έχουν χαρακτηριστεί πολλά μόρια και μοριακοί μηχανισμοί που μεσολαμβάνουν την ινωτική απόκριση. Τα διάφορα μοντέλα παρουσιάζουν συγκεκριμένα μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα (βλέπε πίνακα 4) και προσομοιώνουν σε διαφορετικό βαθμό την ανθρώπινη παθολογία.

**Πίνακας 8: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφόρων ζωικών μοντέλων πνευμονικής ίνωσης (Moore and Hogaboam, 2008).**

Μοντέλο	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<b>Μπλεομυκίνης</b>	Καλύτερα χαρακτηρισμένο	Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα στελέχη
	Χρόνος (14-28 ημέρες)	Κόστος
	Καλή προσομοίωση της ανθρώπινης παθολογίας	Έπειτα από ορισμένο χρονικό διάστημα ο βαθμός της ίνωσης περιορίζεται
	Πολλές εναλλακτικές οδοί χορήγησης	
<b>Ίκων φορέων</b>	Μελέτη προϊνωτικών και αντινωτικών παραγόντων	Πιθανή ενεργοποίηση ανοσοποιητικού από ιούς
	Δυνατότητα επιμόλυνσης	Δυνατότητα επιμόλυνσης



	πολλών κυτταρικών τύπων (λεντι-ιοί)	μόνο επιθηλιακών κυττάρων (αδενοϊοί)
<b>Διαγονιδιακό</b>	Μελέτη υπερέκφρασης συγκεκριμένων μορίων	Μη φυσιολογικές ποσότητες ορισμένων μορίων
	Έκφραση πρωτεϊνών στόχων υπό τον έλεγχο συγκεκριμένου υποκινητή	Χρόνος
<b>Ακτινοβολίας</b>	Καλή προσομοίωση της ανθρώπινης παθολογίας	Χρόνος (πάνω από 30 εβδομάδες)
		Υψηλό κόστος
		Ορισμένα στελέχη είναι ανθεκτικά
<b>Διοξειδίου του πυριτίου</b>	Δυνατότητα συνεχούς έκθεσης σε παθογόνο ερέθισμα	Χρόνος (12 ως 16 εβδομάδες)
	Προσομοίωση ορισμένων ανθρώπινων παθολογιών	Ορισμένα στελέχη είναι ανθεκτικά
		Ειδικός εξοπλισμός
<b>Fluorescein isothiocyanate (FITC)</b>	Δυνατότητα παρατήρησης τραυματισμένων περιοχών	Δεν προσομοιώνει την ανθρώπινη παθολογία
	Χρόνος (14-28 ημέρες)	Η αντίδραση παρουσιάζει διακυμάνσεις (Μέτρια επαναληψιμότητα)
	Μπορεί να εφαρμοστεί στα	
	περισσότερα στελέχη	
	Διατήρηση ινωτικού φαινοτύπου για 6 μήνες	

Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν το μοντέλο της μπλεομυκίνης και το μοντέλο της επιμόλυνσης με αδενοϊούς. Το μοντέλο της μπλεομυκίνης θεωρείται ότι προσομοιώνει με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη πιστότητα τα χαρακτηριστικά της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης ενώ χρειάζεται το μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα για να δημιουργηθεί (*Grande et al., 1998*). Το μοντέλο των αδενοϊών προσφέρει τη δυνατότητα της μελέτης της υπερέκφρασης, άρα και την αξιολόγηση του ρόλου και της επίδρασης, ενός μόνο μορίου που στην παρούσα εργασία είναι ο TGF- $\beta$  που έχει κεντρικό ρόλο στην ινωτική απόκριση.

## **Γ. ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗ ΚΙΝΑΣΗ**

### **1. Δομή και λειτουργία**

Η ιντεγκρινοσυνδεδεόμενη κινάση (Integrin-linked kinase, ILK) είναι μια πρωτεΐνη που προφανώς σχετίζεται άμεσα με τις ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών που δρουν κυρίως ως υποδοχείς για τα μόρια του εξωκυττάριου στρώματος αλλά και για υποδοχείς άλλων, γειτονικών κυττάρων. Κάθε ιντεγκρίνη είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια  $\alpha$  και μια  $\beta$  υπομονάδα, με μια μεγάλη εξωκυττάρια και μια μικρή ενδοκυττάρια περιοχή. Στα σπονδυλωτά έχουν ανακαλυφθεί 16  $\alpha$  και 8  $\beta$  υπομονάδες που μπορούν να συνδυαστούν σε πάνω από 20 διαφορετικά ετεροδιμερή (*Aplin et al., 1998*). Κύρια λειτουργία των ιντεγκρινών είναι η διασύνδεση του εξωκυττάριου στρώματος με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Η σύνδεση αυτή επιτρέπει στα κύτταρα να διατηρούν το σχήμα τους και προσφέρει τη δύναμη που χρειάζεται ώστε τα κύτταρα να λειτουργήσουν στο χώρο και να κινηθούν (*Li et al., 2005*). Ο ρόλος των ιντεγκρινών δεν περιορίζεται μόνο στο δομικό κομμάτι αλλά επεκτείνεται και στο σηματοδοτικό. Το εξωκυττάριο στρώμα αποτελεί το άμεσο περιβάλλον του κυττάρου και έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών. Αντίστοιχα, το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει το εξωκυττάριο στρώμα (σύσταση, διαμόρφωση). Μεγάλο μέρος αυτών των διεργασιών διεκπεραιώνονται μέσω ιντεγκρινο-ελεγχόμενης σηματοδότησης που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά σημάτων από το περιβάλλον προς το κύτταρο και αντίστροφα.

Οι κυτταροπλασματικές μονάδες των ιντεγκρινών είναι σχετικά μικρές και δεν διαθέτουν ενζυμική δραστηριότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μεταγωγή σημάτων να

γίνεται με τη βοήθεια μιας μεγάλης ομάδας πρωτεϊνών που ονομάζονται πρωτεΐνες προσαρμογείς (adaptor proteins) και αλληλεπιδρούν με τις κυτταροπλασματικές ουρές των ιντεγκρινών. Οι πρωτεΐνες προσαρμογείς διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τις adaptor proteins που έχουν **δομική δράση** κάτι που σημαίνει πως συνδέουν απευθείας τις ιντεγκρίνες στον κυτταροσκελετό, τις adaptor proteins που λειτουργούν ως **θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες** και επομένως βοηθούν στο σχηματισμό συμπλόκων και τέλος στις adaptor proteins που έχουν **ενζυμική δράση** (Legate and Fassler, 2009).

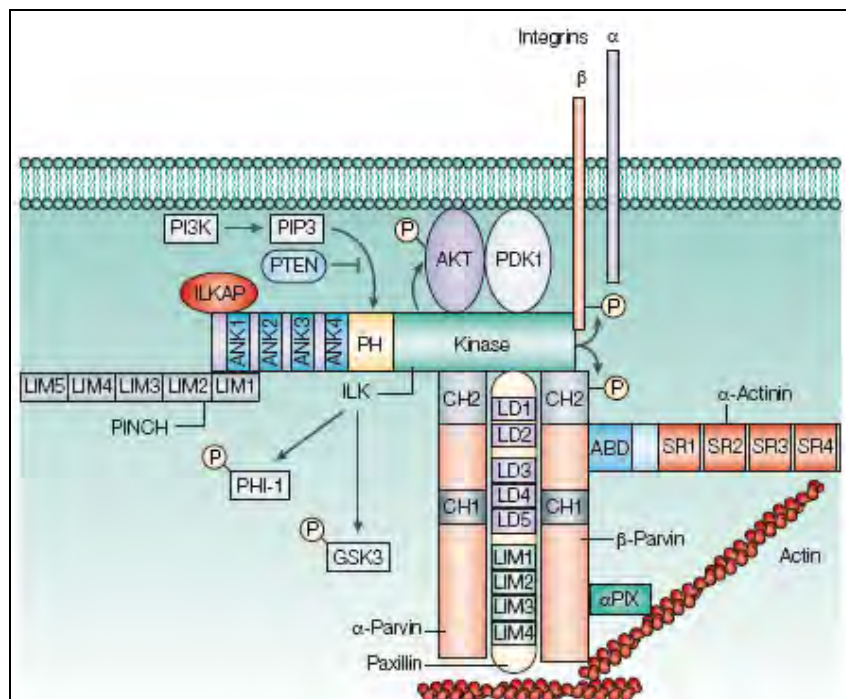
Η ILK ανακαλύφθηκε το 1996 σε ένα yeast two hybrid screen ως μια νέα πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική ουρά της β1 ιντεγκρίνης (Hannigan *et al.*, 1996) ενώ πλέον γνωρίζουμε ότι αλληλεπιδρά και με την β3 ιντεγκρίνη. Είναι μια ευρέως εκφραζόμενη κινάση σερίνης/θρεονίνης που αποτελείται από 453 αμινοξέα. Δομικά διακρίνεται σε τρία μέρη:

A) Την αμινοτελική περιοχή όπου υπάρχουν τέσσερα ankyrin repeats. Τα ankyrin repeats είναι συντηρημένα μοτίβα που αποτελούνται από 33 αμινοξέα. Μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και είναι ένα από τα πιο γνωστά πρωτεϊνικά δομικά μοτίβα. Μέσω των ankyrin repeats, η ILK αλληλεπιδρά με την Particularly Interesting New Cysteine-histidine πρωτεΐνη (PINCH) και την ILK-σχετιζόμενη πρωτεΐνη (ILKAP). Η δημιουργία του συμπλόκου ILK-PINCH είναι απαραίτητο για τη σταθεροποίηση και την επιβίωση των δύο πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα ενώ η ILKAP είναι μια φωσφατάση που αναστέλλει την ILK (Li *et al.*, 1999, Leung-Hagesteijn *et al.*, 2001).

B) Την καρβοξυ-τελική περιοχή που έχει ενζυμική δραστηριότητα, την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις ιντεγκρίνες αλλά και τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων η παξιλίνη και οι παρβίνες (α, β, γ παρβίνη). Μία από τις α- και β- παρβίνη προσδέεται κάθε φορά στο διμερές ILK-PINCH σχηματίζοντας ένα ακόμη πιο σταθερό τριμερές (Fukada *et al.*, 2003). Η δημιουργία του τριμερούς είναι απαραίτητη ώστε οι τρεις πρωτεΐνες να επιτελέσουν τις κυτταρικές τους λειτουργίες. Η α-παρβίνη συνδέει το σύμπλοκο, οπότε και τις ιντεγκρίνες, με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Η σύνδεση μπορεί να γίνει απευθείας ή έμμεσα μέσω της παξιλίνης (Nikolopoulos and Turner, 2000). Η β-παρβίνη μπορεί και αυτή να

συνδέσει το σύμπλοκο με τον κυτταροσκελετό άμεσα ή έμμεσα μέσω της α-ακτινίνης (Yamaji *et al.*, 2004). Παράλληλα, η β-παρβίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον παράγοντα αPIX, ο οποίος είναι ένας guanine exchange factor, συνδέοντας το τριμερές με τις GTPάσες Rac1 και Cdc42 που εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Rosenberger *et al.*, 2003).

Γ) Μία pleckstrin homology, (PH)-like, περιοχή στο κέντρο. Η PH-like περιοχή αποτελείται από 120 αμινοξέα και είναι πολύ κοινή σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ενδοκυττάρια σηματοδότηση ή τον κυτταροσκελετό. Μέσω της περιοχής αυτής, η ILK προσδένεται με την 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη (PIP3). Η αλληλεπίδραση αυτή ενεργοποιεί τη δραστηριότητα κινάσης της ILK (Delcommenne *et al.*, 1998).



**Εικόνα 7: Δομή και αλληλεπιδράσεις της ILK.** Η ILK σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεΐνες που είτε συνδέονται με τον κυτταροσκελετό είτε συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Η αμινοτελική περιοχή αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων η ILKAP και η PINCH η οποία συνδέεται και με τους υποδοχείς κινάσων τυροσίνης (receptor tyrosine kinase). Το καρβοξυτελικό άκρο διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα και φωσφορυλιώνει υποστρώματα όπως η Akt και η GSK3β ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά με τη β ιντεγκρίνη και διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων η α και β παρβίνες και η παξιλλίνη. Οι παρβίνες και η παξιλλίνη συνδέουν το σύμπλοκο, άμεσα ή έμμεσα, με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Το κεντρικό τμήμα διαθέτει ένα PH-like

**μοτίβο μέσω του οποίου αλληλεπιδρά με την PIP3. ILKAP: ILK associated protein, ANK: ankyrin repeat, PH: pleckstrin homology, PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (Hannigan et al., 2005).**

Ο ρόλος της ILK στο κύτταρο έχει έντονες ομοιότητες με το ρόλο των ιντεγκρινών που είναι μεν δομικός αλλά ταυτόχρονα σχετίζεται άμεσα και με τη μεταγωγή σημάτων από και προς τον πυρήνα. Όπως προαναφέρθηκε, η ILK σχηματίζει πρωτεϊνικά σύμπλοκα λειτουργώντας ως adaptor protein. Μέσω της αλληλεπίδρασης της ILK με τις κυτταροπλασματικές ουρές της β1 και β3 ιντεγκρίνης, τα σύμπλοκα αυτά συνδέουν άμεσα ή έμμεσα τον κυτταροσκελετό ακτίνης με τις ιντεγκρίνες και επομένως με το εξωκυττάριο στρώμα. Κατά συνέπεια, μέσω της ILK εξυπηρετούνται διάφορες δομικές λειτουργίες όπως η κίνηση, η αντοχή στις μηχανικές πιέσεις και η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος.

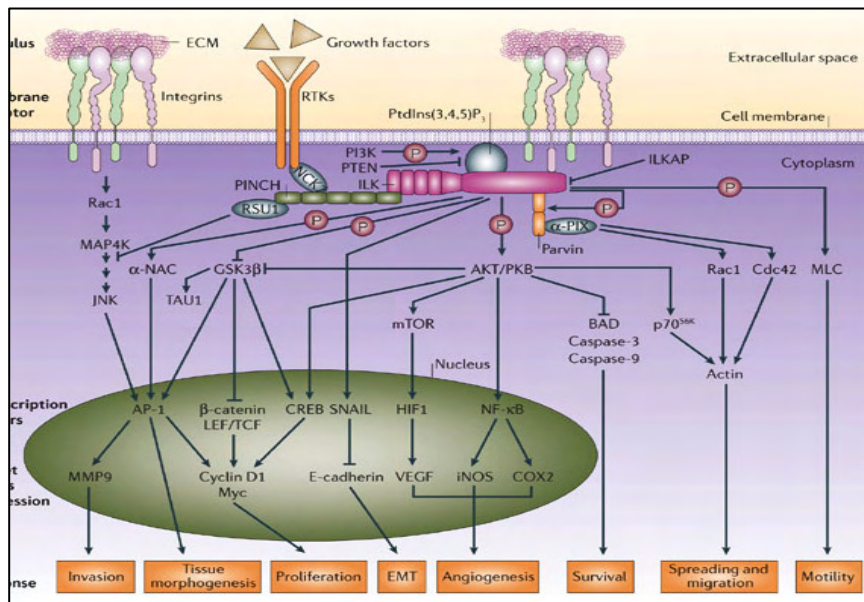
Ο ρόλος της ILK ως κινάσης δεν είναι καθολικά αποδεκτός. Αυτό οφείλεται στο ότι παρόλο που η αλληλουχία της καταλυτικής της περιοχής έχει μεγάλο βαθμό ομοιότητας (και αναγνωρίζεται ως τέτοια) με αυτή των κινασών, δεν διαθέτει δύο συντηρημένα μοτίβα που είναι υπεύθυνα για την καταλυτική δράση των κινασών (Hannigan et al., 2005). Προς ενίσχυση της θεωρίας αυτής, έχει αποδειχθεί ότι η ILK δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογέας παρά ως κινάση τόσο στη φρουτόμυγα (*Drosophila Melanogaster*), (Zervas et al., 2001) όσο και στον γεωσκόληκα (*C. elegans*), (Mackinnon et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες για την ILK και στο ποντίκι φαίνεται να επιβεβαιώνουν την άποψη αυτή και για ανώτερους οργανισμούς αφού η δράση της ILK ως κινάση δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για την εμβρυονική ανάπτυξη του ποντικού (Lange et al., 2009). Εξαιτίας των παραπάνω, η ILK έχει κατηγοριοποιηθεί και ως ψευδοκινάση (Boudeau et al., 2006).

Εν τούτοις, σε πολλά κυτταρικά συστήματα έχει αποδειχθεί ότι η ILK μπορεί να φωσφορυλιώσει υποστρώματα ενώ είναι πολύ πιθανό να ισχύει το ίδιο και *in vivo* (Legate et al., 2006). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι υπάρχουν διάφορα παραδείγματα μη τυπικών κινασών που αποδεδειγμένα έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν υποστρώματα (Manning et al., 2002).

Τα βασικότερα υποστρώματα της ILK είναι η πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, PKB ή Akt) και η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3β (GSK3β), (Persad et al., 2001b, Delcommenne et al., 1998). Σύμφωνα με τις εργασίες αυτές, η ILK

φωσφορυλιώνει την Akt στη σερίνη 473 ενεργοποιώντας την ενώ φωσφορυλιώνει και την GSK3β απενεργοποιώντας την. Η εμπλοκή της ILK στη ρύθμιση της δραστηριότητας δύο τόσο σημαντικών ενζύμων για το κύτταρο σημαίνει ότι, έστω και έμμεσα, η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών και λειτουργιών. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της Akt οδηγεί στην ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών μονοπατιών αλλά και στην επαγωγή της αγγειογένεσης. Η απενεργοποίηση της GSK3β οδηγεί στη συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και κατόπιν στη μετακίνηση της στον πυρήνα όπου σχηματίζοντας σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες LEF-1/TCF επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευση (*Grashoff et al., 2004, Novak et al., 1998*).

Τέλος, για τον προσδιορισμό της ILK στην ανάπτυξη έχουν γίνει μελέτες σε διάφορα μοντέλα σπονδυλωτών και ασπόνδυλων. Στα ποντίκια, η γενετική απαλοιφή του γονιδίου (knockout) της ILK οδηγεί σε θάνατο κατά την εμβρυακή φάση της ανάπτυξης, συγκεκριμένα κατά την έκτη ημέρα (*Sakai et al., 2003*). Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, δημιουργήθηκαν διάφορα μοντέλα στοχευμένης γενετικής απαλοιφής του γονιδίου της ILK (conditional knockout). Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η απαλοιφή της ILK από τα χονδροκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα. Στην περίπτωση των χονδροκυττάρων, η απαλοιφή της ILK οδηγεί στην ανάπτυξη χονδροδυσπλασίας και στο θάνατο κατά τη γέννηση λόγω αναπνευστικών προβλημάτων (*Grashoff et al., 2003*). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η απαλοιφή της ILK προκαλεί μη φυσιολογικό σχηματισμό των αγγείων και θάνατο κατά τη γέννηση (*Friedric et al., 2004*). Στα μακροφάγα, η απαλοιφή της ILK έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση της Akt στη σερίνη 473 (*Trousard et al., 2003*) κάτι που έχει παρατηρηθεί με τη βοήθεια άλλων τεχνικών τόσο στους νευρώνες (*Mills et al., 2003*) όσο και στα λευκοκύτταρα (*Friedrich et al., 2002*). Σε κάθε περίπτωση, τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα της ILK για τον οργανισμό καθώς και την πολυλειτουργικότητά της.



**Εικόνα 8:** Σηματοδότηση μέσω της ILK. Η ILK φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την 3-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσοτόλης (PI3K) ενώ αναστέλλεται από τις φωσφατάσες ILK-associated protein (ILKAP) και Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN). Η ενεργοποιημένη ILK φωσφορυλιώνει τις Akt και Glycogen-synthase kinase-3β (GSK3β) ενεργοποιώντας την πρώτη και απενεργοποιώντας τη δεύτερη. Κατά συνέπεια, ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, το EMT, τη μετανάστευση κλπ (Legate *et al.*, 2006).

## 2. Ιντεγκρινοσυνδεδεμένη κινάση και ίνωση

Σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ανακάλυψή της, η ILK συνδέθηκε με διάφορες παθολογικές καταστάσεις και κυρίως με τον καρκίνο αφού η υπερέκφραση ενεργής ILK σε επιθηλιακά κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να γίνονται μεταστατικά, αποκτώντας μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά (Wu *et al.*, 1997). Στη συνέχεια, ο ρόλος της χαρακτηρίστηκε και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις μεταξύ των οποίων και η ίνωση.

Η ILK σχετίστηκε για πρώτη φορά με την ίνωση το 2003 (Li *et al.*, 2003). Η μελέτη αυτή αφορούσε το ρόλο της ILK στη νεφρική ίνωση. Τόσο με *in vitro* όσο και με *in vivo* πειράματα αποδείχθηκε, για πρώτη φορά, ότι η ILK συνδέεται με μία από τις πιθανές πηγές ινοβλαστών στην ίνωση. Η πηγή αυτή ήταν το EMT το οποίο έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικό για τη νεφρική ίνωση αφού μπορεί να συνεισφέρει ως

και το 35% των ινοβλαστών που παράγονται κατά την εξέλιξη της ίνωσης στα νεφρά (Iwano *et al.*, 2002). Ο ρόλος της ILK στο νεφρικό EMT, το οποίο θα αναλυθεί στη συνέχεια, είναι πολύ σημαντικός αφού συνδέεται άμεσα με το εναρκτήριο και σημαντικότερο ίσως βήμα του, την απώλεια της E-καντερίνης, γεγονός που σηματοδοτεί την απώλεια της συνοχής του επιθηλίου. Βασικός μεσολαβητής της διαδικασίας θεωρείται ο TGF- $\beta$  η δράση του οποίου μεσολαβείται από την ILK. Δευτερεύοντα ευρήματα της ίδιας έρευνας ήταν ότι η ILK μπορεί σε ένα βαθμό να επάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεΐνών που είναι απαραίτητες για τη διάσπαση της σωληναριακής βασικής μεμβράνης και τη μετακίνηση των μετασχηματισμένων κυττάρων προς τις ινωτικές εστίες καθώς και ότι η υπερέκφρασή της επάγει την έκφραση και την εξοκυττάρια συγκρότηση της ινωδονεκτίνης. Ο κεντρικός ρόλος της ILK στην εκδήλωση του EMT αλλά και η εμπλοκή της σε άλλες ινωτικές διαδικασίες στα νεφρά έχουν αναδείξει την ILK σε μόριο κλειδί για την παθογένεση της νεφρικής ίνωσης.

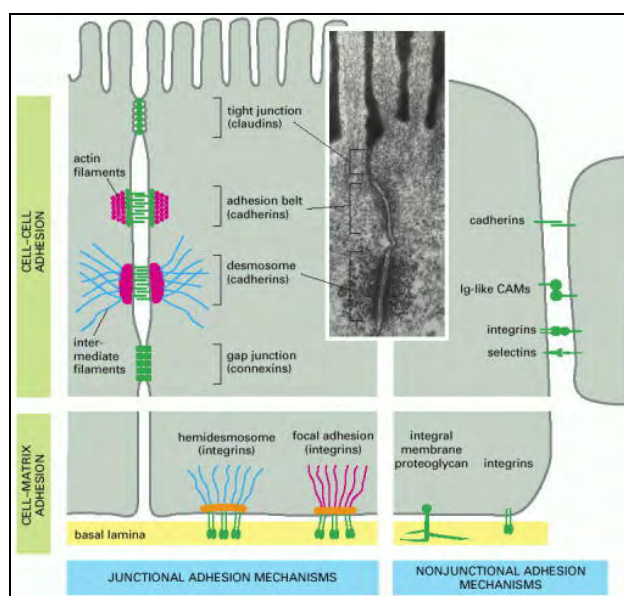
Τα επόμενα χρόνια, η ILK συνδέθηκε ξανά με μια παρόμοια με το EMT ινωτική διαδικασία στην ηπατική ίνωση. Όπως προαναφέρθηκε, στην αύξηση του αριθμού των ινοβλαστών στην ηπατική ίνωση συμβάλλουν και τα λιποαποθηκευτικά κύτταρα που ονομάζονται Hepatic Stellate Cells (HSCs). Έπειτα από οξύ ή χρόνια τραύμα, όπως στην ίνωση, τα λιποαποθηκευτικά κύτταρα υφίστανται μια διαδικασία ενεργοποίησης προς έναν νέο φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα, αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού αλλά και από την ικανότητα παραγωγής συστατικών του εξοκυττάριου στρώματος (Pinzani *et al.*, 1998). Η διαδικασία μέσω της οποίας γίνεται η ενεργοποίηση αυτή δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί αλλά όπως και το EMT φαίνεται να μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από τον TGF- $\beta$ . Έχει προταθεί ότι σε απόκριση στον TGF- $\beta$  η ILK εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των HSCs (Zhang *et al.*, 2006) αλλά και σε άλλους τομείς της ηπατικής λειτουργία όπως η προστασία των ηπατοκυττάρων από την απόπτωση (Gkretsi *et al.*, 2006). Εν τούτοις, πρέπει να σημειωθεί ότι ο ακριβής ρόλος της ILK στη διαδικασία ενεργοποίησης των λιπο-αποθηκευτικών κυττάρων παραμένει άγνωστος.



### 3. Ιντεγκρινοσυνδεόμενη κινάση και Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή

Τα επιθηλιακά και τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι δύο κατηγορίες κυττάρων με θεμελιώδεις διαφορές τόσο στο φαινότυπο όσο και στη λειτουργία τους. Τα επιθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πολικότητα με κατεύθυνση από τη βάση προς την κορυφή τους (apical-basolateral polarization), τη στενή μεταξύ τους σύνδεση με ειδικούς διακυτταρικούς συνδέσμους αλλά και με την ισχυρή σύνδεσή τους με τη βασική μεμβράνη (σκληρό φύλλο εξωκυττάριου στρώματος στο οποίο ακουμπά η βασική επιφάνεια του επιθηλίου).

Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι που συνδέουν τα επιθηλιακά κύτταρα διακρίνονται στους **στεγανούς συνδέσμους** (tight junctions) που σχηματίζονται από τις πρωτεΐνες zonula occludens (ZO), στους **σύνδεσμους προσκόλλησης** (adherent junctions) που σχηματίζονται από καντερίνες, τα **δεσμοσωμάτια** όπου συμμετέχουν οι δεσμοπλακίνες, οι δεσμογλεΐνες και οι καντερίνες και τέλος τους **χασμοσυνδέσμους** (gap junctions) που σχηματίζονται από τις κονεξίνες (Alberts et al., 2002). Η σύνδεση των κυττάρων με τη βασική μεμβράνη γίνεται κυρίως μέσω των ιντεγκρινών οι οποίες συνδέουν τα κύτταρα με τον κυτταροσκελετό ακτίνης (βλέπε ILK) ή με ένα άλλο πρωτεϊνικό πλέγμα του κυτταροσκελετού, τα ενδιάμεσα ινίδια (intermediate filaments) που αποτελούνται από κερατίνη.



Εικόνα 9: Οι σύνδεσμοι ενός επιθηλιακού κυττάρου με ένα γειτονικό κύτταρο και τη βασική μεμβράνη. Η πλευρική σύνδεση επιτυγχάνεται μέσω των tight

junctions (claudins), των adherent junctions (cadherins), των δεσμοσωματίων (cadherins, desmogloins, desmoplakins) και των gap junctions (connexins). Η σύνδεση με τη βασική μεμβράνη επιτυγχάνεται μέσω της ιντεγκρινών οι οποίες συνδέονται με τα νημάτια ακτίνης ή τα ημι-δεσμοσωμάτια που είναι μέλη των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού (Alberts et al., 2002).

Σε αντίθεση με τα επιθηλιακά, τα μεσεγχυματικά κύτταρα δεν σχηματίζουν σειρές ή/και στοίβες κυττάρων αφού δεν προσδένονται στη βασική μεμβράνη ενώ και με τα γειτονικά τους κύτταρα η σύνδεση, αν υπάρχει, είναι αρκετά χαλαρή. Επίσης, δεν έχουν πολικότητα βάσης-κορυφής αλλά, όταν βρίσκονται σε κίνηση, πρόσθιου-οπίσθιου τμήματος. Σε κυτταροκαλλιέργεια, τα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν συσσωματώματα διατηρώντας όλες τις συνδέσεις με τα γειτονικά τους κύτταρα. Αντίθετα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα αποκτούν ατρακτοειδές σχήμα που θυμίζει αυτό των ινοβλαστών (Thiery and Sleeman, 2006).

Παρά τις θεμελιώδεις διαφορές τους και ενώ για αρκετά χρόνια ήταν κοινά αποδεκτό, χωρίς όμως να υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, ότι μετά το τέλος της οργανογένεσης τα επιθηλιακά κύτταρα φτάνουν σε μια κατάσταση πλήρους διαφοροποίησης από την οποία δεν μπορούσαν να βγουν, πλέον γνωρίζουμε ότι μέσω του EMT επιθηλιακά κύτταρα ενήλικων οργανισμών μπορούν υπό τις κατάλληλες συνθήκες και με τα κατάλληλα ερεθίσματα να μετατραπούν σε μεσεγχυματικά. Το EMT περιλαμβάνει μια σειρά ενδο- και διακυτταρικών μεταβολών μέσω των οποίων τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους και αποκτούν ιδιότητες που είναι χαρακτηριστικές των μεσεγχυματικών κυττάρων.

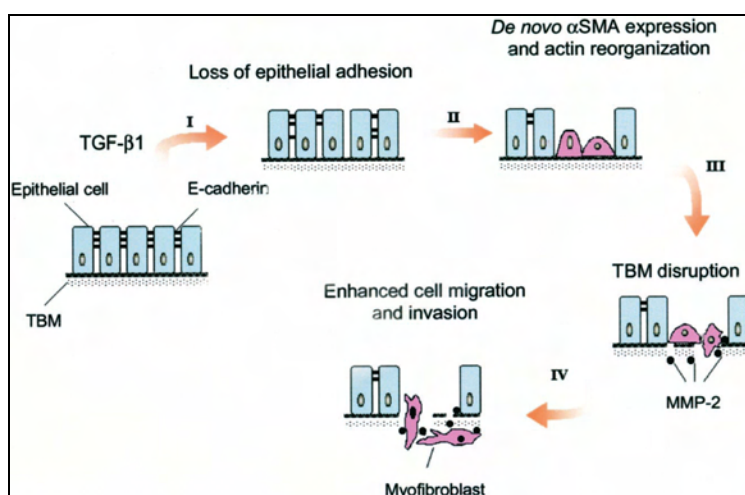
Για λόγους ευκολίας στη μελέτη, το EMT έχει πλέον κατηγοριοποιηθεί σε τρεις υποκατηγορίες βάσει του βιολογικού πλαισίου στο οποίο συμβαίνει. Οι κατηγορίες αυτές είναι: 1) Το **EMT που συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση** και την ανάπτυξη των οργάνων ως μια φυσιολογική αναπτυξιακή λειτουργία, 2) το **EMT που συμβαίνει σε καρκινικούς ιστούς** και σχετίζεται με την ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου και 3) το **EMT που συμβαίνει κατά την επούλωση τραυμάτων και κατά τη διάρκεια της ίνωσης** (Kalluri and Weinberg, 2009).

Στην ίνωση, το EMT έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα στα νεφρά. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο χωρίζονται συνήθως σε τέσσερα στάδια. Στο πρώτο στάδιο περιλαμβάνεται η **απώλεια των συνδέσμων των επιθηλιακών κυττάρων** με τα γειτονικά τους κύτταρα αλλά και τη βασική

μεμβράνη. Το στάδιο αυτό θεωρείται το πιο σημαντικό στάδιο του EMT αφού εκτός του ότι είναι το εναρκτήριο βήμα της διαδικασίας, η ολοκλήρωσή του σηματοδοτεί την απώλεια ενός εκ των κύριων χαρακτηριστικών των επιθηλιακών κυττάρων που είναι η στενή διασύνδεση με τα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα. Η συμμετοχή της ILK στη ρύθμιση του βήματος αυτού δικαιολογεί το γιατί θεωρείται από τα βασικά μόρια του νεφρικού EMT.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την **απώλεια της βασικής-κορυφαίας πολικότητας** των κυττάρων, την **αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού** ακτίνης ώστε να επέλθει αλλαγή σχήματος και την **έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών** όπως η  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). Συνολικά, οι αλλαγές του δεύτερου βήματος έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια και των τελευταίων επιθηλιακών χαρακτηριστικών ενώ σταδιακά αλλάζει και το πάνελ των γονιδίων που εκφράζονται ώστε το κύτταρο να αλλάξει σχήμα και να αποκτήσει μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και δείκτες.

Στο τρίτο βήμα λαμβάνει χώρα η μερική **αποικοδόμηση της σωληνιακής βασικής μεμβράνης** από μεταλλοπρωτεϊνάσες ώστε τα μετασχηματισμένα κύτταρα να μπορέσουν να μετακινηθούν προς το σημείο του τραύματος. Στο τέταρτο και τελευταίο βήμα, περιλαμβάνεται η σύνθεση πρωτεϊνών που θα βοηθήσουν στην **κυτταρική μετανάστευση** καθώς και η μετανάστευση αυτή καθ' αυτή (Yang and Liu, 2001).



**Εικόνα 10:** Το νεφρικό EMT μπορεί να χωρισθεί σε τέσσερα βασικά στάδια: 1) την απώλεια των συνδέσμων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, 2) την

αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και την έκφραση μεσεγγυματικών δεικτών, 3) τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης από μεταλλοπρωτεϊνάσες και 4) τη μετανάστευση των μετασχηματισμένων κυττάρων (Yang and Liu, 2001).

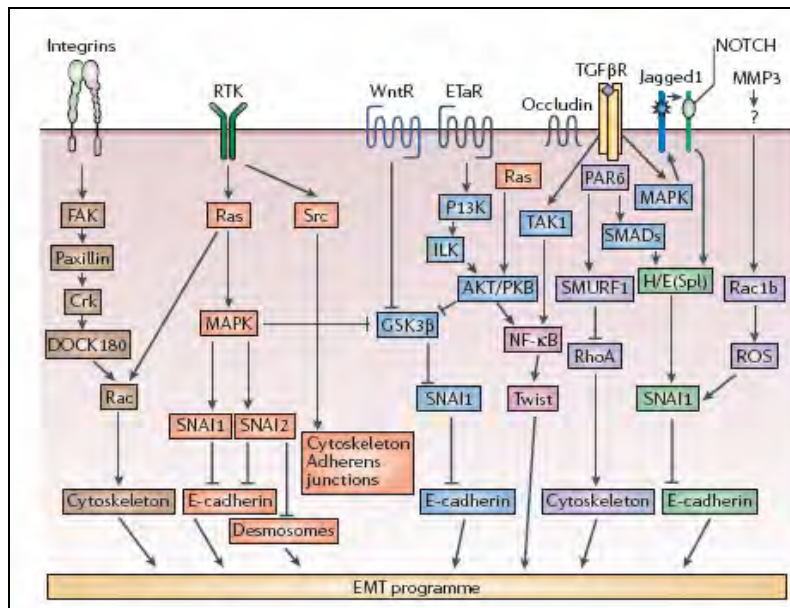
Το EMT μπορεί να πυροδοτηθεί από την αλληλεπίδραση διαφόρων εξωκυττάρων ερεθισμάτων όπως συστατικά του εξωκυττάρου στρώματος σαν το κολλαγόνο και το υαλουρονικό οξύ (Zoltan-Jones et al., 2003) καθώς και από αυξητικούς παράγοντες όπως ο TGF-β, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF). Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από υποδοχείς κινασών τυροσίνης σε συνεργασία με μονοπάτια που ελέγχονται από ιντεγκρίνες ενεργοποιούν το EMT *in vivo* και *in vitro* (Avizienyte and Frame 2005, Yano et al., 2004) ενώ αναπτυξιακά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το Wnt και το Notch μπορούν να ρυθμίσουν διάφορα στάδια του EMT (Zavadil et al., 2004). Σε κάθε περίπτωση, το EMT είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία για την οποία έρχονται συνεχώς στο φως νέα στοιχεία σχετικά με τη σηματοδότησή του και τις αλληλεπιδράσεις των διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Παρά τα διαφορετικά αρχικά ερεθίσματα και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορούν να εμπλακούν στο EMT, ο αρχικός και κρίσιμος στόχος όλων των μορίων που σχετίζονται με την έναρξη του EMT φαίνεται να είναι κοινός. Ο στόχος αυτός είναι η E-καντερίνη και η μείωσή της, γεγονός που σηματοδοτεί την έναρξη του EMT αφού η απώλειά της δεν επηρεάζει μόνο τη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων αλλά επάγει και αλλαγές στο σχήμα και την πολικότητά τους (Baum et al., 2008). Η E-καντερίνη ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Ο κύριος τρόπος μείωσης των επιπέδων της στο EMT είναι η αναστολή της μεταγραφή της. Υπάρχουν τρεις κύριες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων που αναστέλλουν τη μεταγραφή του γονιδίου της E-καντερίνης: η SNAIL, η ZEB και η b-HLH (Peinado et al., 2007). Ο μεταγραφικός παράγοντας Snail1 θεωρείται ο κύριος στόχος των περισσότερων μονοπατιών που πυροδοτούν το EMT (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005) αλλά ο ρόλος τόσο των υπόλοιπων μεταγραφικών παραγόντων όσο και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων δεν θα πρέπει να υποτιμούνται.

Η ILK θεωρείται ως ένα από τα downstream μόρια της σηματοδότησης του TGF-β μέσω της οποίας ο TGF-β επιτυγχάνει τη μείωση της E-καντερίνης και την έναρξη

του EMT. Ο υποδοχέας του TGF-β είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δύο τύπου I και δύο τύπου II υπομονάδες που έχουν δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί επτά τύπου I υποδοχείς που ονομάζονται ALK (1-7) εκ των οποίων ο TGF-β προσδένεται στους ALK5,2,1 και πέντε τύπου II υποδοχείς εκ των οποίων ο TGF-beta προσδένεται στον TβRII (*Derynck and Feng, 1997*). Αρχικά ο TGF-β προσδένεται στον τύπου II υποδοχέα κάτι που προκαλεί τη φωσφορυλίωση (και ενεργοποίηση) του τύπου I υποδοχέα. Ο ενεργοποιημένος τύπου I υποδοχέας φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια ομάδα ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που μεσολαβούν τη δράση του TGF-β και ονομάζονται R-SMADs (receptor –activated SMADs). Η δράση του TGF-β μεσολαβείται από τα SMAD2,3 που αφού φωσφορυλιωθούν και ενεργοποιηθούν από τον υποδοχέα, σχηματίζουν σύμπλοκο με το SMAD4 και ακολούθως μεταναστεύουν στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (*Derynck and Zhang, 2003*).

Μέσω του SMAD2,3 μονοπατιού, ο TGF-β αυξάνει τη μεταγραφή και τα επίπεδα της ILK. Στη συνέχεια, μέσω ενός μηχανισμού που δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί, η ILK προκαλεί τη μείωση της E-καντερίνης. Έχουν προταθεί δύο πιθανοί μηχανισμοί. Ο πρώτος αφορά τη μείωση της μεταγραφής του γονιδίου της E-καντερίνης μέσω της αύξησης των επιπέδων του αναστολέα της μεταγραφής της E-καντερίνης snail1 από την ILK (*McPhee et al., 2008*). Ο δεύτερος σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση (άμεση ή έμμεση) της GSK3β από την ILK που οδηγεί στη σταθεροποίησή της β-κατενίνης και στη μετακίνησή της στον πυρήνα με αποτέλεσμα τη διάσπαση της σύνδεσης E-καντερίνης-β-κατενίνης και την αποικοδόμηση της E-καντερίνης (*Persard et al., 2001*).



**Εικόνα 11:** Σύνοψη των σηματοδοτικών μονοπατιών που μεσολαβούν το EMT. Οι υποδοχείς κινασών τυροσίνης (RTKs) σε συνδυασμό με τις ιντεγκρίνες, πυροδοτούν το EMT σε διάφορες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Ο TGF-β επάγει το EMT in vivo και in vitro μέσω SMAD-dependent και independent μονοπατιών. Νέα στοιχεία εμπλέκουν στο EMT τόσο το Notch όσο και το Wnt signaling ενώ είναι πιθανό να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες όπως ο Endothelin-A-receptor (ET-aR) και οι Matrix metalloproteinas (*Thiery and Sleeman, 2006*).

#### 4. Ιντεγκρινοσυνδεδεμένη κινάση και πνεύμονας

Όπως και στους περισσότερους ιστούς, ο ρόλος της ILK στον πνεύμονα έχει μελετηθεί κυρίως σε σχέση με τον καρκίνο. Αυτό οφείλεται στο ότι η ILK θεωρείται πιθανός αντικαρκινικός φαρμακευτικός στόχος αφού μεσολαβεί στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων καθώς και στη μετάσταση. Μέχρι τώρα ο κύριος τύπος καρκίνου του πνεύμονα που φαίνεται να μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από την ILK είναι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (non-small cell lung cancer) όπου η ILK συνδέεται με το μέγεθος και τη μεταστατικότητα του όγκου (*Takanami., 2005*). Στην πνευμονική ίνωση, ο ρόλος της ILK παραμένει ουσιαστικά άγνωστος αφού η μοναδική δημοσιευμένη εργασία για την ILK στον ινωτικό πνεύμονα (*Wu et al., 2009*) δεν έχει ως βασικό ζητούμενο την ILK οπότε και μελετάται ελάχιστα ενώ το ζωικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κλασικό ινωτικό μοντέλο του πνεύμονα.

## **Δ. ΙΝΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΚΤΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ίνωση μπορεί να εκδηλωθεί σε όλους πρακτικά τους ζωικούς ιστούς. Ο πολυπαραγοντικός χαρακτήρας των ινωτικών διαδικασιών καθιστά απαραίτητη τη μελέτη της ίνωσης και των ινωτικών μηχανισμών σε μια ευρύτερη βάση, η οποία θα περιλαμβάνει διάφορους ινωτικούς ιστούς και μηχανισμούς. Για το λόγο αυτό, εκτός από την πνευμονική ίνωση που αποτελεί και το κύριο ζητούμενο της παρούσας διατριβής, η έρευνα για τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την ινωτική απόκριση επεκτάθηκε και σε άλλους ιστούς.

### **1. Νεφρική ίνωση**

Η ίνωση του διάμεσου σωληναριακού χώρου είναι το κύριο χαρακτηριστικό των χρόνιων παθήσεων του νεφρού ενώ έχει προταθεί ότι αποτελεί και την κύρια αιτία απώλειας των νεφρώνων (*Zeisberg et al., 2001, Remuzzi and Bertani, 1998*). Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προσομοιώνει πολλά χαρακτηριστικά διάφορων ανθρώπινων ασθενειών είναι το μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης (*unilateral ureteric obstruction, UUO*), (*Klahr S. and Morissey J., 2002*). Το μοντέλο χαρακτηρίζεται από κυτταρικές διηθήσεις, EMT, διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ παραγωγής και αποικοδόμησης των μορίων του εξωκυττάριου στρώματος καθώς και από ατροφία των σωληναρίων. Οι περισσότερες μελέτες στο μοντέλο αυτό αφορούν χρονικά διαστήματα επτά ημερών ή και μεγαλύτερα αφού κατά τα χρονικά διαστήματα αυτά παρατηρούνται τα κλασικά ινωτικά χαρακτηριστικά όπως η συσσώρευση κολλαγόνου. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται ένα βιβλιογραφικό κενό σε σχέση με τα αρχικά στάδια της νεφρικής ίνωσης και τα μόρια που εμπλέκονται στα στάδια αυτά.

### **2. Διαβήτης τύπου II**

Ο διαβήτης τύπου II είναι μια ασθένεια που αφορά μεγάλο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού ενώ κάθε χρόνο, τεράστια ποσά δαπανώνται στην έρευνα για την αντιμετώπιση του διαβήτη (*CDC, 2009*). Τα παγκρεατικά β-κύτταρα θεωρούνται κύτταρα κλειδιά στην παθογένεση και των δύο τύπων διαβήτη καθώς είναι τα κύτταρα που παράγουν την ινσουλίνη. Στον τύπου II διαβήτη, η έκθεση των β-

κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης οδηγεί σε τοξικά αποτελέσματα. Το φαινόμενο ονομάζεται τοξικότητα γλυκόζης (*Robertson R.P. et al., 2004*). Έχουν προταθεί πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια και μηχανισμοί που θα μπορούσαν να μεσολαβούν την καταστροφή των β-κυττάρων με την ίνωση να είναι ένας από τους μηχανισμούς αυτούς (*Kim J.W. et al., 2008*). Εν τούτοις, σε μεγάλο βαθμό, οι ακριβείς μηχανισμοί και σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν τελικά στην καταστροφή των β-κυττάρων και στη μείωση κατά συνέπεια της έκκρισης της ινσουλίνης παραμένουν άγνωστοι.



# **ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη του ρόλου της ιντεγκρινοσυνδεδεμένης κινάσης (ILK) στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης καθώς και στο πνευμονικό EMT που είναι ένας από τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται κατά την ινωγένεση συμβάλλοντας στην καταστροφή της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του ιστού. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε μια διπλή προσέγγιση που περιλάμβανε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα.

Για τα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κυψελδικά επιθηλιακά κύτταρα της σειράς A549. Η βασική στρατηγική στα *in vitro* πειράματα ήταν να χρησιμοποιηθεί ο TGF-β1, που είναι βασικός παράγοντας της ινωγένεσης, για να επάγει EMT και άλλα ινωτικά χαρακτηριστικά στα κύτταρα. Στη συνέχεια με τη χρήση της τεχνικής του small interference RNA, siRNA μελετήθηκε ο ρόλος της ILK στο πνευμονικό EMT. Παράλληλα, με τη βοήθεια του siRNA μελετήθηκε ο ρόλος της ILK σε βασικές φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων όπως η κυτταρική μετανάστευση, η διατήρηση του σχήματος και η απόπτωση,

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης. Το πρώτο ήταν ένα μοντέλο υπερέκφρασης του TGF-β μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η *in vivo* επίδραση του TGF-β στην ILK στον ινωτικό πνεύμονα. Το δεύτερο ήταν ένα μοντέλο μπλεομυκίνης που είναι το καλύτερα ίσως χαρακτηρισμένο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβωθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν την ILK στον ινωτικό πνεύμονα ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τον ρόλο της ILK στην ινωτική διαδικασία.

Για τα εκτός πνεύμονα ινωτικά συστήματα χρησιμοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση με σκοπό την ανακάλυψη νέων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την ινωγένεση στο νεφρό και στα β-παγκρεατικά κύτταρα. Στο νεφρό, επιλέχθηκε η πρωτεΐνη καλρετικουλίνη η οποία βρέθηκε να υπερεκφράζεται στη νεφρική ίνωση. Στα β-κύτταρα επιλέχθηκε η ERp46 που βρέθηκε μειωμένη σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Και για τα δύο συστήματα ερευνήθηκε περαιτέρω, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στα αντίστοιχα ινωτικά συστήματα.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## A. ΥΛΙΚΑ

### 1. Αντισώματα

Αντι-	Εταιρεία	Κωδικός	Western blot	IHC	IF
ILK	Sigma-Aldrich	I 1907	1:4000	1:100	1:50
E-cadherin	BD Transduction Laboratories	610181	1:2500		
Vimentin	Thermo Scientific	MS-129-P0	1:2000		
β-Actin	Sigma-Aldrich	A 5316	1:5000		
Fibronectin	Santa Cruz Biotechnology	sc-8422			1:100
α-SMA	Sigma-Aldrich	A 2547			1:500
Type I cells α-protein	Developmental Studies Hybridoma Bank	8.1.1			1:1000
FSP1	Dako Cytomation	A5114	1:1000	1:100	
Calreticulin	Upstate	06-661	1:500	1:50	1:50
Erp46	Abcam	Ab10292	1:1000	1:20	1:20
Surfactant protein-beta	Abcam	Ab3282			1:50
Rabbit HRP-conjugated	Sigma-Aldrich	A 6154	1:40000	1:200	
Mouse HRP-conjugated	Sigma-Aldrich	A 9044	1:40000	1:200	
Rabbit Cy2-conjugated	Jackson Immunoresearch	711-165-152			1:200
Mouse Cy3-conjugated	Jackson Immunoresearch	715-165-150			1:200

- **IHC: Immunohistochemistry (ανσοοϊστοχημεία)**

- **IF: Immunofluorescence (ανοσοφθορισμός)**

## 2. Small interference RNA (siRNA)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο siRNA, ένα ειδικό για την ILK, Qiagen, SIO4379382 και ένα μη ειδικό, ως αρνητικό κοντρόλ, Dharmacon, μη ειδικό siRNA νουμερο 1, D-001210.

ILK siRNA: 5' AGC UUA ACU UCC UGA CGA A dTdT 3'

3' UUC GUC AGG AAG UUA AGC U dGdT 5'

## 3. Primers

Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη primers, ένα για την ILK και ένα για το 18S rRNA:

**ILK:** forward: 5'- AAGACACAAACAGACGCTCAG-3'

reverse: 5'- TCCAGTGCCACCTTCATCC-3'

**18S rRNA:** forward: 5' AACTTTCGATGGTAGTCGCC

reverse: 5' CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT3'

Η σύνθεση των primers έγινε στο εργαστήριο μικροχημείας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη.

## 4. Κυτοκίνες/ Αναστολείς μονοπατιών επαγόμενα από κυτοκίνες

- Ανασυνδυσασμένος, ανθρώπινος Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1), Rpeprotech (100-21)
- SB-431542: Αναστολέας του Activin receptor-like kinase 5 (ALK5) υποδοχέα, Sigma-Aldrich, S4317
- FR167653: Αναστολέας της p38 Mitogen-Activated protein kinase (MAPK), Astellas Pharma
- U0126: Αναστολέας της MEK MAPKK, Promega, V1121
- Wortmannin: Αναστολέας της phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), Sigma-Aldrich, W1628

## 5. Κυτταρική σειρά

Χρησιμοποιήθηκε η επιθηλιακή κυτταρική σειρά A549 που προέρχεται από ανθρώπινα πνευμονικά (κυψελιδικά) κύτταρα. Η σειρά αγοράστηκε από την DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), ACC 107. Για την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν:

- DMEM με 1,0 g/l D-glucose, Biochrom AG, F0415
- 10% Fetal Bovine Serum (FBS), Biochrom AG, S0115
- 1% διαλύματος πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης, GIBCO, 5070
  
- 2 mM L-glutamine, GIBCO, 25030-024
- Φλάσκες των 25mm<sup>2</sup>, NUNC, 169900
- 6, 12, 24-well πιάτα, NUNC, 140675, 150628, 142475

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης/EDTA, Sigma-Aldrich, T3924 ενώ για το πάγωμα των κυττάρων διάλυμα με 70% DMEM, 20% FBS, 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO), Scharlau Chemis, SU0150 σε αμπούλες του 1,5ml, Sarsted, 72.379.007

## 6. Εκχύλισμα πρωτεϊνών από ζωικό μοντέλο υπερέκφρασης TGF-β1

Το ζωικό μοντέλο υπερέκφρασης TGF-β1 σε ποντίκι δημιουργήθηκε στο κέντρο Ανοσολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών από την ομάδα του Δρ. Πασχάλη Σιδερά και συγκεκριμένα την υποψήφια διδάκτορα, Ειρήνη Αποστόλου. Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος C57BL/6 το οποίο διαμολύνθηκε ενδοταξιακά ή ενδορινικά με ανασυνδυασμένους, με το ανθρώπινο γονίδιο του TGF-β1, αδενοϊούς. Στα κοντρόλ ζώα έγινε διαμόλυνση με αδενοϊούς που είχαν ανασυνδυασθεί με το γονίδιο της Green Fluorescent Protein, GFP βάσει των πειραματικών πρωτόκολλων που περιγράφονται από τους Andrew Bett (Bett et al., 1994), Patricia J. Sime (Sime et al., 1997) και Martin Kolb (Kolb et al., 2002).

## 7. Ζωικό μοντέλο μπλεομυκίνης

Για το μοντέλο της μπλεομυκίνης χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια του στελέχους C57Bl/6, ηλικίας 8-12 εβδομάδων και βάρους 20-25 γραμμαρίων από την Charles River Breeding Laboratories.

- Αναισθητικό: διάλυμα κεταμίνης (300μl), ξυλαζίνης (100μl), ατροπίνης (100μl) σε νερό, σε τελικό όγκο 1500μl. Για κάθε ποντίκι χρησιμοποιήθηκαν 120μl αναισθητικού διαλύματος.
- Μπλεομυκίνη: 150mg/kg μπλεομυκίνης (bleocin, Nippon Kayaku co ltd) σε PBS

## **8. Διάφορα διαλύματα**

**1000 ml Phosphate-buffered saline (PBS) 10x pH 7,4:** 80gr NaCl (Carlo Erba, 479689), 2gr KCl (MERCK, 1.04936.1000), 14,4gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Riedel-de Haen, 30427), 2,4gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba, 471687). Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με την προσθήκη διαλύματος NaOH 10N.

**Αιθανόλη:** Carlo Erba, 414606

**Ξυλόλη:** Carlo Erba, 492306

## **B. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. Επώαση κυτταροκαλλιέργειας με κυτοκίνες και αναστολείς μονοπατιών που επάγονται από κυτοκίνες**

Ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων επιστρώθηκε σε 12-well πλαστικά πιάτα που περιείχαν 1ml θρεπτικού υλικού. Έπειτα από 24 ώρες, έγινε αλλαγή του πλήρους θρεπτικού υλικού, με υλικό που περιείχε 0,1% FBS (serum free θρεπτικό). Την επόμενη ημέρα έγινε επώαση με 5ng/ml TGF-β1 για διάφορα χρονικά διαστήματα. Όλες οι επώσεις με TGF-β1 έγιναν σε serum free θρεπτικό υλικό. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών, πριν την επώαση με τον TGF-β1 προηγήθηκε δίωρη επώαση με τους αναστολείς στις εξείς τελικές συγκεντρώσεις: 10μM FR167653, 10μM SB-431542, 10nM U0126, 100nM Wortmannin.

### **2. Μείωση της έκφρασης της ILK με siRNA**

Σε 12-well πλαστικά πιάτα επιστρώθηκαν 50.000 κύτταρα σε 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Την επομένη, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με το ειδικό θρεπτικό υλικό Optimem και επώαστηκαν με διάλυμα που περιείχε 6μl HiPerFect transfection reagent και 1,25μl siRNA (για την ILK ή μη ειδικό) αρχικής συγκέντρωσης 20mM (ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 25nM) σε Optimem με τελικό όγκο 1ml. Το διάλυμα προστέθηκε στα κύτταρα σταγόνα-σταγόνα αφού πρώτα επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έξι ώρες αργότερα το διάλυμα αντικαταστάθηκε με το πλήρες, φυσιολογικό θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 24 ή 48 ώρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, για αρνητικό κοντρόλ, εκτός από το μη ειδικό siRNA χρησιμοποιήθηκε και σκέτο transfection reagent.

- **Optimem**, GIBCO, 31985
- **HiPerFect** transfection reagent, QIAGEN, 301705



### 3. Απόπτωση

Σε 6-well πλαστικά πιάτα επιστρώθηκαν 100.000 κύτταρα και ακολούθησε μείωση της έκφρασης της ILK με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Σαράντα-οχτώ ώρες μετά την επώαση με το siRNA τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS, αποκολλήθηκαν από τα wells με θρυψίνη και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1000 rpm και επαναδιαλύθηκαν σε 0,5ml PBS. Για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Annexin V-FITC Apoptosis detection kit της Calbiochem (PF032-1EA). Συγκεκριμένα, στα επαναδιαλυμένα κύτταρα προστέθηκαν 10μl Media Binding Reagent και 1,25μl Annexin V-FITC. Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1000 rpm. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 0,5ml binding buffer και προστέθηκαν 10μl Propidium Iodide. 50 μl από τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και φωτογραφήθηκαν τόσο σε απλό όσο και σε μικροσκόπιο φθορισμού. Για την ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 6 φωτογραφίες από κάθε δείγμα στις οποίες μετρήθηκαν τα συνολικά αλλά και τα Annexin V θετικά κύτταρα και η απόπτωση εκφράστηκε ως ο αριθμός των Annexin V θετικών κυττάρων ως προς το σύνολο των κυττάρων επι τοις εκατό.

- Μικροσκόπιο: LEICA DMRA2
- Κάμερα: LEICA DFC 350FX

### 4. Κυτταρική μετανάστευση

Σε 24-well πλαστικά πιάτα επιστρώθηκαν 100.000 κύτταρα και ακολούθησε μείωση της έκφρασης της ILK με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Σαράντα-οχτώ ώρες μετά την επώαση με το siRNA το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με serum free θρεπτικό και με ένα κίτρινο tip χαραχθηκε μία γραμμή κατά μήκος του well καταστρέφοντας τα κύτταρα στην περιοχή, δημιουργώντας ένα κενό (πληγή) μεταξύ των κυττάρων. Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν αμέσως μετά τη δημιουργία της πληγής – χρονικό σημείο μηδέν- καθώς και 24, 48 και 72 ώρες αργότερα. Για την ποσοτικοποίηση του ρυθμού κυτταρικής μετανάστευσης χρησιμοποιήθηκαν 3 φωτογραφίες από κάθε δείγμα ανά χρονικό διάστημα. Οι εκάστοτε τρεις φωτογραφίες κάλυπταν όλο το μήκος της πληγής. Σε κάθε φωτογραφία έγιναν τρεις μετρήσεις της

απόστασης μεταξύ των δύο μετώπων των κυττάρων διαλέγοντας κάθε φορά τρία τυχαία σημεία. Με τον τρόπο αυτό, για κάθε δείγμα προέκυψαν 9 διαφορετικές τιμές σε κάθε χρονικό σημείο. Ο μέσος όρος των 9 αυτών τιμών χρησιμοποιήθηκε για να εκφραστεί η κυτταρική μετανάστευση ως το ποσοστό επί τοις εκατό της πληγής (ή της απόστασης μεταξύ των κυττάρων) που καλύφθηκε από τα κύτταρα.

- Μικροσκόπιο: Zeiss Axiovert 200
- Κάμερα: LEICA DFC 480

## 5. Κυτταρική επέκταση (cell spreading)

Σε 12-well πλαστικά πιάτα επιστρώθηκαν 50.000 κύτταρα και ακολούθησε μείωση της έκφρασης της ILK με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Σαράντα-οχτώ ώρες μετά την επώαση με το siRNA τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τα wells με θρυψίνη και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1000rpm. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξαναεπιστρώθηκαν σε 12-well και φωτογραφήθηκαν –χρονικό σημείο μηδέν. Τα κύτταρα ξαναφωτογραφήθηκαν 30, 60, 90, 120 και 180 λεπτά με την επίστρωση. Για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επέκτασης χρησιμοποιήθηκαν 6 φωτογραφίες από κάθε δείγμα ανά χρονικό διάστημα. Σε κάθε φωτογραφία μετρήθηκε το σύνολο των κυττάρων καθώς και τα κύτταρα που είχαν αρχίσει να επεκτείνονται. Το αποτέλεσμα εκφράστηκε ως ο αριθμός των κυττάρων που είχαν αρχίσει να επεκτείνονται ως προς το σύνολο των κυττάρων επί τοις εκατό. Ως κύτταρα που δεν είχαν αρχίσει να επεκτείνονται χαρακτηρίστηκαν τα κύτταρα που είχαν σφαιρικό σχήμα. Αντίστοιχα, ως κύτταρα που είχαν αρχίσει να επεκτείνονται χαρακτηρίστηκαν κύτταρα που είχαν αρχίσει να αποκτούν ακανόνιστο σχήμα. Για κάθε δείγμα ανά χρονικό διάστημα μετρήθηκαν από 300 ως 600 κύτταρα.

- Μικροσκόπιο: Zeiss Axiovert 200
- Κάμερα: LEICA DFC 480

## 6. Μοντέλο μπλεομυκίνης

Για το ινωτικό μοντέλο της μπλεομυκίνης χρησιμοποιήθηκαν τα ποντίκια του C57BL/6 στελέχους που περιγράφονται παραπάνω. Για κάθε χρονικό διάστημα που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκαν από δύο ως πέντε ζώα. Αφού αναισθητοποιήθηκαν με το κοκτέιλ αναισθητικών, αποκαλύφθηκε η τραχεία χειρουργικά και χορηγήθηκε το διάλυμα της μπλεομυκίνης ενδοτραχειακά μέσω μεταλλικής κάνουλας που προσαρμόστηκε στην τραχεία. Στα κοντρόλ ζώα χορηγήθηκε μόνο διάλυμα PBS. Στη συνέχεια, η κάνουλα αφαιρέθηκε, έγινε συρραφή της τομής και τα ποντίκια αφέθηκαν να αναρρώσουν από την επέμβαση. Τα ζώα θυσιάστηκαν 2, 4, 9, 15 και 23 ημέρες μετά τη χορήγηση της μπλεομυκίνης και απομονώθηκαν οι πνεύμονές τους. Σε όλες τις περιπτώσεις διαχωρίστηκαν οι δεξιοί από τους αριστερούς λοβούς. Οι αριστεροί λοβοί χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογικές χρώσεις. Κατά συνέπεια, μονιμοποιήθηκαν για 24 ως 36 ώρες σε διάλυμα φορμαλίνης 10%, ξεπλύθηκαν με νερό και συντηρήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 50% εωσότου ενσωματώθηκαν σε παραφίνη ώστε να παραχθούν τομές σε μικροτόμο πάχους 5μm. Οι δεξιοί λοβοί χρησιμοποιήθηκαν για εκχύλιση πρωτεϊνών και RNA. Κατά συνέπεια, χωρίστηκαν σε δύο τμήματα, καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

## 7. Εκχύλιση πρωτεϊνών και Western blotting

### I. Εκχύλιση πρωτεϊνών από κυτταρική σειρά

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS, αποκολλήθηκαν από τα wells με απόξεση (scraper) και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 2500rpm στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος λύσης (RIPA buffer) και τοποθετήθηκε σε πάγο για 45 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 12.500rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

- **RIPA buffer:** 50mM Tris-HCl pH 7,4 (AppliChem, 8J004248), 1% NP40 (AppliChem, A1694.0250), 0,25% Sodium Deoxycholate (Sigma-Aldrich, D6750), 150mM NaCl (Carlo Erba, 479689), 1mM Na<sub>2</sub>EDTA (Biomol, 51302), 1mM PMSF (AppliChem, A0999.0100), 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, P8340)

### II. Εκχύλιση πρωτεϊνών από πνευμονικό ιστό

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με μηχανικό ομογενοποιητή σε 500μl διαλύματος λύσης και τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

- **Διάλυμα λύσης:** 50mM Tris-HCl pH 7,4, 1% NP40, 0,25% Sodium Deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 2% Sodium pyrophosphate (Sigma-Aldrich, P8010), 2% NaF (Sigma-Aldrich, 450022), 0,25% Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, S6508), 1mM PMSF, 4% protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich, P8340)

### III. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad, 500-0006). 1μl δείγματος αναμίχθηκε με 99μl H<sub>2</sub>O και 2ml χρωστικής Bradford αραιωμένης σε νερό. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 595nm και η

ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε βάσει πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιώντας διάλυμα BSA γνωστής συγκέντρωσης.

#### IV. Western Blotting

A) Προετοιμασία δειγμάτων: Η επιθυμητή ποσότητα πρωτεΐνης αναμίχθηκε με διάλυμα κατεργασίας δείγματος (sample buffer), DTT και νερό σε τελικό όγκο 20μl και τα δείγματα θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100<sup>0</sup>C.

➤ **Sample buffer (4x):** NuPAGE Sample buffer, Invitrogen, NP007

➤ **DTT (10x):** 1M DTT σε H<sub>2</sub>O, Biochemica, 27565.41-9

B) Western blotting: Αρχικά τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%. Για την παρασκευή της πηκτής για την χρησιμοποιήθηκε συσκευή της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel) αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel). Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η οποία πληρώθηκε με 1x διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα και το gel ηλεκτροφορήθηκε στα 150V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή μεταφέρθηκε σε ειδική συσκευή για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham, RPN203D). Στη θήκη τοποθετήθηκαν με τη σειρά 2 χαρτιά Wattman, η νιτροκυτταρίνη, το gel και τέλος άλλα 2 χαρτιά Wattman αφού όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη, η ειδική συσκευή τοποθετήθηκε στη συσκευή για μεταφορά (Invitrogen). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 30V, 160mA για 70λεπτά. Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau (Alter Chem, P0004) μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα και δούμε ότι όντως έγινε μεταφορά πρωτεϊνών. Έπειτα η μεμβράνη ξεπλύθηκε με νερό και επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου

υπό συνεχή ανάδευση σε διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer). Ακολούθησε επώαση με τα εκάστοτε πρώτα αντισώματα διαλυμένα σε blocking buffer, στους 4<sup>0</sup>C, overnight, υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη μέρα, ακολούθησαν 2 ξεπλύματα με διάλυμα TBS-Tween20 0,05% και επώαση με τα δεύτερα αντισώματα, διαλυμένα σε blocking buffer, για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Για την εμφάνιση της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε το Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, NEL103) με φωτογραφικά φιλμ της FUJIFILM. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με σκανάρισμα των φιλμ με το GS-800 calibrated densitometer της BioRad και ανάλυσή τους με το Quantity One image processing software (BioRad). Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε αναγωγή των αποτελεσμάτων στη β-actin που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό κοντρόλ.

- **Separating gel:** 2ml H<sub>2</sub>O, 1,65ml 30% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (BioRad), 1,25ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8 (AppliChem, 8J004248), 50μl 10%SDS (Sigma-Aldrich, L-4509), 50μl APS 100mg/ml (AppliChem, 7727-24-0), 2μl TEMED (Applichem110-18-9)
- **Stacking gel:** 2,7ml H<sub>2</sub>O, 0,67ml 30% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (BioRad), 0,5ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 40μl 10%SDS, 40μl APS 100mg/ml, 4μl TEMED
- **Running buffer (1l, 5x):** 94g Glycine (ROTH, 3908.3), 15g Tris-base, 50ml 10% SDS, H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 1l.
- **Transfer buffer (1l, 10x):** 144,1g Glycine, 30,3g Tris-base, H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 1l. Κατά τη χρήση προσθέτουμε μεθανόλη σε αναλογία 10%
- **Blocking buffer: 5% γάλα σε TBS-Tween20 0,05%**
- **TBS pH 7,4 (10x):** 1,37M NaCl (Carlo Erba, 479689), 27mM KCl (MERCK, 1.04936.1000), 25mM Tris-base
- **Tween20:** AppliChem, A1389.0500

## **8. Εκχύλιση RNA και Real time RT PCR**

### **I. Εκχύλιση RNA από πνευμονικό ιστό**

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με μηχανικό ομογενοποιητή και η εκχύλιση του συνολικού RNA έγινε με το NucleoSpin kit της Macherey-Nagel (740955.50) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

### **II. Σύνθεση cDNA**

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκαν 2μg RNA. Η σύνθεση έγινε με το SuperScript II RT kit της Invitrogen (18064-022) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

### **III. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των primers για το γονίδιο της ILK έγινε PCR. Χρησιμοποιήθηκε το cDNA που συντέθηκε από 2μg RNA σε αραιώση 1:10

**Αντίδραση:** 1μl forward primer (10pmol/μl)

1μl reverse primer (10pmol/μl)

2,5μl PCR buffer (10x)

1μl dNTPs (2mM)

0,5μl Vent polymerase (New England Biolabs, MO254S)

1μl cDNA

### **IV. Real time PCR**

Για τη Real time PCR χρησιμοποιήθηκε το cDNA που συντέθηκε από 2μg RNA σε αραιώση 1:10. Ως εσωτερικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο του 18S rRNA.

**Αντίδραση:** 0,5μl forward primer (10pmol/μl)

0,5μl reverse primer (10pmol/μl)

2μl cDNA

10μl SYBR GreenER SuperMix (Invitrogen, 11762-100)

7μl H<sub>2</sub>O

**Συνθήκες:** 52<sup>0</sup>C για 2 λεπτά, 95<sup>0</sup>C για 2 λεπτά, 49 κύκλοι με: 95<sup>0</sup>C για 15 δευτερόλεπτα, 60<sup>0</sup>C για 40 δευτερόλεπτα (plate reading) ακολουθούμενοι από melting curve analysis από τους 55<sup>0</sup>C ως τους 99<sup>0</sup>C με μετρήσεις κάθε 0,5<sup>0</sup>C. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA της ILK έγινε με τη ΔΔCt μέθοδο.

## 9. Χρώση κολλαγόνου με τη χρωστική Picro-sirius red

Τομές πνευμονικού ιστού σκηνωμένου σε παραφίνη πάχους 5μm, χρησιμοποιήθηκαν για χρώση με τη χρωστική Picro-sirius red. Αρχικά οι τομές αποπαραφινώθηκαν με θέρμανση στους 65<sup>0</sup>C για 10 λεπτά και ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε διαλύματα: ξυλόλης για 15 λεπτά, 100% αιθανόλης για 3 λεπτά, 90% αιθανόλης για 3 λεπτά, 70% αιθανόλης για 3 λεπτά, H<sub>2</sub>O για 2 λεπτά. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετήθηκαν στο διάλυμα A για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλύθηκαν 2 φορές στο διάλυμα B. Τέλος, οι τομές αφυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε 3 διαλύματα 100% αιθανόλης για 3 λεπτά και διάλυμα ξυλόλης για 1 λεπτό.

- **Διάλυμα A:** 0,5g Picro-sirius red F3B (Science Lab.com, SLS1171) σε 500ml υδατικού διαλύματος πικρικού οξέος
- **Διάλυμα B:** 5ml οξικού οξέος σε 1l H<sub>2</sub>O



## 10. Ανοσοϊστοχημική χρώση

Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν τομές πνευμονικού ιστού σκηνωμένου σε παραφίνη πάχους 5μm. Αρχικά οι τομές αποπαραφινώθηκαν με θέρμανση στους 65<sup>0</sup>C για 10 λεπτά και ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε διαλύματα: ξυλόλης για 15 λεπτά (2x), 100% αιθανόλης για 3 λεπτά (2x), 90% αιθανόλης για 3 λεπτά, 70% αιθανόλης για 3 λεπτά, dH<sub>2</sub>O για 3 λεπτά, PBS για 3 λεπτά. Ακολούθησε απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών σε διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν σε PBS (2x 15 λεπτά) και επώαστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01M για 10 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων στα 400W. Οι τομές αφέθηκαν να κρυώσουν και αφού επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησαν ξεπλύματα με PBS (2x10 λεπτά) και επώαση με διάλυμα μπλοκαρίσματος (Background Block solution, Cell Merque, CMX200) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε επώαση με τα πρώτα αντισώματα διαλυμένα σε PBS ή με IgG ίδιας συγκέντρωσης και προέλευσης με το εκάστοτε αντίσωμα, για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν ξεπλύματα με PBS (3x10 λεπτά) και επώαση με τα δεύτερα αντισώματα διαλυμένα σε PBS για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από ένα ξέπλυμα με PBS ακολούθησε η αντίδραση ειδικής χρώσης με τη χρωμοφόρο ένωση 3', 3' diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, SK-4100) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθησε χρώση των τομών με αιματοξυλίνη (BDH, 351946T) για 15 δευτερόλεπτα και αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαλύματα: 70% αιθανόλης για 5 λεπτά, 90% αιθανόλης για 3 λεπτά, 100% αιθανόλης για 3 λεπτά (2x), ξυλόλης για 2 λεπτά. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με κάλυψη με καλυπτρίδα με την ειδική μονιμοποιητική κόλλα DPX (BDH, 360294H).

- **Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** 2,5ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka, 95313) σε μεθανόλη σε τελικό όγκο 50ml

## 11. Ανοσοφθορισμός

### I. Κυτταρική καλλιέργεια

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 24-well πλαστικά πιάτα στον πυθμένα των οποίων είχαν τοποθετηθεί καλυπτρίδες (VWR, 631-0170) που είχαν επικαλυφθεί με πολυλυσίνη. Έπειτα από την όποια πειραματική διεργασία, οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν, ξεπλύθηκαν με PBS (3x) και τοποθετήθηκαν σε parafilm στο οποίο είχαν τοποθετηθεί σταγόνες (30μl) διαλύματος παραφορμαλδεΰδης 4% σε PBS (AppliChem, 30525-89-4) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν σε PBS και τοποθετήθηκαν σε σταγόνες blocking buffer για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με πρώτα αντισώματα, διαλυμένα σε PBS, overnight στους 4<sup>0</sup>C. Την επομένη, οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS (3x) και επώαστηκαν με δεύτερα αντισώματα, διαλυμένα σε PBS, για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS και δεκάλεπτη επώαση με DAPI (Calbiochem, 268298) στο σκοτάδι. Τέλος οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες όπου μονιμοποιήθηκαν με γλυκερόλη.

- **Blocking buffer:** 5% FBS, 0,2% Triton X-100, AppliChem, A1388.0500 σε PBS
- **Επικάλυψη πολυλυσίνης:** εμβαπτίζουμε τις καλυπτρίδες σε διάλυμα πολυλυσίνης 1mg/ml (Chemilab, P1274) overnight. Ξεπλένουμε με νερό και τις αφήνουμε σε νερό για 24 ώρες. Ξεπλένουμε με νερό και τις αφήνουμε ξανά σε νερό για 24 ώρες. Ξεπλένουμε με νερό και αφήνουμε να στεγνώσουν overnight. Αποστειρώνουμε σε κλίβανο και αποθηκεύουμε.
- **DAPI:** 1μl DAPI σε 2,5ml PBS

### II. Πνευμονικός ιστός

Χρησιμοποιήθηκαν τομές πνευμονικού σκηνωμένου σε παραφίνη, πάχους 5μm. Αρχικά οι τομές αποπαραφινώθηκαν με θέρμανση στους 65<sup>0</sup>C για 10 λεπτά και ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε διαλύματα: ξυλόλης για 15 λεπτά (2x), 100% αιθανόλης για 3 λεπτά (2x), 90% αιθανόλης για 3 λεπτά, 70% αιθανόλης για 3 λεπτά,

PBS για 3 λεπτά. Στη συνέχεια οι τομές επώαστηκαν με διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01M για 20 λεπτά στους 80<sup>0</sup>C και αφέθηκαν να κρυώσουν. Αφού επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, έγιναν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα με PBS και ακολούθησε επώαση με blocking buffer για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με πρώτα αντισώματα διαλυμένα σε PBS ή σκέτο PBS για αρνητικό κοντρόλ, στους 4<sup>0</sup>C overnight. Την επομένη, έγιναν 3 δεκάλεπτα ξεπλύματα σε PBS και οι τομές επώαστηκαν με τα δεύτερα αντισώματα διαλυμένα σε PBS για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Ακολούθησαν ξεπλύματα με PBS και επώαση με DAPI για 10 λεπτά στο σκοτάδι. Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν με PBS και ακολούθησε αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαλύματα: 70% αιθανόλης για 5 λεπτά, 90% αιθανόλης για 3 λεπτά, 100% αιθανόλης για 3 λεπτά (2x), ξυλόλης για 2 λεπτά. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με κάλυψη με καλυπτρίδα με την ειδική μονιμοποιητική κόλλα DPX (BDH, 360294H).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

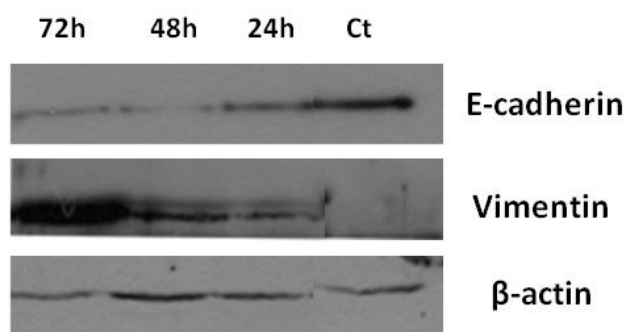
## A. IN VITRO

Στα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα τύπου II της σειράς A549. Η επιλογή αυτή έγινε λόγω του ότι τα τύπου II κύτταρα είναι ο πολυπληθέστερος κυτταρικός πληθυσμός στον πνεύμονα ενώ βρίσκονται στις δομές (κυψελίδες) όπου επιτελείται η βασική λειτουργία των πνευμόνων, η ανταλλαγή αερίων. Επίσης, έχει προταθεί ότι τα κύτταρα τύπου II παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και την εξέλιξη της ίνωσης (*Selman and Pardo, 2003, Chilosi et al., 2003*) ενώ σε απόκριση σε διάφορα παθογόνα ερεθίσματα που μπορούν να προκαλέσουν και ίνωση, τα κύτταρα τύπου II είναι αυτά που ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε κύτταρα τύπου I προσπαθώντας να επιδιορθώσουν το κατεστραμμένο επιθήλιο (*Rennard et al., 2008*).

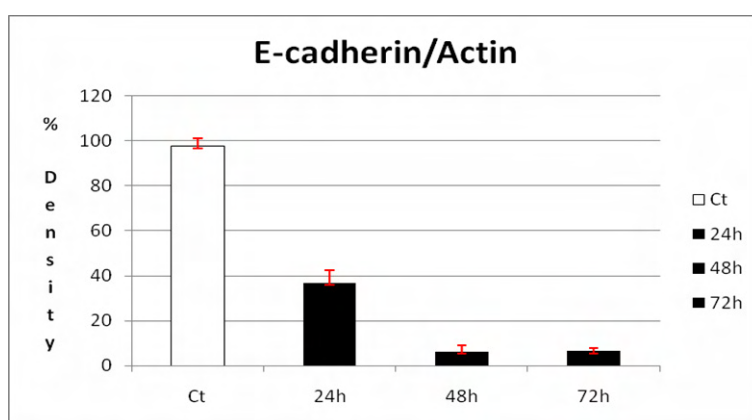
### 1. Επαγωγή ινωτικών χαρακτηριστικών και EMT σε A549 κύτταρα

Για την επαγωγή ινωτικών χαρακτηριστικών και EMT στα επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επώασης των κυττάρων με ανθρώπινο TGF-β1. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν έως ότου κάλυψαν το 70% της επιφάνειας καλλιέργειας και ακολούθησε στέρηση ορού για 24 ώρες. Κατόπιν, έγινε επώαση με TGF-β1 για 24, 48 και 72 ώρες. Στα χρονικά διαστήματα αυτά ποσοτικοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες E-καντερίνη (E-cadherin) και βιμεντίνη (vimentin). Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιούνται ως δείκτες του EMT με την E-καντερίνη να μειώνεται (ως επιθηλιακός δείκτης) και τη βιμεντίνη να αυξάνεται (ως μεσεγχυματικός δείκτης) όταν συμβαίνει EMT. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η E-καντερίνη αρχίζει και μειώνεται από τις 24 ώρες και φτάνει στα κατώτατα επίπεδα στις 48 ώρες. Αντίστοιχα, η βιμεντίνη που είναι μη ανιχνεύσιμη στα κοντρόλ κύτταρα αυξάνεται στις 24 ώρες και φτάνει στο μέγιστο στις 72 ώρες (εικ. 12, διάγραμμα 1, 2). Παράλληλα, επειδή το EMT συνοδεύεται από αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν έπειτα από επώαση με TGF-β για 48 ώρες (εικ. 13). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι έπειτα από 48 ώρες καλλιέργειας με TGF-β, τα επιθηλιακά κύτταρα αρχίζουν και χάνουν τη στενή διασύνδεση με τα γειτονικά τους κύτταρα ενώ ταυτόχρονα αποκτούν ατρακτοειδές σχήμα που είναι χαρακτηριστικό των ινοβλαστών (13β). Τέλος, επειδή εκτός από το EMT ο TGF-β επάγει και ινωτικά χαρακτηριστικά στα επιθηλιακά κύτταρα, μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό η έκφραση

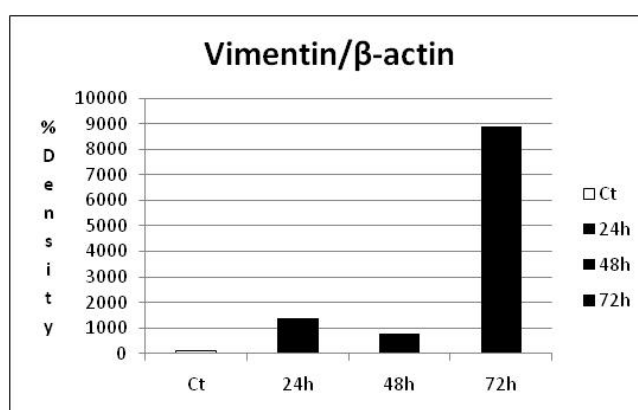
δύο κλασικών ιωτικών πρωτεϊνών, της ιωδονεκτίνης (fibronectin), (14 γ, δ) και της  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA), (14α, β). Όπως φαίνεται στην εικόνα οι δύο πρωτεΐνες είναι πρακτικά μη ανιχνεύσιμες στα κοντρόλ κύτταρα (14α, γ). Αντίθετα, η επώαση με TGF- $\beta$  για 48 ώρες αυξάνει δραματικά την έκφρασή τους (εικ. 14β, δ).



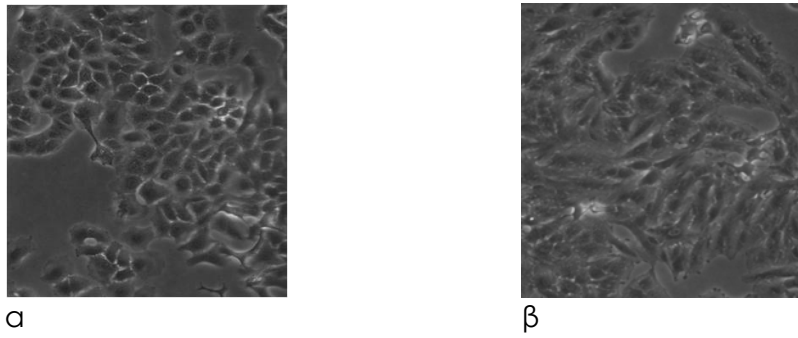
**Εικόνα 12:** Ο TGF-β επάγει το EMT στα επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα. Ανάλυση κατά western για την E-καντερίνη και τη βιμεντίνη έπειτα από επώαση με TGF-β1 για 24, 48 και 72 ώρες. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



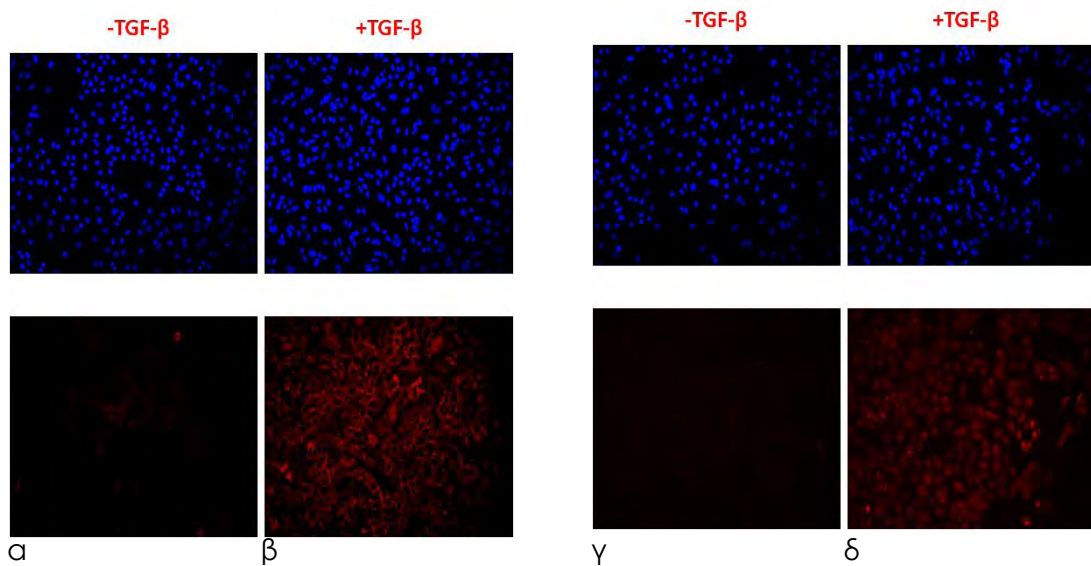
**Διάγραμμα 1:** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της E-καντερίνης. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα ± η τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 2:** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της βιμεντίνης. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης.



**Εικόνα 13:** Ο TGF- $\beta$  επάγει την αλλαγή σχήματος στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (α) διατηρούν στενή επαφή με τα γειτονικά τους κύτταρα. Έπειτα από 48 ώρες επώαση με TGF- $\beta$  (β) τα κύτταρα χάνουν τη στενή μεταξύ τους διασύνδεση και αποκτούν

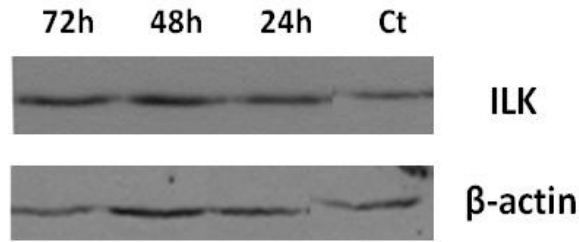


**Εικόνα 14:** Ο TGF- $\beta$  επάγει την έκφραση ινωτικών δεικτών στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Στα φυσιολογικά κύτταρα η  $\alpha$ -SMA (α) και η ινωδονεκτίνη ( $\gamma$ ) είναι πρακτικά ανιχνεύσιμες. Έπειτα από 48 ώρες επώαση με TGF- $\beta$  παρατηρείται δραματική αύξηση τόσο της  $\alpha$ SMA (β) όσο και της

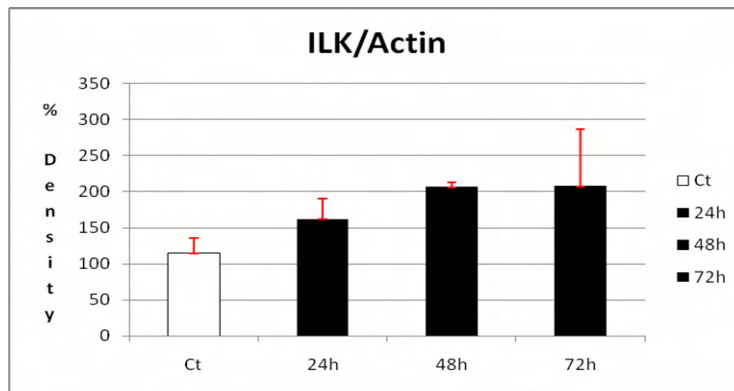


## **2. Η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF-β**

Αφού δείξαμε ότι ο TGF-β επάγει ινωτικά χαρακτηριστικά και EMT στα A549 κύτταρα, το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε την επίδραση του TGF-β στην ILK. Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική που χρησιμοποιήσαμε για τη μελέτη των δεικτών του EMT, εξετάσαμε την έκφραση της ILK έπειτα από επώαση με TGF-β για 24, 48 και 72 ώρες (εικ. 15). Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF-β (διάγραμμα 3) κάτι που είναι σύμφωνο με αποτελέσματα από τις περισσότερες κυτταρικές σειρές στις οποίες έχει μελετηθεί η ILK. Η αύξηση της ILK φαίνεται να είναι ανάλογη του χρόνου. Εν τούτοις, επειδή τόσο οι ινωτικοί δείκτες αλλά και η ILK είχαν την αναμενόμενη απόκριση και στις 48 ώρες, για λόγους πειραματικής ευκολίας το διάστημα των 48 ωρών ήταν αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην πλειονότητα των πειραμάτων που ακολούθησαν.



**Εικόνα 15:** Ανάλυση κατά western για την ILK έπειτα από επώαση με TGF- $\beta$  για 24, 48 και 72 ώρες. Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη



**Διάγραμμα 3:** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της  $\beta$ -ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα  $\pm$  η τυπική απόκλιση.

### 3. Ο TGF-β επάγει την αύξηση της ILK μέσω ενός smad2/3-εξαρτώμενου μηχανισμού

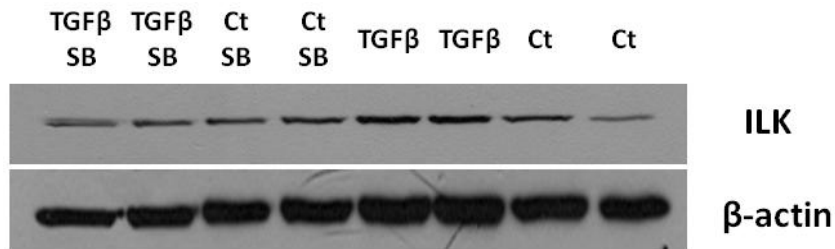
Ο TGF-β είναι ένας παράγοντας που εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών. Το τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης του TGF-β είναι η επαγωγή ή η αναστολή της έκφρασης γονιδίων. Η σηματοδότηση του TGF-β μεσολαβείται από διάφορους ενδοκυττάριους μεσολαβητές. Οι κυριότεροι είναι οι πρωτεΐνες smad2/3 αλλά υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση του TGF-β και οι οποίοι χαρακτηρίζονται συνολικά ως non-smad παράγοντες (*Moustakas and Heldin, 2005*). Για να εντοπίσουμε το/τα σηματοδοτικό/ά μονοπάτι/ια μέσω των οποίων ο TGF-β επάγει την αύξηση της ILK χρησιμοποιήσαμε ειδικούς χημικούς αναστολείς εναντίον πιθανών μονοπατιών στόχων του TGF-β. Για το μονοπάτι των smad2/3 χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας SB-431542 που είναι αναστολέας του υποδοχέα ALK5 του TGF-β ο οποίος ενεργοποιεί τα smad2/3. Επειδή ο TGF-β ενεργοποιεί τις Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς εναντίον της erk1/2 (U0126) και της p38 (FR167653) MAPK. Τέλος, επειδή έχει προταθεί ότι ο TGF-β μπορεί να επάγει την ILK μέσω ενός Pi3k-εξαρτώμενο μηχανισμό (*Lee et al., 2004*) χρησιμοποιήθηκε και ο αναστολέας της Pi3k γουορτμανίνη (wortmannin).

**Πίνακας 5: Χημικοί αναστολείς των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τον TGF-β και οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν.**

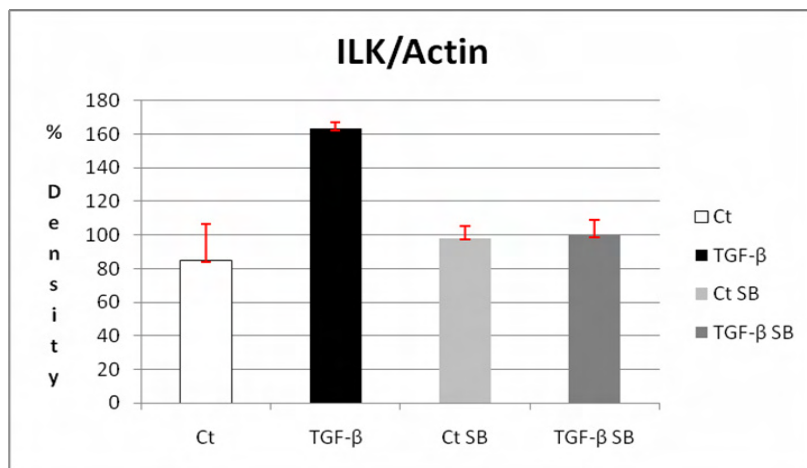
Όνομα	Στόχος	Συγκέντρωση
<b>SB-431542</b>	ALK5 (smad2/3)	10μM
<b>U0126</b>	MEK1/2 (erk1/2)	10nM
<b>FR167653</b>	p38	10μM
<b>Wortmannin</b>	Pi3k	100nM

Σε όλα τα πειράματα με τους διάφορους αναστολείς τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου καλύψουν το 70% της επιφάνειας καλλιέργειας. Ακολούθησε στέρηση ορού για 24 ώρες και επώαση με τον κάθε αναστολέα για 2 ώρες. Μετά το πέρας των δύο

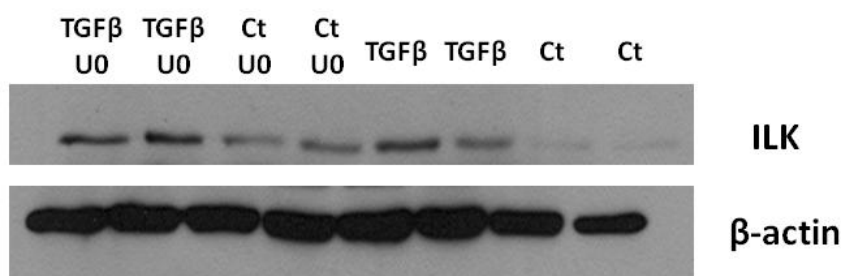
ωρών ακολούθησε επώαση με τον TGF-β για 48 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, η επώαση με τον αναστολέα των smad2/3 έχει ως αποτέλεσμα τη μη αύξηση της ILK. Αντίθετα, η επώαση με τους αναστολείς των erk1/2, Pi3k και p38 και (εικόνες 17, 18 και 19 αντίστοιχα) δεν επηρεάζει τη δράση του TGF-β αφού η ILK αυξάνεται σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με αντίστοιχα αποτελέσματα στο νεφρικό EMT (*Li et al., 2003*).



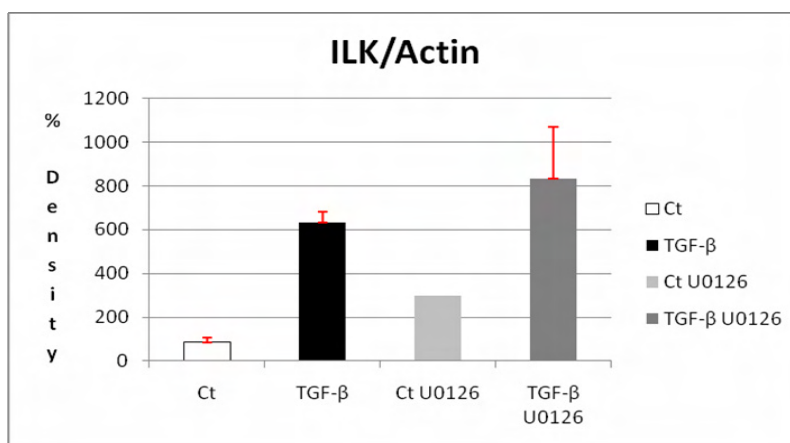
Εικόνα 16: Ο TGF-β επάγει την αύξηση της ILK μέσω ενός smad-dependent μηχανισμού. Η αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF-β (ζώνες 3,4 από δεξιά) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (ζώνες 1,2 από δεξιά) αναστέλλεται παρουσία του αναστολέα (ζώνες 7,8 από δεξιά). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



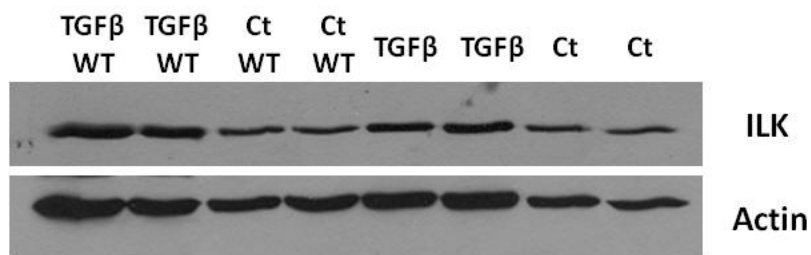
Διάγραμμα 4: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK παρουσία ή απουσία αναστολέα των smad2/3. Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από τα δύο ανεξάρτητα δείγματα ± η τυπική απόκλιση.



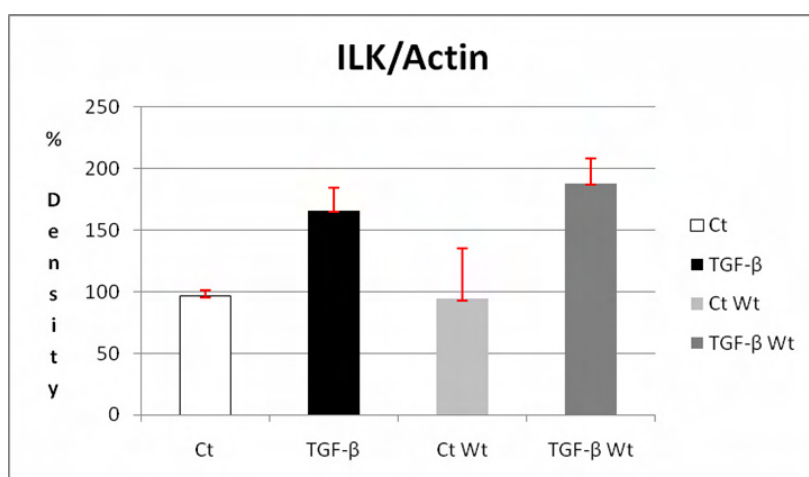
Εικόνα 17: Η επαγωγή της ILK από τον TGF-β δεν μεσολαβείται από την erk. Η αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF-β (ζώνες 3,4 από δεξιά) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (ζώνες 1,2 από δεξιά) διατηρείται παρουσία του αναστολέα (ζώνες 7,8 από δεξιά) ο οποίος φαίνεται να αυξάνει ως ένα σημείο τα επίπεδα της ILK στα κοντρόλ κύτταρα (ζώνες 5,6 ). Η β-ακτίνη



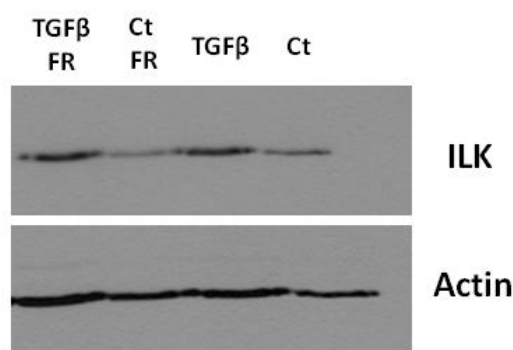
Διάγραμμα 5: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK παρουσία ή απουσία αναστολέα των erk1/2. Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από τα δύο ανεξάρτητα δείγματα ± η τυπική απόκλιση.



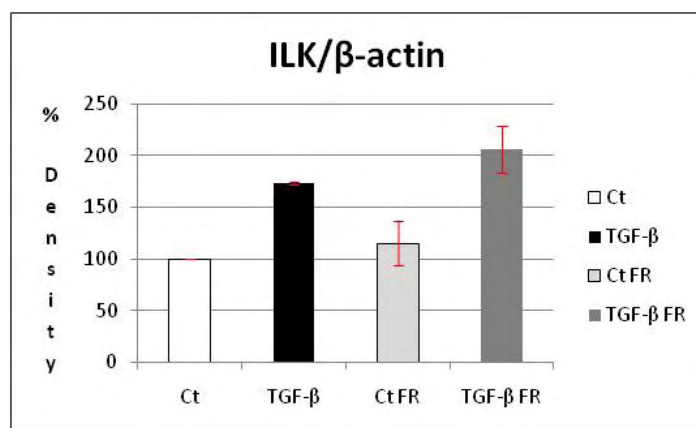
Εικόνα 18: Η επαγωγή της ILK από τον TGF- $\beta$  δεν μεσολαβείται από την Pi3k. Η αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF- $\beta$  (ζώνες 3,4 από δεξιά) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (ζώνες 1,2 από δεξιά) διατηρείται παρουσία του αναστολέα (ζώνες 7,8 από δεξιά). Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



Διάγραμμα 6: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK παρουσία ή απουσία αναστολέα των Pi3k. Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της  $\beta$ -ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από τα δύο ανεξάρτητα δείγματα  $\pm$  η τυπική απόκλιση.



Εικόνα 19: Η αύξηση της ILK από τον TGF-β δεν μεσολαβείται από την p38 MAPK αφού η παρουσία του αναστολέα (ζώνη 4 από δεξιά) δεν επηρεάζει την αύξηση της ILK σε απόκριση στον TGF-β (ζώνη 2 από δεξιά). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



Διάγραμμα 7: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK παρουσία ή απουσία αναστολέα της p38 MAPK. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα ± η τυπική απόκλιση. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης.

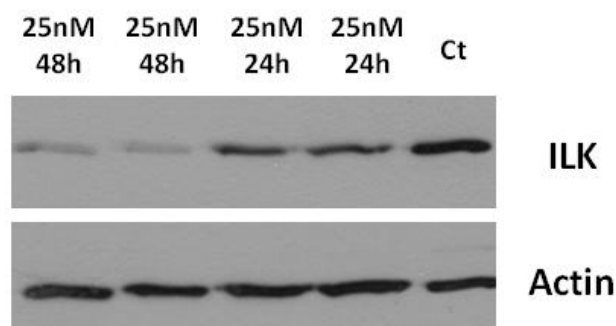


#### 4. ILK και κυψελιδικό EMT

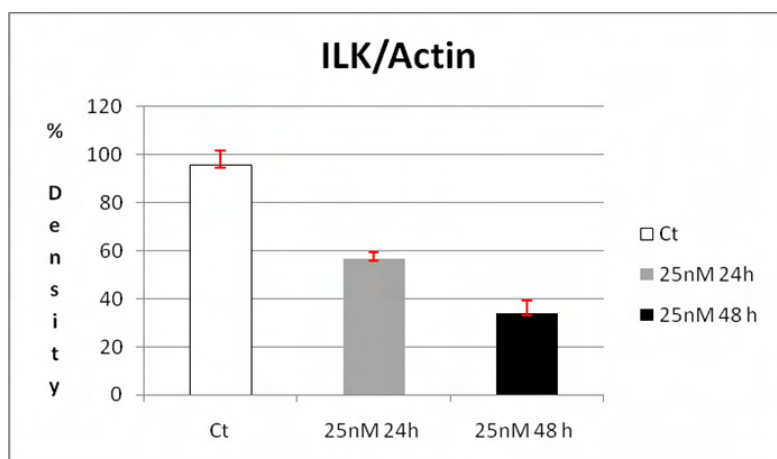
Αφού δείξαμε ότι ο TGF-β επάγει την αύξηση της ILK στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μέσω ενός smad-εξαρτώμενου μηχανισμού, ασχοληθήκαμε με το ρόλο της ILK στο κυψελιδικό EMT. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του siRNA. Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου καλύψουν το 50% της επιφάνειας καλλιέργειας και ακολούθησε επώαση με ειδικό siRNA για την ILK που από εδώ και πέρα θα αποκαλείται **siILK** για 24 και 48 ώρες. Η τελική συγκέντρωση του siILK ήταν 25nM. Βάσει των αποτελεσμάτων μας (εικ. 20) αποφασίσαμε ότι τα υπόλοιπα πειράματα με το siILK θα γινόταν έπειτα από επώαση 48 ωρών.

Για να εξετάσουμε το αν και κατά πόσο η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση του EMT συνδυάσαμε την τεχνική του siRNA με την επαγωγή του EMT από τον TGF-β. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου κάλυψαν το 50% της επιφάνειας καλλιέργειας και στη συνέχεια έγινε επώαση με siILK για 48 ώρες. Σαν κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε siRNA αλλά και κύτταρα που επώαστηκαν με μη ειδικό siRNA (scramble siRNA). Ακολούθησε στέρηση ορού για 12 ώρες και επώαση με TGF-β για 48 επιπλέον ώρες. Τα αποτελέσματά μας (εικ. 21) δείχνουν ότι η ILK αυξάνεται παρουσία TGF-β αλλά η επώαση με siILK οδηγεί σε δραματική μείωση των επιπέδων της ILK που δεν μπορούν να αντισταθμιστούν ούτε από την παρουσία του TGF-β. Για να διαπιστώσουμε αν η ILK εμπλέκεται στην έναρξη του EMT ελέγξαμε τα επίπεδα της E-καντερίνης, η μείωση της οποίας σηματοδοτεί την έναρξη του φαινομένου. Σύμφωνα με την εικόνα 21, η απώλεια της ILK δεν επηρεάζει τη δράση του TGF-β στα επίπεδα της E-καντερίνης τα οποία παραμένουν πολύ μειωμένα σε σχέση με τα κοντρόλ κύτταρα. Παράλληλα μελετήθηκε και η έκφραση της βιμεντίνης που είναι μεσεγγυματικός δείκτης και εμπλέκεται σε μεταγενέστερα στάδια του EMT. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι **η μείωση της ILK επηρεάζει σε ένα βαθμό την αύξηση της βιμεντίνης που παρατηρείται κατά το EMT** αφού στα κύτταρα που είχε μειωθεί η ILK, η αύξηση της βιμεντίνης σε απόκριση στον TGF-β μειώθηκε περίπου κατά το ήμισυ (διάγραμμα 9). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι, σε αντίθεση με τη νεφρική ίνωση, **η ILK δεν μεσολαβεί το εναρκτήριο βήμα του EMT αφού δεν επηρεάζει την έκφραση της E-καντερίνης αλλά είναι πολύ πιθανό να εμπλέκεται σε μεταγενέστερα στάδια**

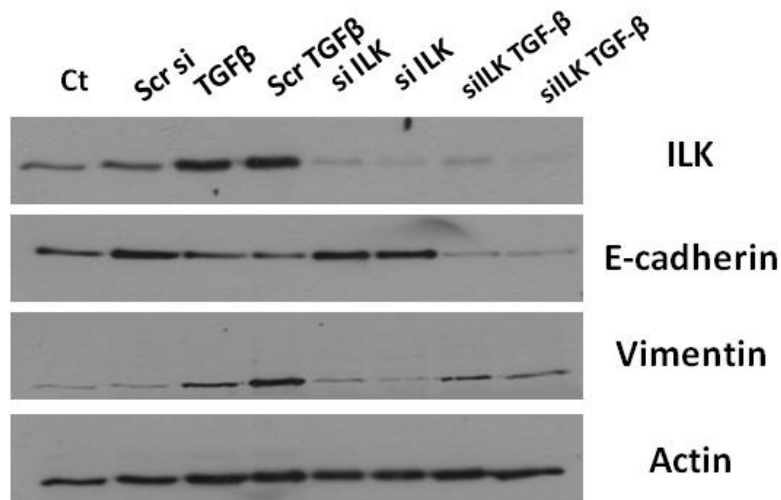
αφού ελέγχει, έστω και μερικώς, τα επίπεδα της βιμεντίνης που σχετίζεται κυρίως με την κυτταρική μετανάστευση (Paccione *et al.*, 2008).



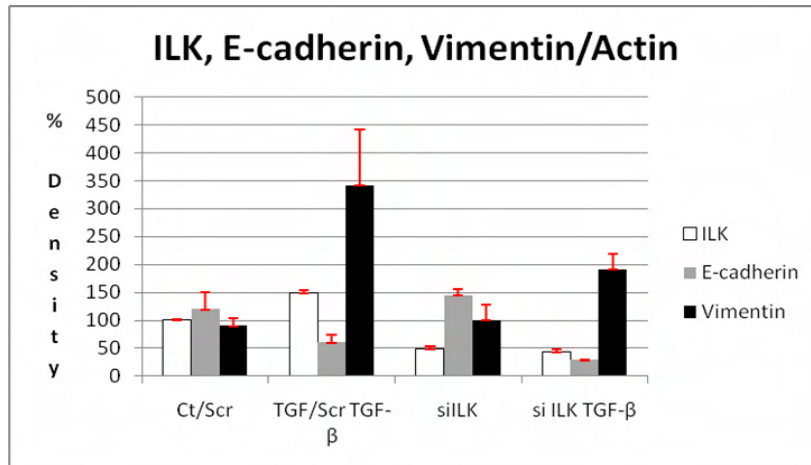
Εικόνα 20: Μείωση των επιπέδων της ILK με τη μέθοδο του siRNA. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς .



Διάγραμμα 8: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK παρουσία ή απουσία siRNA για την ILK. Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα  $\pm$  η τυπική απόκλιση.



Εικόνα 21: Ο ρόλος της ILK στο κυψελιδικό EMT. Η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF-β (ζώνες 3,4 από αριστερά) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες που αποτελούνται από κύτταρα που έχουν επωαστεί με μη ειδικό siRNA (ζώνη 2 από αριστερά) και από μη κατεργασμένα κύτταρα (ζώνη 1 από αριστερά). Η κατεργασία των κυττάρων με siILK οδηγεί σε δραματική μείωση της ILK τόσο παρουσία όσο και απουσία TGF-β (ζώνες 5-8). Η μείωση της ILK δεν επηρεάζει τη μείωση της E-καντερίνης από τον TGF-β (ζώνες 7,8 από αριστερά). Αντίθετα, η αύξηση της βιμεντίνης σε απόκριση στον TGF-β επηρεάζεται από την απουσία της ILK αφού απουσία ILK (ζώνες 7,8) η αύξηση της βιμεντίνης είναι σημαντικά μικρότερη απ' ότι παρουσία της ILK (ζώνες 3,4). Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-



Διάγραμμα 9: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των ILK, E-καντερίνη και βιμεντίνη παρουσία ή απουσία siILK και TGF-β. Το κάθε δείγμα παρουσιάζεται εις διπλούν. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τιμών από τα δύο ανεξάρτητα δείγματα ± η τυπική απόκλιση

## 5. Επιπτώσεις της αποσιώπησης της ILK σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες

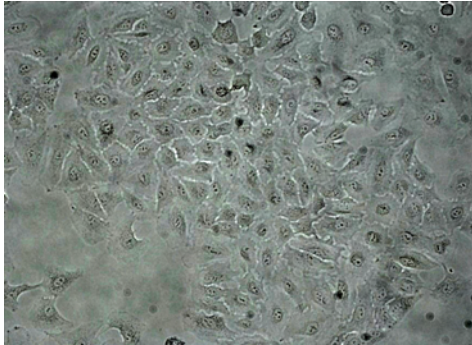
Εκτός από το ρόλο της ILK, η τεχνική του siRNA χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί το κατά πόσο η απουσία της ILK επηρεάζει θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, η κίνηση, η κυτταρική εξάπλωση (cell spreading) και η απόπτωση.

**Κυτταρικό σχήμα:** Για τον έλεγχο της επίδρασης της μείωσης της ILK στο κυτταρικό σχήμα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου κάλυψαν το 50% της επιφάνειας καλλιέργειας και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες με το siILK. Όπως φαίνεται στη φωτογραφία 22α, τα κύτταρα μάρτυρες είναι στενά συνδεδεμένα το ένα με το άλλο. Απουσία ILK (εικ. 22β) τα κύτταρα αρχίζουν και χάνουν τις μεταξύ τους διασυνδέσεις ενώ παρατηρούνται αλλαγές και στο σχήμα τους αποτέλεσμα που σημαίνει ότι η ILK είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του φυσιολογικού σχήματος.

**Κυτταρική εξάπλωση:** Για τον έλεγχο της επίδρασης της ILK στην κυτταρική εξάπλωση χρησιμοποιήθηκαν οι πειραματικές συνθήκες του ελέγχου του κυτταρικού σχήματος. Μετά τις 48 ώρες επώασης με το siILK, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τις επιφάνειες καλλιέργειας και τοποθετήθηκαν σε νέες. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι απουσία της ILK (εικ. 23β), τα κύτταρα διατηρούν ένα σφαιρικό σχήμα για περισσότερη ώρα απ' ό,τι τα κύτταρα στα οποία υπάρχει ILK (εικ. 23α) τα οποία σε σύντομο χρονικό διάστημα αρχίζουν και εξαπλώνονται στην επιφάνεια καλλιέργειας. Με την πάροδο του χρόνου (διάγραμμα 10) το φαινόμενο γίνεται όλο και πιο έντονο.

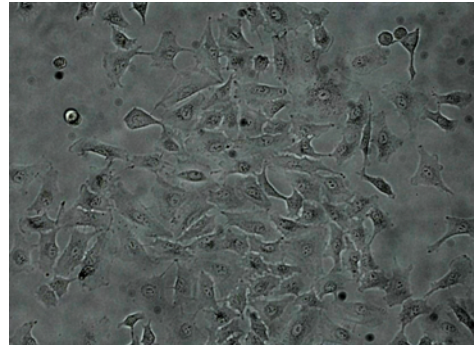
**Κυτταρική μετανάστευση:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες με τα δύο προηγούμενα πειράματα. Μετά την επώαση με το siILK δημιουργήθηκε κενό μεταξύ των κυττάρων και παρακολούθηθηκε η πορεία κλεισίματος του κενού. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ενώ στα κύτταρα μάρτυρες (εικ. 24β), μετά από 72 ώρες το κενό μεταξύ των κυττάρων είχε σχεδόν καλυφθεί, στα κύτταρα στα οποία απουσίαζε η ILK (εικ. 24δ) το κλείσιμο του κενού είχε καθυστερήσει σημαντικά κάτι που υποδηλώνει ότι η ILK είναι απαραίτητη για την κυτταρική μετανάστευση.

**Κύτταρα μάρτυρες**



**α**

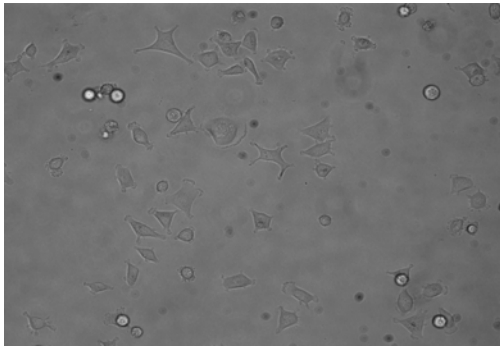
**48 ώρες TGF-β**



**β**

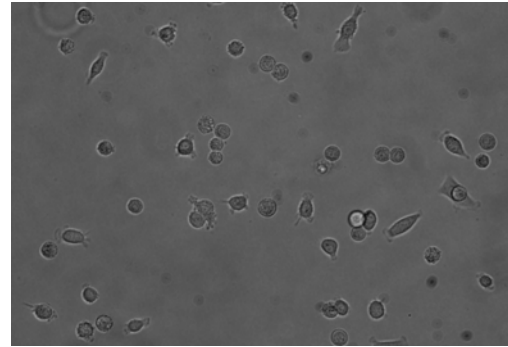
**Εικόνα 22: Επίδραση της μείωσης της ILK στο κυτταρικό σχήμα. Τα κύτταρα μάρτυρες (α) διατηρούν στενή επαφή μεταξύ τους. Στα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK (β) τα κύτταρα αρχίζουν και χάνουν τη μεταξύ τους διασύνδεση. Το σχήμα των κυττάρων στα οποία έχει μειωθεί η ILK είναι ακανόνιστο και διαφέρει από τη συμπαγή, πλακώδη εικόνα των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων.**

Κύτταρα μάρτυρες,



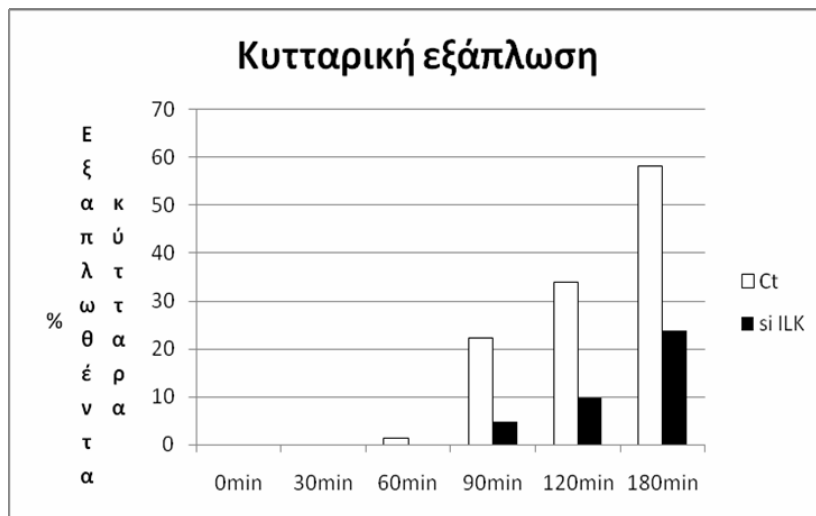
α

Κύτταρα με siILK, 2

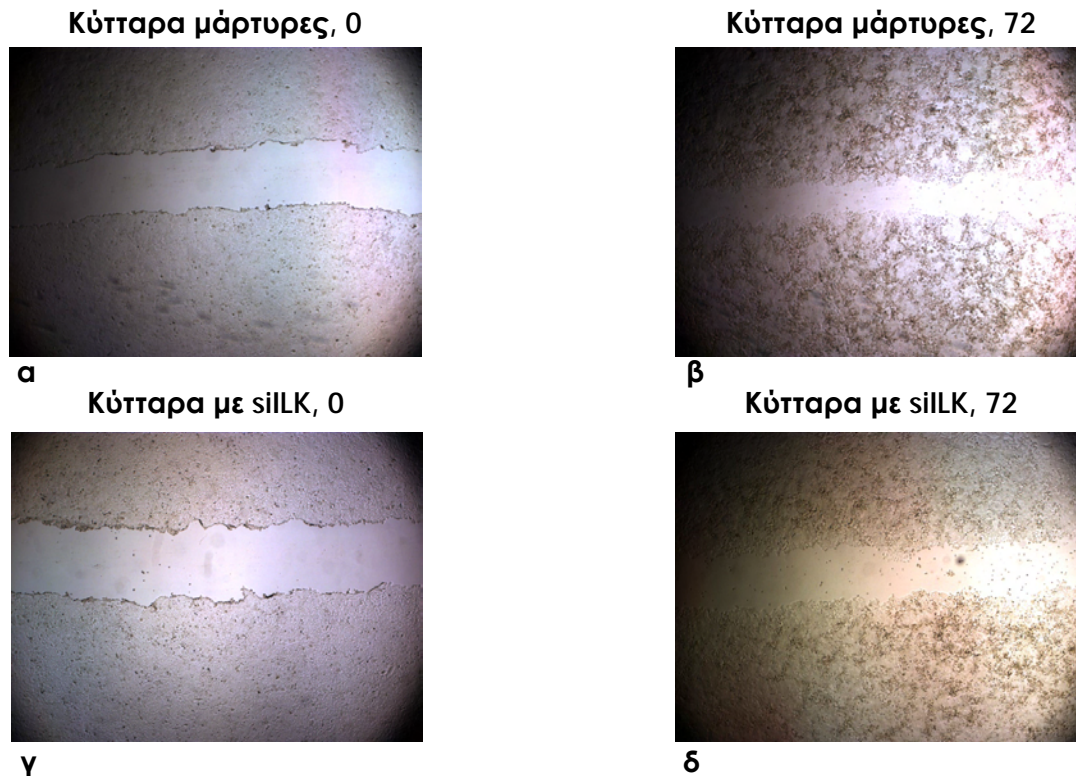


β

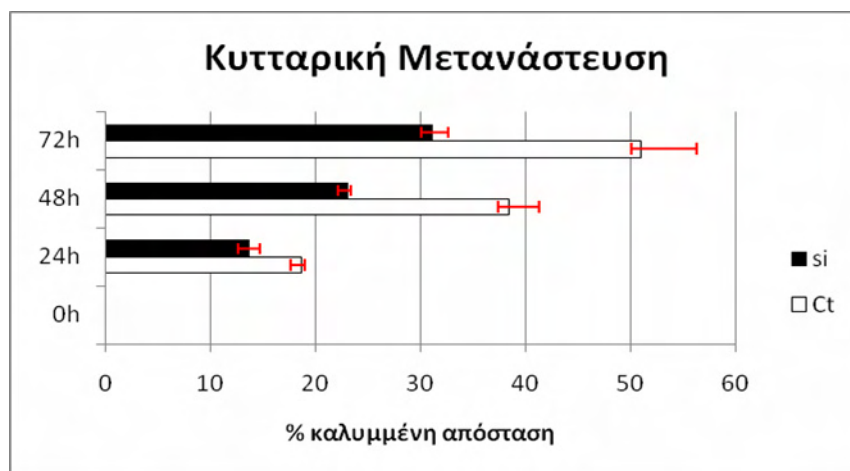
Εικόνα 23: Επίδραση της μείωσης της ILK στην κυτταρική εξάπλωση. Τα κύτταρα μάρτυρες (α) αρχίζουν και εξαπλώνονται άμεσα. Αντίθετα, στα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK (β) η εξάπλωση των κυττάρων καθυστερεί σημαντικά. Τα μη εξαπλωμένα κύτταρα διακρίνονται από τα εξαπλωμένα βάσει του σχήματός τους. Τα μη εξαπλωμένα κύτταρα διατηρούν σφαιρικό σχήμα ενώ τα εξαπλωμένα σχήματα αρχίζουν και



Διάγραμμα 10: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του cell spreading assay. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το % ποσοστό των εξαπλωμένων κυττάρων ως προς το σύνολο των κυττάρων.



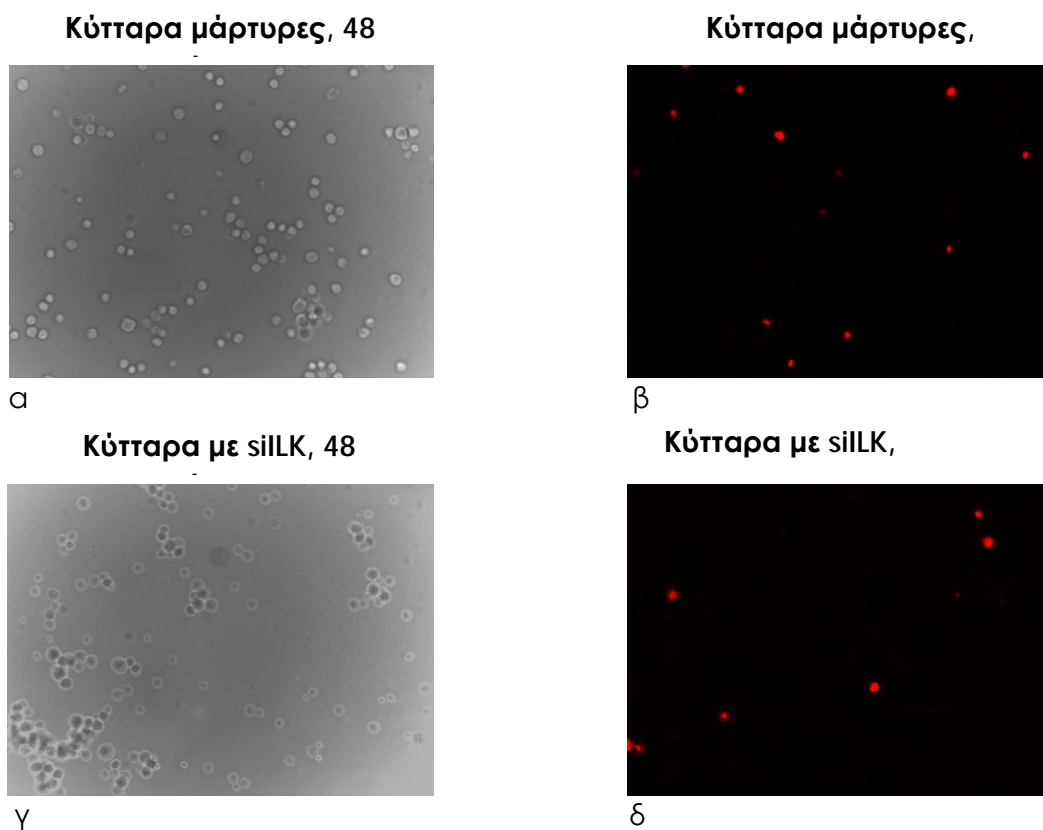
Εικόνα 24: Επίδραση της μείωσης της ILK στην κυτταρική μετανάστευση. Στα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK, 72 ώρες μετά τη δημιουργία του κενού μεταξύ των κυττάρων, παρατηρείται καθυστέρηση στο κλείσιμο του κενού (δ) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες στο ίδιο χρονικό διάστημα (β).



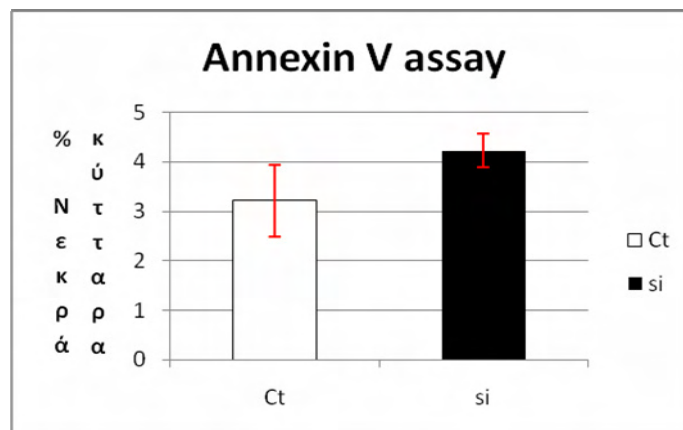
Διάγραμμα 11: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του πειράματος κυτταρικής μετανάστευσης. Τα κύτταρα στα οποία έχει μειωθεί η ILK παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό κίνησης σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες τόσο στις 48 όσο και στις 72 ώρες. Τα δείγματα παρουσιάζονται εις διπλούν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το % ποσοστό του αρχικού κενού που καλύφθηκε από τα κύτταρα.

Απόπτωση: Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες με τα προηγούμενα τρία πειράματα. Για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρώσης με φθορίζουσα ουσία της ανεξίνης 5 (annexin V assay). Η τεχνική αυτή ανιχνεύει την πρωτεΐνη ανεξίνη 5 η οποία προσδένεται στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα των κυττάρων όταν αυτά πρόκειται να υποστούν απόπτωση. Η πρόσδεση της ανεξίνης στη μεμβράνη οδηγεί στο σχηματισμό ενός τριμερούς ανεξίνης το οποίο όταν είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία δίνει ισχυρό σήμα. **Τα αποτελέσματά μας (εικ. 25) έδειξαν ότι η μείωση της ILK δεν επηρεάζει την επιβίωση των κυψελιδικών κυττάρων.**





Εικόνα 25: Επίδραση της μείωσης της ILK στην κυτταρική επιβίωση. Δεν παρατηρείται διαφορά στον αριθμό των κυττάρων που είναι θετικά στην ανεξίνη 5 μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων (β) και των κυττάρων που έχουν απορροφήσει με siILK (δ).



Διάγραμμα 12: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του πειράματος της απόπτωσης. Δεν παρουσιάζονται ιδιαίτερα σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων και των κυττάρων από τα οποία λείπει η ILK. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το % ποσοστό των θετικών για την ανεξίνη 5 κυττάρων ως προς το σύνολο των κυττάρων και αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα ± την τυπική απόκλιση.

## B. IN VIVO

Στα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης. Το μοντέλο υπερέκφρασης του TGF-β στον πνεύμονα μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών και το ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Το πρώτο μοντέλο παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της επίδρασης ενός συγκεκριμένου μορίου, του TGF-β, στην ILK στην πνευμονική ίνωση ενώ το μοντέλο της μπλεομυκίνης μιμείται σε αρκετά μεγάλο βαθμό την ανθρώπινη παθολογία.

### 1. Δημιουργία μοντέλου υπερέκφρασης TGF-β

Για το μοντέλο της υπερέκφρασης του TGF-β χρησιμοποιήθηκαν 4 ομάδες ζώων (πίνακας 6).

**Πίνακας 6: Ομάδες ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Στα ζώα μάρτυρες χορηγήθηκαν αδενοϊοί ανασυνδυασμένοι με το GFP γονίδιο. Στα πειραματικά ζώα χορηγήθηκαν αδενοϊοί ανασυνδυασμένοι με το γονίδιο του TGF-β1. Η χορήγηση των αδενοϊών έγινε είτε ενδορινικά είτε ενδοτραχειακά.**

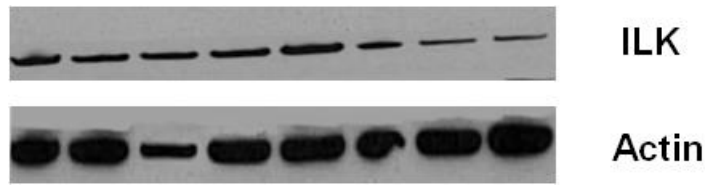
Στέλεχος	Γονίδιο	Οδός Χορήγησης	Αριθμός ζώων
C57Bl/6	GFP	Ενδοτραχειακά (IT)	5
C57Bl/6	TGF-β1	Ενδοτραχειακά (IT)	3
C57Bl/6	GFP	Ενδορινικά (IN)	5
C57Bl/6	TGF-β1	Ενδορινικά (IN)	5

Τα ζώα στα οποία οι TGF-αδενοϊοί χορηγήθηκαν ενδοτραχειακά (intratracheal administration, IT) θυσιάστηκαν 7 ημέρες μετά τη χορήγηση ενώ στα ζώα στα οποία χορηγήθηκαν ενδορινικά (intranasal administration, IN), 14 ημέρες μετά τη χορήγηση. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι ο φαινότυπος στην ενδοτραχειακή χορήγηση είναι πολύ πιο έντονος απ' ότι στην ενδορινική χορήγηση αφού μέσω της τραχείας ολόκληρη η ποσότητα των ιών καταλήγει απευθείας στους πνεύμονες ενώ κατά την ενδορινική χορήγηση υπάρχει πάντα η πιθανότητα να μην απορροφηθεί πλήρως το διάλυμα που περιέχει τους ιούς. Στην προκειμένη περίπτωση

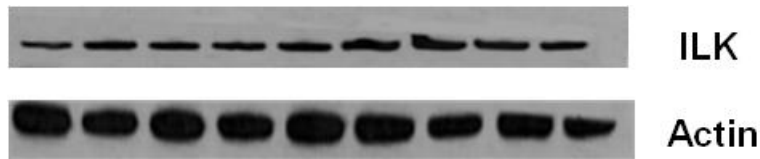
παρατηρήθηκε ότι η ενδοτραχειακή χορήγηση TGF-β είχε επηρεάσει σημαντικά την υγεία των ζώων τα οποία εμφάνιζαν σημαντικές δυσκολίες στην αναπνοή τους. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε πνεύμονες πειραματικών ζώων έδειξαν ότι οι πνεύμονές τους είχαν υποστεί εκτεταμένη καταστροφή.

## **2. Ποσοτικοποίηση της ILK στο μοντέλο υπερέκφρασης του TGF-β1**

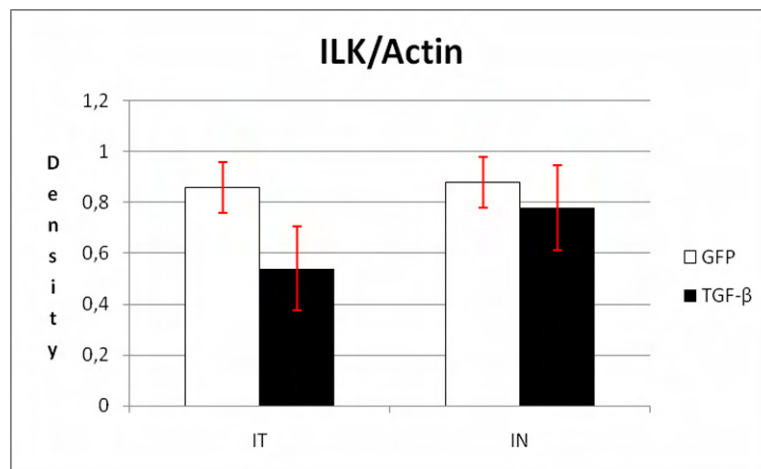
Στο μοντέλο της υπερέκφρασης του TGF-β, η ILK ποσοτικοποιήθηκε σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανάλυση κατά western. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν όλα τα ζώα κάθε ομάδας ενώ στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος της ποσότητας της ILK από κάθε ομάδα. Τα αποτελέσματα μας (εικ. 26, 27) δείχνουν ότι υπάρχει μια δραματική μείωση της ILK στα ζώα της ενδοτραχειακής χορήγησης (26) ενώ και στην ενδορινική χορήγηση παρατηρείται μείωση αλλά σε μικρότερο βαθμό (27). **Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με ότι ισχύει μέχρι τώρα για την ILK σε οποιοδήποτε άλλο ινωτικό ιστό έχει μελετηθεί.**



Εικόνα 26: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στην ενδοτραχειακή χορήγηση TGF-β. Οι 5 πρώτες ζώνες από αριστερά αντιστοιχούν στα ζώα μάρτυρες και οι τρεις τελευταίες στα πειραματικά. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



Εικόνα 27: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στην ενδορινική χορήγηση TGF-β. Οι 5 πρώτες ζώνες από αριστερά αντιστοιχούν στα πειραματικά ζώα και οι τέσσερις τελευταίες στα ζώα μάρτυρες. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



Διάγραμμα 13: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στο μοντέλο υπερέκφρασης του TGF-β. Αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ενδοτραχειακής χορήγησης (IT) και δεξιά της ενδορινικής (IN). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο έκφρασης της ILK σε κάθε ομάδα ζώων  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τα επίπεδα της β-ακτίνης.

### 3. Δημιουργία μοντέλου μπλεομυκίνης

Το μοντέλο της μπλεομυκίνης είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο ζωικό μοντέλο πνευμονικής ίνωσης μέχρι σήμερα. Η μπλεομυκίνη είναι μια χημική ουσία που χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως αντικαρκινικό φάρμακο εναντίον του καρκίνου του δέρματος (Umezawa, 1974) αλλά σύντομα αποδείχθηκε ότι η χορήγηση μπλεομυκίνης προκαλούσε δόσοεξαρτώμενη πνευμονική τοξικότητα που κατέληγε σε ίνωση. Η μπλεομυκίνη προκαλεί πνευμονική ίνωση σε διάφορα ζώα ενώ μπορεί να χορηγηθεί από διάφορες οδούς όπως η ενδοφλέβια, η ενδοπεριτοναϊκή και η ενδοτραχειακή (Mugia et al., 1983). Στο δικό μας μοντέλο προτιμήθηκε η ενδοτραχειακή χορήγηση που έχει το πλεονέκτημα ότι με μία και μοναδική δόση εκδηλώνεται ίνωση σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Η χορήγηση μπλεομυκίνης προκαλεί σπασίματα στη διπλή έλικα του DNA με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας φλεγμονώδους αντίδρασης (Grande et al., 1998). Η αντίδραση αυτή έχει ως αρχικό αποτέλεσμα την καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων ενώ ακολουθεί η ενεργοποίηση των ινοβλαστών και τελικά η ίνωση. Τα χρονικά διαστήματα, ο αριθμός ζώων καθώς και η δόση και το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στον πίνακα 7.

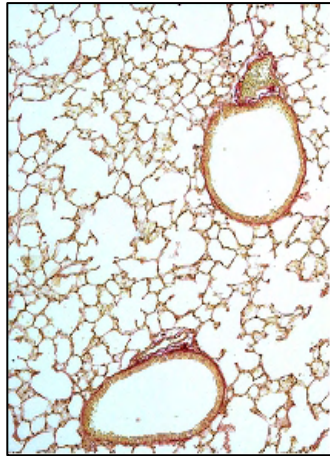
**Πίνακας 7: Ομάδες ζώων και χρονικά διαστήματα που χρησιμοποιήθηκαν για το μοντέλο της μπλεομυκίνης. Στα κοντρόλ ζώα χορηγήθηκε PBS ενώ στα πειραματικά διάλυμα μπλεομυκίνης σε PBS (150 mg/kg).**

Στέλεχος	Ημέρες	Δόση	Αριθμός Ζώων
<b>C57Bl/6</b>	2	PBS	5
<b>C57Bl/6</b>	2	BLEOMYCIN	3
<b>C57Bl/6</b>	4	BLEOMYCIN	5
<b>C57Bl/6</b>	9	PBS	5
<b>C57Bl/6</b>	9	BLEOMYCIN	5
<b>C57Bl/6</b>	15	PBS	5
<b>C57Bl/6</b>	15	BLEOMYCIN	4

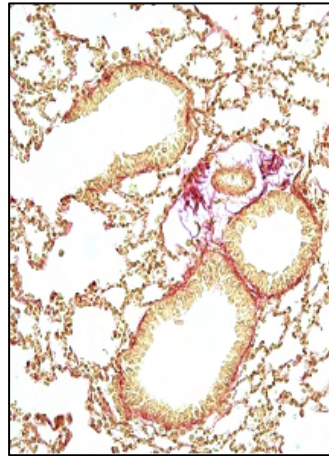
<b>C57Bl/6</b>	23	PBS	5
<b>C57Bl/6</b>	23	BLEOMYCIN	2

#### 4. Εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης στο μοντέλο της μπλεομυκίνης

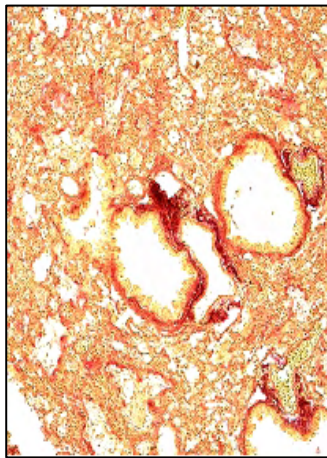
Για να εξετάσουμε την εξέλιξη της ίνωσης στο μοντέλο μας, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της χρώσης του κολλαγόνου με τη χρωστική *micro-sirius red* η οποία βάφει όλα τα είδη του κολλαγόνου κόκκινα επιτρέποντας την εύκολη ανίχνευση της παραγόμενης πρωτεΐνης του κολλαγόνου. Τα αποτελέσματά μας (εικ. 28) δείχνουν ότι η συσσώρευση κολλαγόνου ξεκινά κατά τη μέρα 9 (28γ) και φτάνει στο μέγιστο κατά τη μέρα 15 (28δ). Στις μέρες 15 και 23 (28ε) το κολλαγόνο κατανέμεται πλέον σε όλη την επιφάνεια του ιστού ενώ η φυσιολογική αρχιτεκτονική του ιστού είναι πλήρως κατεστραμμένη αφού τα κυψελιδικά τοιχώματα έχουν καταρρεύσει και οι αεραγωγοί έχουν καλυφθεί από τις ίνες του κολλαγόνου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με παρόμοιες δημοσιευμένες μελέτες για το μοντέλο της μπλεομυκίνης και τη εξέλιξη της ίνωσης σε αυτό (*Chaudhary et al., 2005*).



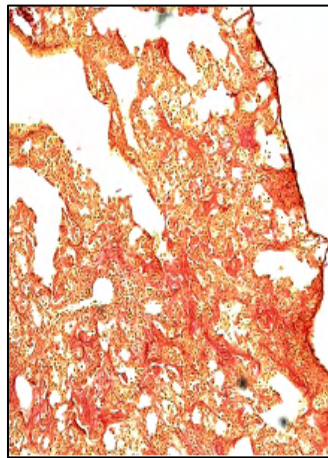
α



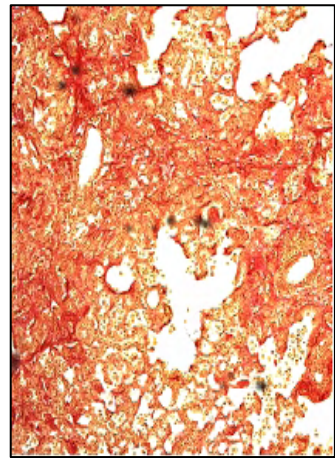
β



γ



δ



ε

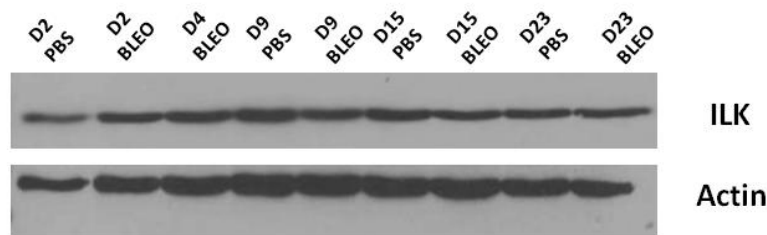
**Εικόνα 28: Χρώση του πνευμονικού κολλαγόνου με micro-sirius red. Στον πνεύμονα των ζώων μαρτύρων (α) και στη μέρα δύο (β) παρατηρούμε τη φυσιολογική δομή του πνεύμονα καθώς και τη φυσιολογική κατανομή του κολλαγόνου στον ιστό. Από τη μέρα εννιά (γ) αρχίζει η έντονη εναπόθεση κολλαγόνου αλλά οι δομές του πνεύμονα διατηρούνται ανέπαφες σε ένα βαθμό. Στις μέρες 15 (δ) και 23 (ε) η παραγωγή κολλαγόνου φτάνει στο μέγιστο με τη φυσιολογική αρχιτεκτονική του πνεύμονα να έχει πλήρως**

## 5. Ποσοτικοποίηση της ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης

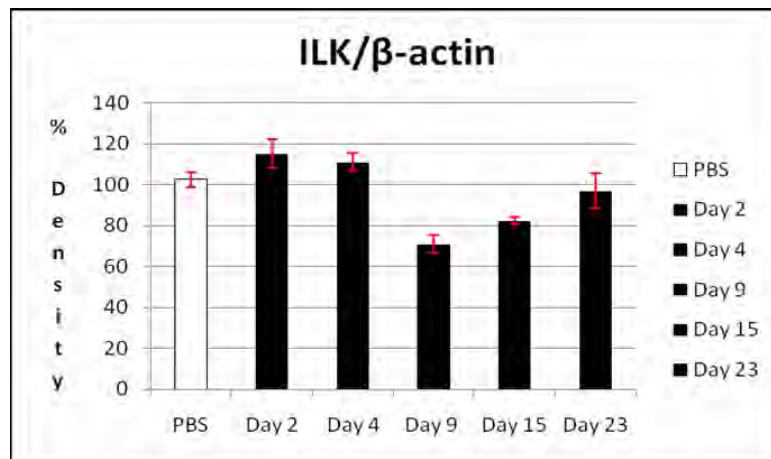
Στο μοντέλο της μπλεομυκίνης, η ILK ποσοτικοποιήθηκε τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο μηνύματος. Στο western blotting για την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό μίγμα από όλα τα ζώα της κάθε ομάδος για κάθε χρονικό διάστημα αφού η μελέτη της ιστολογίας έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ζώων της κάθε ομάδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας (εικ. 29, διάγραμμα 14) τα επίπεδα της ILK αυξάνονται στα αρχικά χρονικά διαστήματα, δηλαδή στις μέρες 2 και 4. Την ημέρα 9 που είναι το χρονικό σημείο όπου εντείνονται τα ινωτικά φαινόμενα, όπως δείξαμε με τη χρώση του κολλαγόνου, παρατηρείται μια σημαντική μείωση της ILK σε σχέση με τον φυσιολογικό πνεύμονα. Στα χρονικά διαστήματα των 15 και 23 ημερών τα επίπεδα της ILK αρχίζουν και ξανα-αυξάνονται (σε σχέση με την ημέρα 9) επιστρέφοντας κατά τη μέρα 23 στα ίδια επίπεδα με αυτά του φυσιολογικού πνεύμονα.

Για την ποσοτικοποίηση του mRNA της ILK χρησιμοποιήθηκαν τα χρονικά διαστήματα των 2, 4, 9 και 15 ημερών αφού οι μέρες 15 και 23 παρουσίαζαν παρόμοια ιστολογική εικόνα με εκτεταμένη καταστροφή του φυσιολογικού παρεγχύματος. Τα αποτελέσματά μας (διάγραμμα 15) έδειξαν ότι στις ημέρες 2, 4 και 9 τα επίπεδα του mRNA συμβαδίζουν με αυτά της πρωτεΐνης αφού παρατηρείται αύξηση στις ημέρες 2 και 4 και μείωση στην ημέρα 9. Αντίθετα, στην ημέρα 15, τα επίπεδα του mRNA της ILK είναι 2,5 φορές υψηλότερα από αυτά του κοντρόλ γεγονός που δεν συμβαδίζει με τα επίπεδα της πρωτεΐνης η οποία είναι μειωμένη σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες.

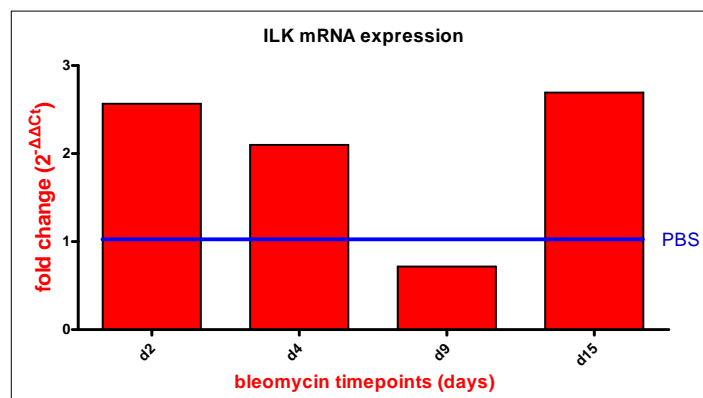




Εικόνα 29: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς. Τα ζώα μάρτυρες αντιπροσωπεύονται με τον όρο PBS και τα πειραματικά με τη σύντημηση της μπλεομυκίνης, BLEO.



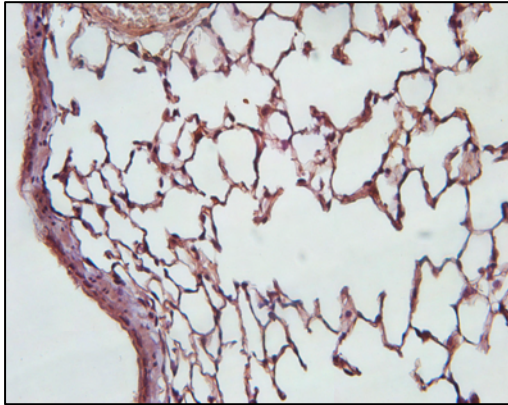
Διάγραμμα 14: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Επειδή τα κοντρόλ δείγματα όλων των χρονικών διαστημάτων δεν παρουσίασαν διαφορές στην έκφραση της ILK παρουσιάζεται μόνο ένα δείγμα από τα ζώα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο έκφρασης της ILK σε κάθε ομάδα ζώων ± την τυπική απόκλιση. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε



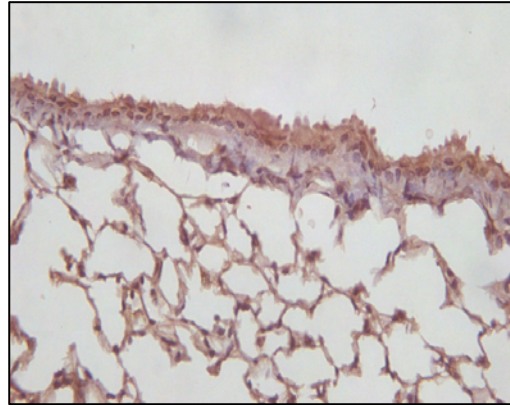
Διάγραμμα 15: Ποσοτικοποίηση του μηνύματος της ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Τα επίπεδα της ILK στον φυσιολογικό πνεύμονα αντιπροσωπεύονται με τη μπλε γραμμή (PBS). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως οι φορές που μεταβάλλονται τα επίπεδα της ILK στα πειραματικά ζώα σε σχέση με τα επίπεδα της ILK στα ζώα μάρτυρες.

## 6. Κατανομή της ILK στον ινωτικό πνεύμονα

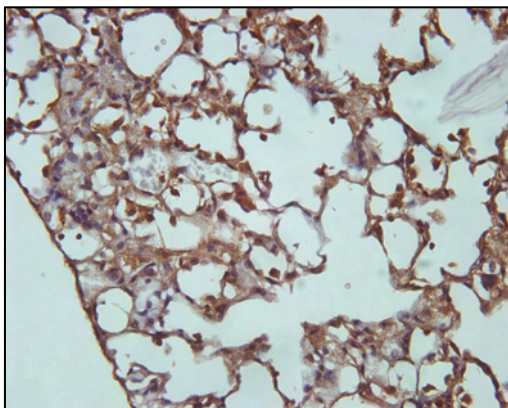
Για να μελετήσουμε την κατανομή της ILK στο φυσιολογικό και τον ινωτικό πνεύμονα πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοϊστοχημείας στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Στο φυσιολογικό ιστό παρατηρήθηκε έντονη χρώση για την ILK στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (εικ. 30β) και στα κύτταρα των κυψελιδικών τοιχωμάτων (εικ. 30α) όπου οι κυρίαρχοι κυτταρικοί πληθυσμοί είναι τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των αγγειακών τοιχωμάτων (ενδοθηλιακά, περικύτταρα). Σε πολύ μικρότερες αναλογίες υπάρχουν επίσης κυψελιδικά μακροφάγα και ινοβλάστες. Στις ημέρες 2 και 4 δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές διαφορές σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό. Κατά την ημέρα 9, αρχίζουν και εμφανίζονται οι πρώτες ινωτικές εστίες (30γ) που είναι ακόμη πολύ περιορισμένες τόσο σε αριθμό όσο και σε μέγεθος. Οι πρώτες αυτές εστίες περιέχουν κύτταρα θετικά για την ILK. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που είναι ορατό με την ανοσοϊστοχημεία είναι ότι κατά την ημέρα 9 παρατηρείται εκτεταμένη καταστροφή του βρογχικού επιθηλίου (30δ). Τηδέκατη πέμπτη ημέρα η φυσιολογική δομή του πνεύμονα έχει πλήρως καταστραφεί. Ο ιστός χαρακτηρίζεται από μεγάλες ινωτικές εστίες με υψηλό βαθμό ετερογένειας σε σχέση με την ILK αφού υπάρχουν περιοχές όπου τα κύτταρα δεν εκφράζουν την ILK (30ε) και περιοχές με κύτταρα που την εκφράζουν (30στ). Η ημέρα 23 παρουσιάζει την ίδια ιστολογική εικόνα με την ημέρα 15.



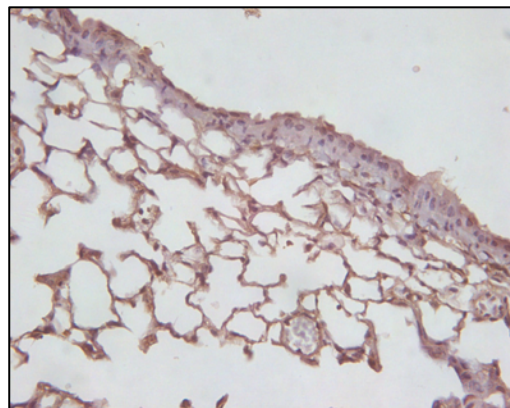
α



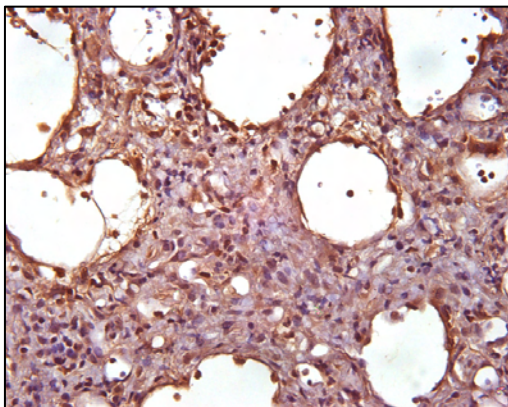
β



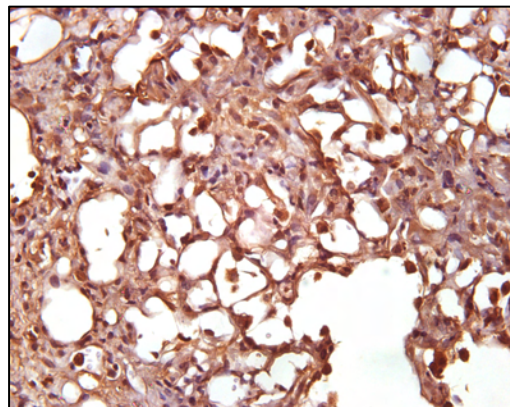
γ



δ



ε



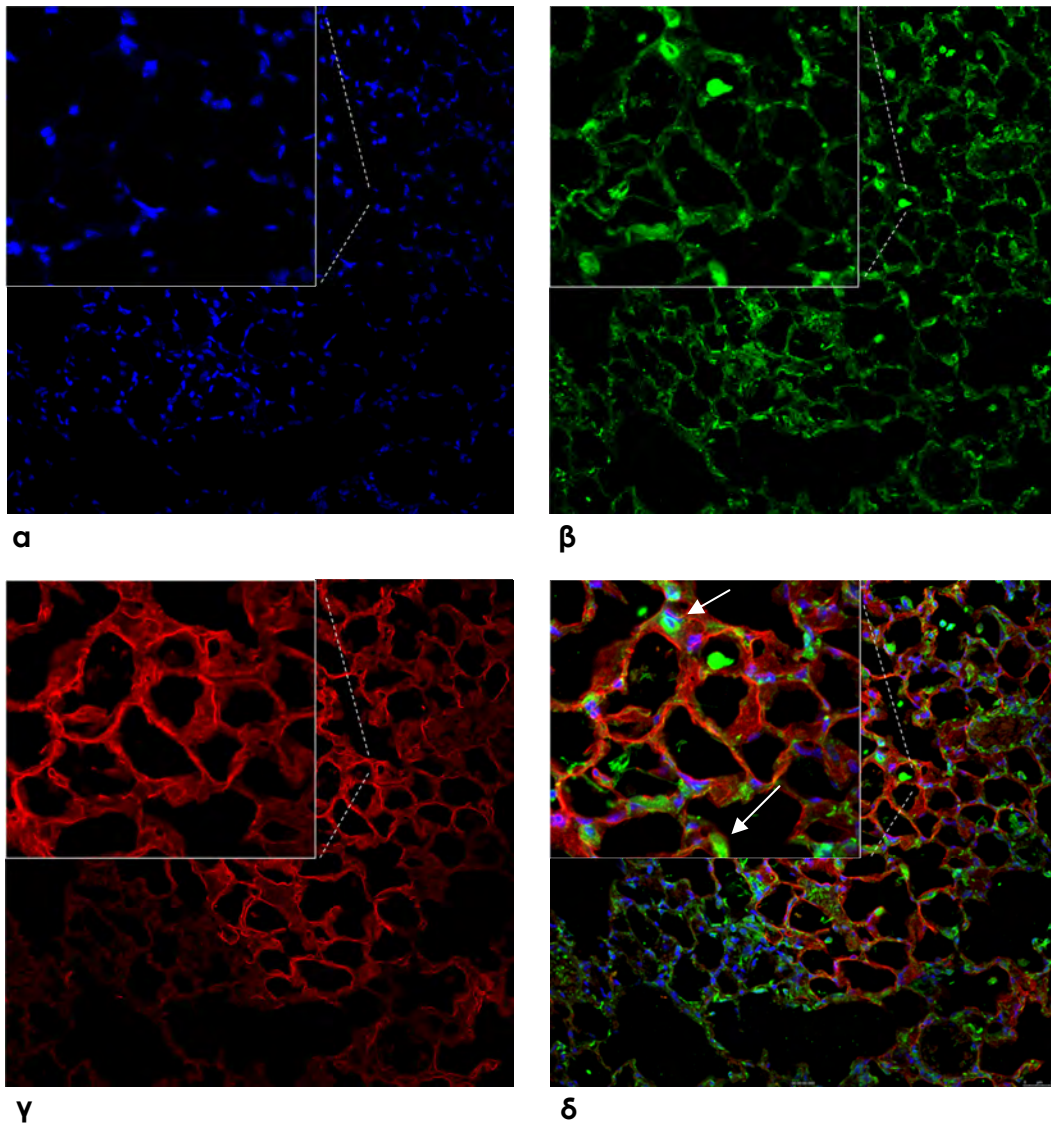
στ

**Εικόνα 30: Ανοσοϊστοχημεία για την ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Στο φυσιολογικό πνεύμονα (α, β) παρατηρείται έντονη χρώση για την ILK στα κυψελιδικά τοιχώματα (α) και στο βρογχικό επιθήλιο. Κατά την ημέρα 9 (γ, δ) εμφανίζονται οι πρώτες ινωτικές εστίες (γ) ενώ λόγω της τοξικότητας της μπλεομυκίνης καταστρέφεται μεγάλο μέρος των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (δ). Την ημέρα 15 (ε, στ) ο ιστός χαρακτηρίζεται από την παρουσία εκτεταμένων ινωτικών εστιών με αυξημένη ετερογένεια σε σχέση με την ILK αφού υπάρχουν τόσο ILK αρνητικές (ε) όσο και ILK**

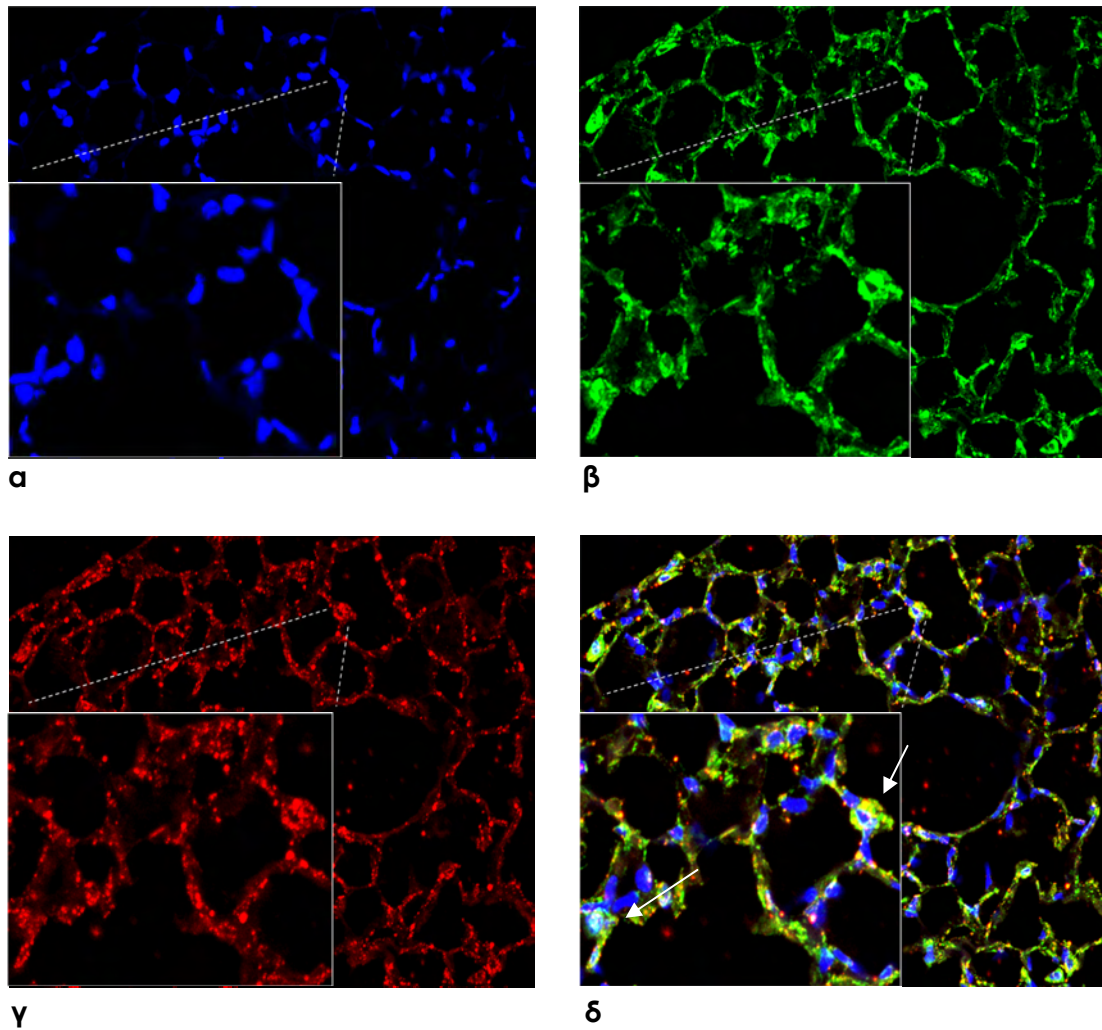
## **7. Κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν την ILK στο μοντέλο της μπλεομυκίνης**

Για να χαρακτηρίσουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν την ILK στο φυσιολογικό αλλά κυρίως στον ινωτικό πνεύμονα και συγκεκριμένα στις ινωτικές εστίες πραγματοποιήσαμε πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού για την ILK με διάφορους κυτταρικούς δείκτες. Ο διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και την α-πρωτεΐνη των τύπου I κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων (εικ. 31) έδειξε ότι η ILK εντοπίζεται στα τύπου I κυψελιδικά κύτταρα. Σύμφωνα με την εικόνα 31, που προέρχεται από το χρονικό διάστημα των 9 ημερών, σε πολλά σημεία, τα κυψελιδικά τοιχώματα έχουν χάσει τη χρώση για την α-πρωτεΐνη κάτι που οφείλεται στη δράση της μπλεομυκίνης η οποία κατά κύριο λόγο καταστρέφει τα κύτταρα τύπου I. Παράλληλα, **επισημάνθηκαν κύτταρα (σημειώνονται με βέλη) θετικά για την ILK που ήταν αρνητικά για τον δείκτη των τύπου I κυττάρων.** Βάσει θέσης και μορφολογίας, υποθέσαμε ότι τα κύτταρα αυτά είναι επιθηλιακά κύτταρα τύπου II. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού για την ILK και τον δείκτη των κυττάρων τύπου II επιφανειοδραστικός παράγοντας B (surfactant protein B, SPB) που όπως φαίνεται στην εικόνα 32 συνεντοπίζεται με την ILK σε κύτταρα, που και με βάση τη θέση και τη μορφολογία, είναι κύτταρα τύπου II. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κύτταρα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά τόσο για τη φυσιολογική λειτουργία του πνεύμονα, λόγω της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα, όσο και για την επιδιόρθωση των τύπου I κυττάρων τα οποία είναι ευαίσθητα σε παθογόνα ερεθίσματα. Κατά συνέπεια, **η παρουσία της ILK στα κύτταρα αυτά αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα.**

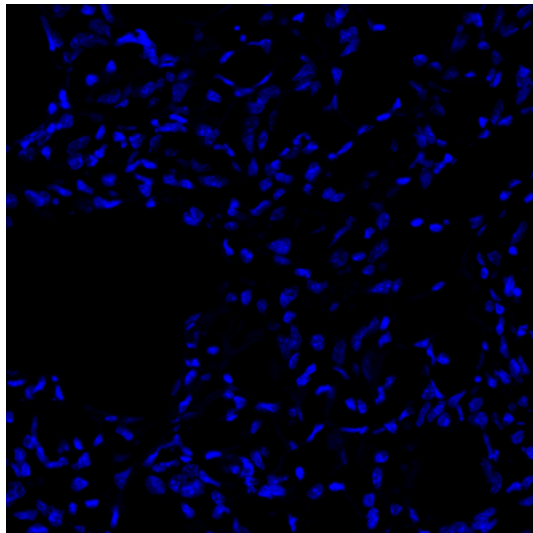
Ακολούθως, επειδή οι μυοϊνοβλάστες αποτελούν το σημαντικότερο ίσως κύτταρο στην ίνωση ενώ και η ILK έχει εμπλακεί με την παραγωγή μυοϊνοβλαστών μέσω του EMT, πραγματοποιήσαμε πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού για την ILK και το δείκτη των μυοϊνοβλαστών α-Smooth muscle actin (α-SMA). Κατά την ημέρα 15, όπου παρατηρείται και ραγδαία αύξηση του αριθμού των μυοϊνοβλαστών, παρατηρήθηκαν ινωτικές εστίες όπου η ILK και η α-SMA συνεντοπίζονται (εικ. 33). Εν τούτοις, όπως φαίνεται στην εικόνα 34, η πλειονότητα των μυοϊνοβλαστών δεν περιέχουν ILK. **Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η ILK είναι πιθανό να εντοπίζεται σε έναν υποπληθυσμό μυοϊνοβλαστών.**



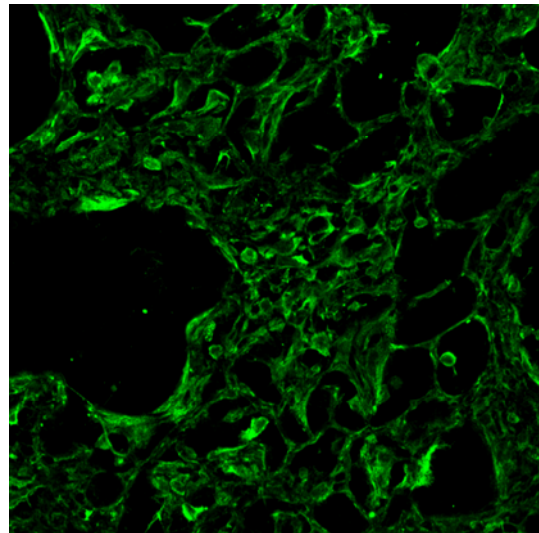
**Εικόνα 31: Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των κυττάρων τύπου I κατά την ημέρα 9. ILK: πράσινο, α-πρωτεΐνη των κυττάρων τύπου I: κόκκινο, DAPI: μπλε. Κατά την ημέρα 9 παρατηρείται εκτεταμένη καταστροφή των κυττάρων τύπου I στα οποία υπάρχει ILK. Εκτός από τα κύτταρα τύπου I ILK υπάρχει και σε κύτταρα που επιβιώνουν της μπλεομυκίνης και δεν είναι θετικά για τον δείκτη των τύπου I κυττάρων (σημειώνονται με βέλη 2 χαρακτηριστικά παραδείγματα στο μεγεθυμένο**



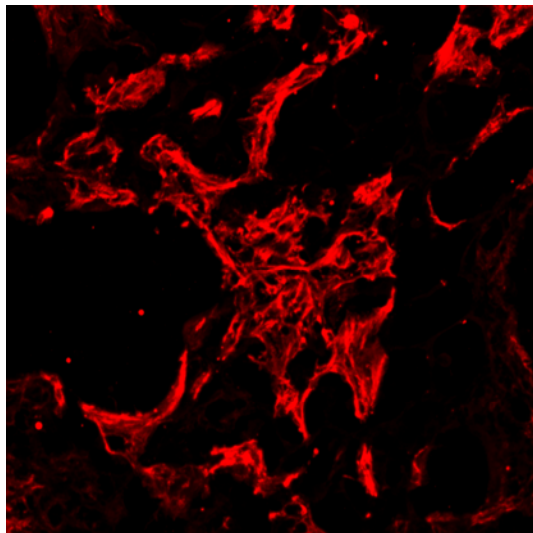
**Εικόνα 32: Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των κυττάρων τύπου II κατά την ημέρα 9. ILK: πράσινο, επιφανειοδραστικός παράγοντας Β (SPB): κόκκινο, DAPI: μπλε. Ο δείκτης των τύπου II κυττάρων και η ILK (χαρακτηριστικά παραδείγματα υποδεικνύονται με βέλη στο μεγεθυμένο ένθετο κάτω αριστερά) συνεντοπίζονται σε κύτταρα αποτέλεσμα που δείχνει ότι τα κύτταρα τύπου II εκφράζουν ILK.**



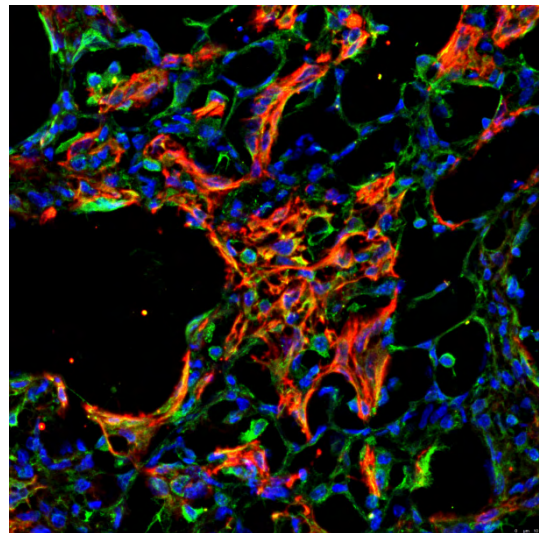
α



β

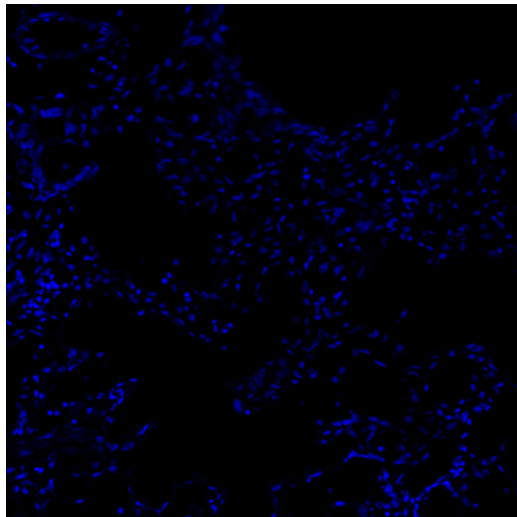


γ

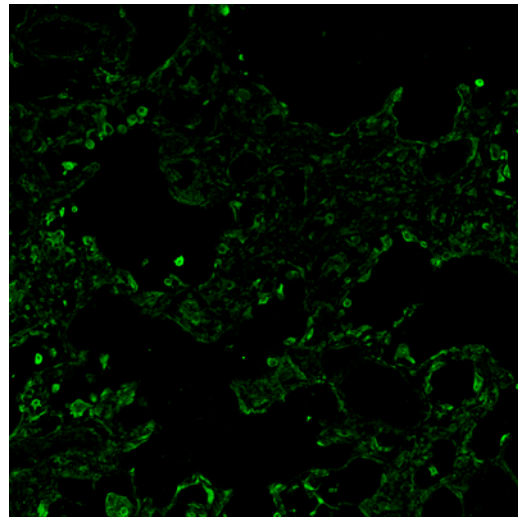


δ

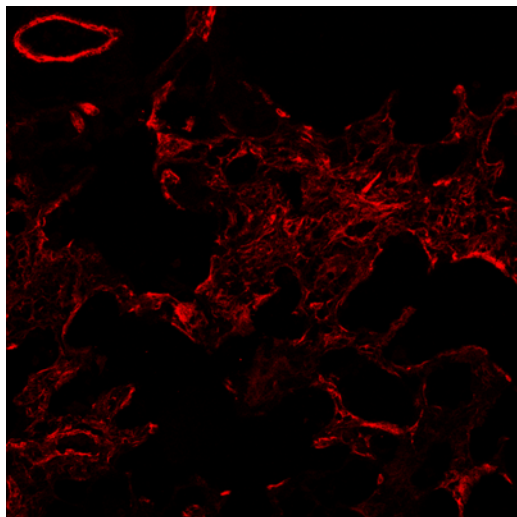
Εικόνα 33: Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των μυοϊνοβλαστών κατά την ημέρα 15. ILK: πράσινο, α-SMA: κόκκινο, DAPI: μπλε. Ο δείκτης των μυοϊνοβλαστών και η ILK συνεντοπίζονται σε ορισμένα κύτταρα στις ινωτικές εστίες αποτέλεσμα που δείχνει ότι υπάρχουν μυοϊνοβλάστες που εκφράζουν ILK



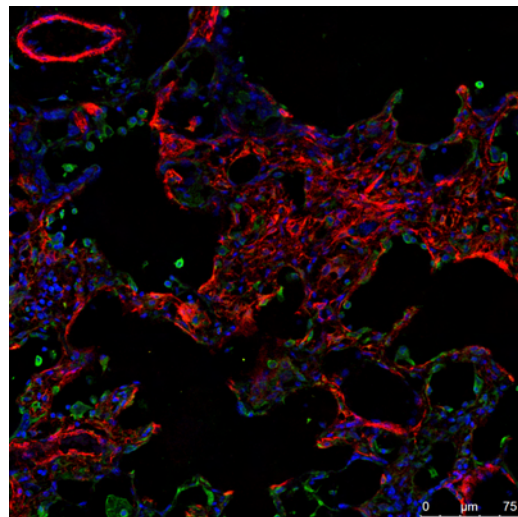
α



β



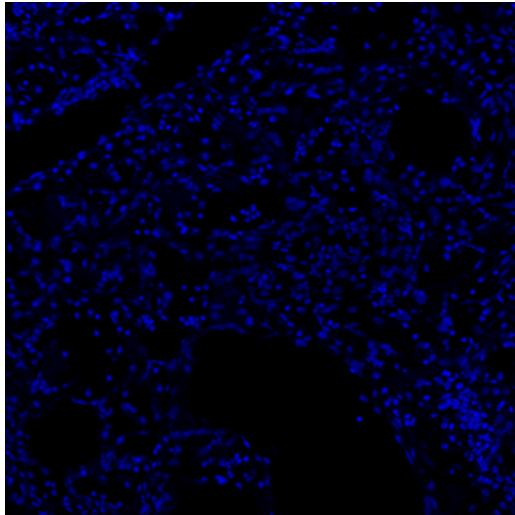
γ



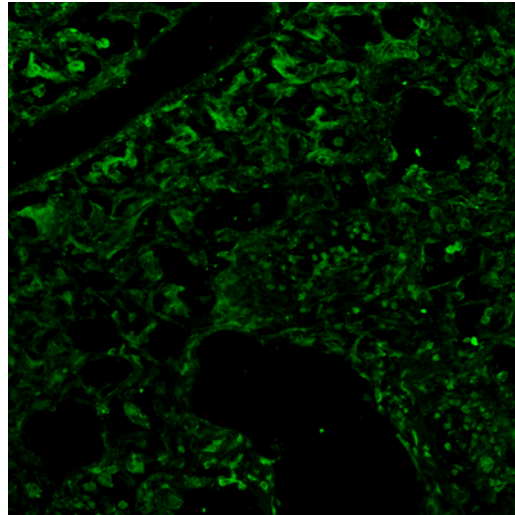
δ

Εικόνα 34: Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των μυοϊνοβλαστών κατά την ημέρα 15. ILK: πράσινο, α-SMA: κόκκινο, DAPI: μπλε. Η πλειονότητα των μυοϊνοβλαστών δεν εκφράζουν ILK.

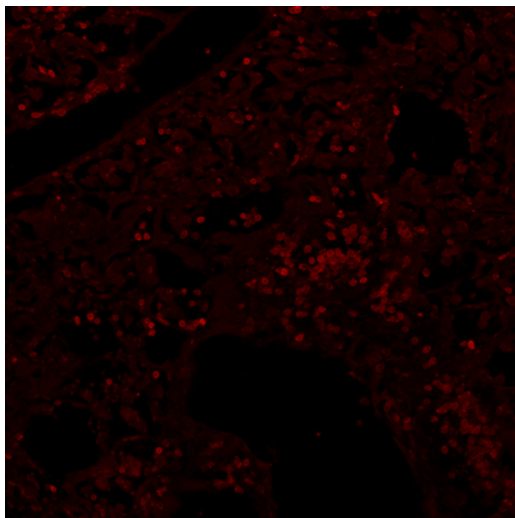




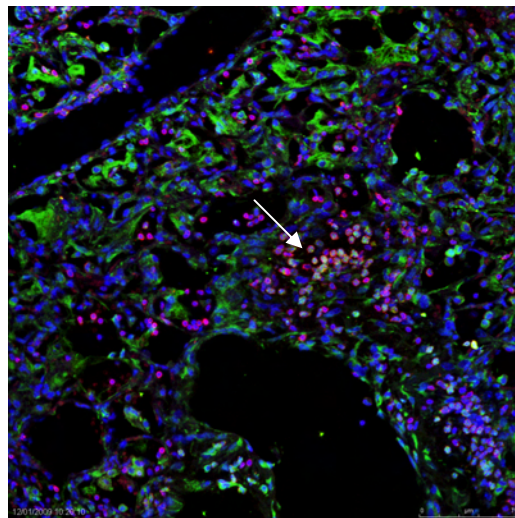
α



β



γ



δ

**Εικόνα 35: Διπλός ανοσοφθορισμός για την ILK και δείκτη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την ημέρα 15. ILK: πράσινο, δείκτης λευκοκυττάρων (CD45): κόκκινο, DAPI: μπλε. Σημαντικός αριθμός κυττάρων του ανοσοποιητικού εκφράζει την ILK (τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εκφράζουν ILK υποδεικνύονται με βέλος).**

## Γ. ΙΝΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΚΤΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

### 1. Νεφρική ίνωση

Για τον εντοπισμό νέων μορίων που εμπλέκονται στην παθογένεση της ίνωσης στο νεφρικό ιστό, χρησιμοποιήθηκε το καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης (unilateral ureteric obstruction, UUO) στον αρουραίο. Το μοντέλο αυτό θεωρείται ότι προσομοιώνει πολλά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης παθολογίας. Θέλοντας να επικεντρωθούμε στα αρχικά στάδια της ινωτικής διαδικασίας πραγματοποιήσαμε πρωτεομική ανάλυση σε νεφρικό φλοιό αρουραίων 2 και 8 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Από τις πρωτεΐνες που εμφάνισαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των κοντρόλ και των πειραματικών δειγμάτων, επιλέξαμε να μελετήσουμε περαιτέρω την **καλρετικουλίνη** η οποία εμφανίσε αύξηση από την ημέρα 2. Η αύξηση αυτή μεγιστοποιήθηκε κατά την ημέρα 8.

Η καλρετικουλίνη είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου που εμπλέκεται σε πλήθος κυτταρικών λειτουργιών χωρίς όμως να έχει συνδεθεί μέχρι τώρα με τη νεφρική ίνωση. Αφού επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης με western, RT-RT PCR και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, μελετήσαμε την έκφραση της σε άλλα ινωτικά συστήματα όπως αυτό της μπλεομυκίνης στον πνεύμονα και αυτό της απαλοιφής της δεσμίνης στην καρδιά. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν μια τάση της καλρετικουλίνης να αυξάνεται σε ινωτικά συστήματα που λαμβάνει χώρα το φαινόμενο EMT αφού εκτός από τη νεφρική ίνωση, η καλρετικουλίνη εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένη και στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Αντίθετα, στο μοντέλο της απαλοιφής δεσμίνης, όπου δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη EMT, η καλρετικουλίνη δεν ανιχνεύθηκε στα ινωτικά δείγματα.

Ο ρόλος της καλρετικουλίνης στη νεφρική ίνωση διερευνάται περαιτέρω.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν το 2008 στο περιοδικό *Proteomics* υπό τον τίτλο **Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis.**

## 2. Διαβήτης τύπου II

Για τον εντοπισμό νέων μορίων που εμπλέκονται στην παθογένεση του διαβήτη τύπου II πραγματοποιήσαμε πρωτεομική ανάλυση β-παγκρεατικά κύτταρα της σειράς β-TC-6 τα οποία είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις υψηλής γλυκόζης ώστε να προσομοιωθεί το διαβητικό περιβάλλον. Από τις πρωτεΐνες που εμφάνισαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των κοντρόλ και των πειραματικών κυττάρων επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη η **ERp46** που εμφάνισε μείωση σε απόκριση στην αυξημένη γλυκόζη.

Η ERp46 είναι μια πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου που πιθανώς να εμπλέκεται στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Αφού επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματα της πρωτεϊνικής ανάλυσης τόσο *in vitro* με western blotting, όσο και *in vivo*, σε απομονωμένα παγκρεατικά νησίδια, με western blotting και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του siRNA για να προσδιορίσουμε το ρόλο της ERp46 στα β-παγκρεατικά κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η μείωση της ERp46 προκαλεί τη μείωση τόσο της προΐνσουλίνης όσο και της εκκρινόμενης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα ενώ παράλληλα επάγει την αύξηση πρωτεϊνών που θεωρούνται δείκτες του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου.

Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η ERp46 επηρεάζει τη σύνθεση ή/και την έκκριση της ινσουλίνης διερευνάται περαιτέρω.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν το 2009 στο περιοδικό *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* υπό τον τίτλο **Erp46 is reduced by high glucose and regulates insulin content in pancreatic β-cells.**

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η ίνωση ορίζεται ως η παθολογική συσσώρευση μορίων εξωκυττάριου στρώματος που οδηγεί στην καταστροφή της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας διάφορων οργάνων. Η ίνωση είναι μια παθολογική κατάσταση με πολλές επιπτώσεις αφού είναι γνωστό ότι οι ασθένειες όπου η ίνωση αποτελεί κύριο ή δευτερεύον χαρακτηριστικό είναι μία από τις βασικές αιτίες θανάτου στον ανεπτυγμένο κόσμο αφού το 45% περίπου των θανάτων στις χώρες αυτές μπορεί να συνδεθεί με κάποια ινωτική ασθένεια (Wynn, 2007). Στον πνεύμονα, η ίνωση είναι ένα καθυστερημένο σύμπτωμα μιας μεγάλης οικογένειας ασθενειών που ονομάζονται νόσοι του διάμεσου πνευμονικού χώρου. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, η πιο συνηθισμένη νόσος του διάμεσου πνευμονικού χώρου αφού αντιστοιχεί στο 45% όλων των περιστατικών πνευμονικής ίνωσης που έχουν διαγνωστεί στις Η.Π.Α. (ATS, 2000) έχει συχνότητα 30 περιστατικών ανά 100.000 πληθυσμό χωρίς να υπάρχει μέχρι τώρα αποτελεσματική θεραπεία.

Προκειμένου να δημιουργηθούν αποτελεσματικές και στοχευμένες θεραπευτικές στρατηγικές για οποιαδήποτε ινωτική κατάσταση, είναι απαραίτητη προϋπόθεση η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που κρύβονται πίσω από τις ινωτικές διαδικασίες. Έχει υποστηριχθεί ότι μεταξύ των μηχανισμών που εμπλέκονται στην αύξηση του αριθμού των κολλαγονοπαραγωγών κυττάρων βρίσκεται και το EMT που έχει προταθεί ότι μπορεί να παίζει ρόλο και στην πνευμονική ίνωση (Kim *et al.*, 2006, Tanjore *et al.*, 2009). Επιπλέον, αν θέλουμε να αποκτήσουμε στοχευμένους και αποτελεσματικούς φαρμακευτικούς στόχους, θα πρέπει να γνωρίζουμε ποια είναι τα μακρομόρια που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της ίνωσης και ποιος ακριβώς είναι ο ρόλος αυτός. Στη συγκεκριμένη διατριβή επικεντρωθήκαμε σε ένα μόριο που παίζει ρόλο σε διάφορες ινωτικές διαδικασίες, την ILK, και μελετήσαμε το ρόλο της στην πνευμονική ίνωση.

Ο ρόλος της ιντεγκρινοσυνδεόμενης κινάσης στην ίνωση έχει μελετηθεί εκτεταμένα στα νεφρά (Li *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2009) και στο ήπαρ (Zhang *et al.*, 2006). Εν τούτοις, ο ρόλος της στην πνευμονική ίνωση παραμένει ουσιαστικά άγνωστος. Για να μελετήσουμε λοιπόν το ρόλο της ILK στην πνευμονική ίνωση χρησιμοποιήσαμε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειραματικές προσεγγίσεις. Για τα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα της σειράς A549 σε συνδυασμό με τον TGF- $\beta$  που είναι ένας από τους πιο σημαντικούς προϊνωτικούς

παράγοντες ενώ παράλληλα επάγει και το EMT στη νεφρική ίνωση. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η επώαση των κυττάρων A549 με τον TGF-β επάγει την εμφάνιση ινωτικών χαρακτηριστικών (εικ. 14) αλλά και το EMT (εικ. 12). Παράλληλα, δείξαμε ότι η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF-β (εικ. 15) σε συνάρτηση με το χρόνο. Με τη χρήση χημικών αναστολέων κατά των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τον TGF-β, δείξαμε επίσης ότι η αύξηση της ILK από τον TGF-β γίνεται μέσω ενός smad2/3-εξαρτώμενου μηχανισμού (εικ. 16).

Για να μελετήσουμε το ρόλο της ILK στο κυψελιδικό EMT χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του siRNA. Η μείωση των επιπέδων της ILK με το siRNA δεν οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της E-καντερίνης, η οποία μειώνεται σε απόκριση στον TGF-β κατά το EMT. Αντίθετα, η μείωση της ILK επηρέασε τα επίπεδα της βιμεντίνης (εικ. 21). Η βιμεντίνη είναι μια πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων που χρησιμοποιείται ως μεσεγχυματικός δείκτης (*Gilles et al., 1996*) και εμπλέκεται στην κυτταρική μετανάστευση και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων (*Paccione et al., 2008*). Δεδομένου ότι στη νεφρική ίνωση η ILK μεσολαβεί την απώλεια της E-καντερίνης και κατά συνέπεια την έναρξη του EMT στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ILK είτε δεν εμπλέκεται, είτε η δράση της μπορεί να υποκατασταθεί κατά την έναρξη του κυψελιδικού EMT. Επιπλέον, αφού η μείωση της ILK επηρεάζει τα επίπεδα της βιμεντίνης, που εμπλέκεται σε μεταγενέστερα στάδια του EMT (κυτταρική μετανάστευση), είναι πολύ πιθανό η ILK να εμπλέκεται μεν στο κυψελιδικό EMT αλλά έχοντας έναν διαφορετικό ρόλο από αυτόν που έχει στο σωληναριακό EMT.

**Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν το σκεπτικό ότι μεσολαβητές βασικών ινωτικών διεργασιών μπορούν να εμφανίζουν ιστοεξειδίκευση και ο ρόλος τους στην ινωτική διαδικασία θα πρέπει να εξετάζεται από ιστο σε ιστο.**

Για να μελετήσουμε περαιτέρω τις συνέπειες της απώλειας της ILK στα κυψελιδικά κύτταρα πραγματοποιήσαμε πειράματα μέσω των οποίων μελετήσαμε το ρόλο της ILK στο κυτταρικό σχήμα (εικ. 22), την κυτταρική εξάπλωση (εικ. 23), την κυτταρική μετανάστευση (εικ. 24) και την απόπτωση (εικ. 25). Τα αποτελέσματά μας, τα οποία είναι σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες σε άλλες κυτταρικές σειρές (*Fukada et al.,*

2003), δείχνουν ότι η ILK έχει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο διάφορων σημαντικών λειτουργιών όπως η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, η εξάπλωση των επιθηλιακών κυττάρων (που αποτελεί και κύριο γνώρισμά τους) καθώς και η ικανότητα του κυττάρου να κινείται. Ένα εξίσου σημαντικό εύρημα είναι ότι η ILK δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση των επιθηλιακών κυψελιδικών κυττάρων (εικ. 25). Το αποτέλεσμα αυτό διαφέρει από αποτελέσματα παρόμοιων μελετών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων (*Gkretsi et al., 2007*), των ινοβλαστών (*Nho et al., 2005*), των ποδοκυττάρων (*Yang et al., 2005*) και των ευαίσθητων στην απόπτωση κυττάρων SCP2 (*Attwell et al., 2000*) κάτι που σημαίνει ότι η ILK είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη με εξειδικευμένη συμπεριφορά τόσο σε επίπεδο ιστού όσο και σε επίπεδο κυττάρου.

Για τις *in vivo* μελέτες χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο υπερέκφρασης του TGF- $\beta$  μέσω γενετικά ανασυνδυασμένων αδενοϊών που παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της επίδρασης ενός συγκεκριμένου μορίου, εν προκειμένω του TGF- $\beta$ , στην ILK κατά την πνευμονική ίνωση. Η ποσοτικοποίηση της ILK, σε επίπεδο πρωτεΐνης, έδειξε ότι η ILK μειώνεται σε μεγάλο βαθμό στην περίπτωση της ενδοτραχειακής (εικ. 26) και σε μικρότερο βαθμό στην περίπτωση της ενδορινικής χορήγησης των αδενοϊών (εικ. 27). Επειδή η μείωση της ILK είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της ενδοτραχειακής χορήγησης όπου και ο φαινότυπος ήταν πιο έντονος, τόσο όσον αφορά την υγεία των ζώων όσο και την ιστολογική εικόνα του πνεύμονα ειδικότερα, συμπεράναμε ότι η υπερέκφραση του TGF- $\beta$  οδηγεί σε εκτεταμένη απόπτωση ή/και νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα. Κατά συνέπεια, η μείωση της ILK οφείλεται στην καταστροφή των κυττάρων αυτών. Λόγω της κακής κατάστασης των πνευμόνων των ζώων δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω μελέτη της ILK στο μοντέλο αυτό οπότε και προτιμήθηκε να μελετηθεί πιο εκτεταμένα το μοντέλο της μπλεομυκίνης.

Το μοντέλο της μπλεομυκίνης είναι αρκετά καλά χαρακτηρισμένο και κλινικά σχετικό με την ανθρώπινη πνευμονική ίνωση ενώ έχει προταθεί ότι στο μοντέλο αυτό συμβαίνει και EMT (*Tanjore et al., 2009, Wu et al., 2007*). Η χρώση του συνολικού κολλαγόνου με τη χρωστική *micro-sirius red* (εικ. 28) έδειξε ότι η πρόοδος της συσσώρευσης κολλαγόνου και επομένως της ινωτικής απόκρισης προχώρησε κατά τον κοινά αποδεκτό τρόπο με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η ποσοτικοποίηση

της ILK τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και επίπεδο μηνύματος έδειξε ότι η ILK αυξάνεται κατά τις ημέρες 2 και 4 ενώ μειώνεται κατά την ημέρα 9 (εικ. 29, διάγραμμα 15). Στα τελευταία χρονικά διαστήματα που αποτελούνται από τις ημέρες 15 και 23, τα επίπεδα της ILK αρχίζουν ξανά να αυξάνονται σε σχέση με την ημέρα 9 για να φτάσουν κατά την ημέρα 23 στα ίδια επίπεδα με αυτά του φυσιολογικού πνεύμονα (διάγραμμα 14). Κατά την ημέρα 15 παρατηρείται μια ασυμφωνία μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης και του mRNA της ILK αφού η μεν πρωτεΐνη εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με τα κοντρόλ ζώα ενώ το mRNA αυξημένο. Θεωρητικά, η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται σε μια διαφορετική ρύθμιση των επιπέδων της ILK κατά την ημέρα 15 σε σχέση με τα άλλα χρονικά διαστήματα ή στο γεγονός ότι για να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε επαρκείς ποσότητες στο κυτταρόπλασμα, η ILK θα πρέπει να σχηματίσει τριμερές σύμπλοκο με την PINCH και κάποια από τις παρβίνες  $\alpha$  και  $\beta$  (Fukada et al., 2003). Αυτό σημαίνει ότι η ασυμφωνία των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης της ILK θα μπορούσε να οφείλεται στην απουσία ή στη μειωμένη έκφραση κάποιου από τα άλλα μέλη του τριμερούς. Εν τούτοις, επειδή μέχρι στιγμής δεν έχει περιγραφεί κάποια διαφορετική ρύθμιση της ILK ή των άλλων δύο πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών σταδίων του μοντέλου της μπλεομυκίνης ή της πνευμονικής ίνωσης γενικότερα, πιστεύουμε ότι θα πρέπει να λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι κατά την ημέρα 15, ο πνευμονικός ιστός δεν παρουσιάζει πλέον καμία ομοιότητα με τον φυσιολογικό ιστό ο οποίος είναι διάτρητος, και το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του καταλαμβάνεται από αέρα. Αντίθετα, κατά την ημέρα 15, η συσσώρευση κολλαγόνου έχει μετατρέψει τον ιστό σε μια συμπαγή μάζα. Σε τέτοιες περιπτώσεις παρατηρείται συχνά το φαινόμενο η συνολική αύξηση μιας πρωτεΐνης να μη συμβαδίζει πάντα με την ποσοστιαία αύξησή της, κάτι που θα μπορούσε ίσως να δικαιολογήσει και τη διαφορά μεταξύ πρωτεΐνης και μηνύματος.

Για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την αυξομείωση των επιπέδων της ILK προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι οι πρώτες μορφολογικές αλλαγές παρατηρούνται κατά την ημέρα 9 (εικ. 30 γ,δ) οπότε και εμφανίζονται οι πρώτες ινωτικές εστίες. Κατά την ημέρα 15 ο αριθμός και το μέγεθος των ινωτικών αυξάνεται κατά πολύ και συνοδεύεται από πλήρη καταστροφή της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα αλλά και από εισροή πολλών



κυττάρων. Οι ινωτικές εστίες αλλά και οι νέοι κυτταρικοί πληθυσμοί εμφανίζουν αυξημένη ετερογένεια σε σχέση με την ILK αφού υπάρχουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές περιοχές και κύτταρα για την ILK (εικ. 30 ε,στ). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι μια συνολική ποσοτικοποίηση της ILK σε επίπεδο ιστού δεν μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την ILK κυρίως λόγω του ότι εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Για το λόγο αυτό επικεντρωθήκαμε στην ταυτοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν την ILK στον φυσιολογικό και τον ινωτικό πνεύμονα. Ήδη από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας διαπιστώσαμε ότι η ILK εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως τα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και φυσικά τα κύτταρα που περιέχονται στα κυψελιδικά τοιχώματα με οποία ασχοληθήκαμε διεξοδικότερα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με ότι ισχύει για τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς του πνεύμονα, ο ρόλος της ILK έχει μελετηθεί στα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αγγείων όπου και έχει δείχθει ότι ρυθμίζει, με αρνητικό τρόπο, την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και τη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων ρυθμίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό των αγγειακών τοιχωμάτων (*Wu et al., 2008, Kogata et al., 2009*).

Πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού για την ILK και τον δείκτη των τύπου I κυττάρων,  $\alpha$ -πρωτεΐνη των τύπου I κυττάρων, έδειξαν ότι η ILK εντοπίζεται στα κύτταρα τύπου I. Κατά την ημέρα 9 (εικ. 31), μεγάλο μέρος των κυττάρων αυτών αποπίπτουν ή νεκρώνονται σε απόκριση στη μπλεομυκίνη. Επίσης, κατά την ημέρα 9 παρατηρήθηκε και μερική καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των βρόγχων (εικ. 30 δ). Συνολικά, τα δύο αυτά αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ του ότι η μείωση των επιπέδων της ILK που παρατηρείται κατά την ημέρα 9 οφείλεται στη δραματική μείωση των διαφόρων επιθηλιακών πληθυσμών. Ανάλογα πειράματα για την ILK και τον δείκτη των τύπου II κυττάρων, επιφανειοδραστικός παράγοντας-β, έδειξαν ότι η ILK εντοπίζεται και στα τύπου II κύτταρα (εικ. 32). Τα τύπου II κύτταρα είναι κύτταρα που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, να μετακινούνται και να διαφοροποιούνται σε τύπου I κύτταρα ώστε να επιδιορθώνουν καταστροφές που συμβαίνουν στα κυψελιδικά τοιχώματα οι οποίες κατά κανόνα οδηγούν στην καταστροφή των τύπου I κυττάρων (*Adamson and Bowden, 1974, Bowden, 1981*). **Δεδομένου ότι και τα *in vitro* αποτελέσματά μας εμπλέκουν την ILK στη**

**μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων, προτείνουμε ότι η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετανάστευσης των τύπου II κυττάρων στην προσπάθεια του οργανισμού να αντικαταστήσει τα κατεστραμμένα τύπου I κύτταρα και να διατηρήσει τη λειτουργικότητα του πνευμονικού παρεγχύματος.**

Κατά τις ημέρες 15 και 23 ο πνευμονικός ιστός χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια και εισροή διάφορων κυτταρικών πληθυσμών. Λόγω του ότι η συσσώρευση του κολλαγόνου και η πλήρωση του κυψελιδικού χώρου από μόρια του εξωκυττάριου στρώματος φτάνουν σε πλατώ κατά την ημέρα 15, επικεντρωθήκαμε στο χρονικό διάστημα αυτό. Πειράματα συνεντοπισμού για την ILK και την πρωτεΐνη CD45 που είναι δείκτης των λευκοκυττάρων, έδειξε ότι, σε ένα βαθμό, η ILK εντοπίζεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (εικ. 35). Οι μέχρι τώρα δημοσιεύσεις δείχνουν ότι η ILK εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων (*Tan et al., 2002*), των T-λεμφοκυττάρων (*Liu et al., 2005*) και των μονοκυττάρων (*Yoshimi et al., 2006*).

Παρόμοια πειράματα έδειξαν ότι η ILK συνεντοπίζεται μερικώς με την πρωτεΐνη α-smooth muscle actin (α-SMA) που εντοπίζεται σε λεία μυϊκά κύτταρα και μυοϊνοβλάστες. Η συσσώρευση κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν την ILK θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αύξηση που παρατηρείται στα επίπεδα της ILK τις ημέρες 15 και 23 σε σχέση με την ημέρα 9. Επίσης, ο εντοπισμός της ILK σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να αποτελεί την αιτία της αύξησης της ILK την ημέρα 2 αφού το χρονικό διάστημα η φλεγμονή είναι το κύριο χαρακτηριστικό της απόκρισης του ιστού στη μπλεομυκίνη (*Chaudhary et al., 2005*).

Τα πειράματα συνεντοπισμού για την ILK και την α-SMA κατά το διάστημα των 15 ημερών έδειξαν ότι ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών περιορίζεται σε έναν μικρό αριθμό κυττάρων (εικ. 33) ενώ η πλειονότητα των μυοϊνοβλαστών δεν εκφράζει την ILK (εικ. 34). **Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να αποδειχθεί εξαιρετικά σημαντική αν ισχύει η πιθανότητα οι μυοϊνοβλάστες που εκφράζουν την ILK να αποτελούν έναν ξεχωριστό υποπληθυσμό.** Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι στο μοντέλο της μπλεομυκίνης λαμβάνει χώρα EMT αλλά σε περιορισμένο βαθμό (*Tanjore et al., 2009*) καθώς και το ότι η ILK εμπλέκεται, σύμφωνα με τα *in vitro* αποτελέσματά μας, στο κυψελιδικό EMT, δημιουργείται το ερώτημα του αν η ILK

εντοπίζεται αποκλειστικά στους ινοβλάστες που προέρχονται από το EMT οπότε και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τους ινοβλάστες αυτούς. Σε κάθε περίπτωση πάντως, περαιτέρω πειραματική ανάλυση είναι απαραίτητη για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε ο ρόλος της ιντεγκρινοσυνδεδεμένης κίνησης στην πνευμονική ίνωση. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν η ILK ρυθμίζει την έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών, κατά το κυψελιδικό EMT, οι οποίοι σχετίζονται με την κυτταρική μετανάστευση ενώ δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση της E-καντερίνης και κατά συνέπεια την έναρξη του EMT, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με το ρόλο της στο νεφρικό EMT. Επιπλέον, η ILK εμπλέκεται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες όπως η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, η κυτταρική εξάπλωση και η κυτταρική μετανάστευση. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, δεν εμπλέκεται στην επιβίωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Τα *in vivo* αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ILK εκφράζεται στα τύπου II πνευμονοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την αντικατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων τύπου I και κατά προέκταση για την επιδιόρθωση των κυψελιδικών τοιχωμάτων. Επίσης η ILK εκφράζεται και κύτταρα που εκφράζουν την  $\alpha$ -SMA και ίσως αποτελούν έναν υποπληθυσμό μυοϊνοβλαστών. Βάσει των αποτελεσμάτων προτείνουμε ότι ο ρόλος της ILK στις ινωτικές διαδικασίες και μηχανισμούς παρουσιάζει ιστοεξειδίκευση και ότι γενικότερα, ο ρόλος κάθε παράγοντα εμπλεκόμενου στην ινωτική διαδικασία θα πρέπει να εξετάζεται ξεχωριστά σε κάθε ιστό.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adamson I.Y., Bowden D.H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. 1974. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab. Invest.* 30: 35-42
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. *Garland Science*.
- American Thoracic Society ERS. 2000. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 646-64
- Andersson-Sjoland A., Garcia de Alba C., Nihlberg K., Becerril C., Ramirez R., Pardo A., Westergren-Thorsson G., Selman M. 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 40: 2129-40
- Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L. 1998. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules and Selectins. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 50 (2): 197-219.
- Attwell S., Roskelley C., Dedhar S. 2000. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene.*19: 3811-15
- Avizienyte E. and Frame M.C. 2005. Src and FAK signaling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 542-7
- Barrallo-Gimeno A. and Nieto M.A. 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 132: 3151-61
- Baum B., Settleman J., Quinlan M.P. 2008. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 19: 294-308
- Bett A.J., Haddara W., Prevec L., Graham F.L. 1994. An efficient and flexible system for construction of adenoviruses vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8802-06
- Boudeau J., Saaverda D.M., Barton G.J., Alessi D.R. 2006. Emerging roles of pseudokinases. *TRENDS in Cell Biology.* 16 (9): 443-52
- Bowden D.H. 1981. Alveolar response to injury. *Thorax.* 36: 801-4
- Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet, 2007. Accessed at [www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs\\_2007.pdf](http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2007.pdf), June 1, 2009.
- Chaudhary N.I., Schnapp A., Park J.E. 2005. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 173: 769-76

- Chilosi M., Poletti V., Zamo A., Lestani M., Montagna L., Piccoli P., Pedron S., Bertaso M., Scarpa A., Muler B., Cancellieri A., Maestro R., Semenzato G., Doglioni C. 2003. Aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 162: 1495-502
- Corvol H., Flamein F., Epaud R., Clement A., Guillot L. 2009. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 41: 1643-51
- Coultas D.B., Zumwalt R.E., Black W.C., Sobonya R.E. 1994. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 967-72
- Crouch E. 1990. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.* 259 (4): 159-84
- Darby I.A., Hewitson T.D. 2007. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. *International Review of Cytology.* 257: 143-72
- Delcommenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J., Dedhar S. 1998. Phosphoinositide-3-OH- kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 11211-16
- Derynck R. and Feng X.H. 1997. TGF- $\beta$  receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333 (2): F105-50
- Derunck R. and Zhang Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. *Nature.* 425: 577-84
- Drakopanagiotakis F., Xifteri A., Polychronopoulos V., Bouros D 2008. Apoptosis in lung injury and fibrosis. *Eur. Respir. J.* 32 (6): 1631-38
- Friedman S.L. 2000. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *The Journal of Biological Chemistry.* 275 (4): 2247-50
- Friedrich E.B., Liu E., Sinha S., Cook S., Milstone D.S., MacRae C.A., Mariotti M., Kuhlencordt P.J., Force T., Rosenzweig A., St-Arnaud R., Dedhar S., Gerszten R.E. 2004. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol. Cell Biol.* 24: 8134-44
- Friedrich E.B., Sinha S., Li L., Dedhar S., Force T., Rosenzweig A., Gerszten R.E. 2002. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J. Biol. Chem.* 277: 16371-75
- Fukada T., Chen K., Shi X., Wu C. 2003. PINCH-1 is an obligate partner of Integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility and survival. *The journal of Biological Chemistry.* 278 (51): 51324-33
- Gabbiani G., Hirschel B.J., Ryan G.B., Statkov P.R., Majno G. 1972. Granulation tissue as a contractile organ. A study of a typical case. *Cancer.* 28: 719-34

- Gabbiani G., Ryan G.B., Majno G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 27: 549-50
- Gauldie J., Bonniaud P., Sime P., Ask K., Kolb M. 2007. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem. Soc. Trans.* 35 (4): 661-4
- Gilles C. Polette M., Piette J., Delvigne A.C., Thompson E.W., Foidart J.M., Birembaut P. 1996. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J. Pathol.* 180 (2): 175-80
- Gkretsi V., Mars W.M., Bowen W.C., Barua L., Yang Y., Guo L., St-Arnaud R., Dedhar S., Wu C., Michalopoulos G.K. 2007. Loss of Integrin linked Kinase from mouse hepatocytes in vitro and in vivo results in apoptosis and hepatitis. *Hepatology*. 45 (4): 1025-34
- Grande N.R., Peao M.N.D., de Sa C.M., Aguas A.P. 1998. Lung fibrosis induced by bleomycin: structural changes and overview of recent advances. *Scanning Microscopy*. 12 (3): 487-94
- Grashoff C., Aszodi A., Sakai T., Hunziker E.B., Fassler R. 2003. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep.* 4 (4): 432-8
- Grashoff C., Thievensen I., Lorenz K., Ussar S., Fassler R. 2004. Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner. *Current Opinion in Cell Biology*. 16: 565-71
- Green F. 2002. Overview of pulmonary fibrosis. *Chest*. 122: 334-39
- Hannigan G.E., Leung-Hagesteijn C., Fitz-Gibbon L., Coppolino M.G., Radeva G., Filmus J., Bell., Dedhar S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*. 379: 91-96
- Hannigan G.E., Troussard A.A., Dedhar S. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat. Rev. Cancer*. 5: 51-63
- Iwano M., Plieth D., Danoff T.M., Xue C., Okada H., Neilson E.G. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110 (3): 341-50
- Izbicki G., Segel M.J., Christensen T.G., Conner M.W., Breuer R. 2002. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Path.* 83: 111-19
- Jester J.V., Huang J., Petroll W.M., Cavanagh H.D. 2002. TGFβ induced myofibroblast differentiation of rabbit keratinocytes requires synergistic TGFβ, PDGF and integrin signaling. *Exp. Eye Res.* 75: 645-57
- Junqueira L.G., Carneiro J., Kelley R.O. 1989. Basic Histology
- Kalluri R., Weinberg R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*. 119 (6): 1420-28
- Kim J.W., Ko S.H., Cho J.H., Sun C., Hong O.K., Lee S.H., Kim J.H., Lee K.W., Kwon H.S., Lee J.M., Song H.Y., Yoon K.H. 2008. Loss of beta-cells

with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci.* 1 (13): 6022-33

- Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., Robillard L., Galvez M.G., Brumwell A.N., Sheppard D., Chapman H.A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *PNAS.* 103 (35): 13180-85
- King T.E., Schwarz M.I., Brown K. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 1025-32
- Kisseleva T., Brenner D.A. 2008. Mechanisms of Fibrogenesis. *Exp. Biol. Med.* 233: 109-22
- Klahr S. and Morissey J. 2002. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283: F861-F875
- Kogata N., Tribe R.M., Fassler R., Way M., Adams R.H. 2009. Integrin-linked kinase controls vascular wall formation by negatively regulating Rho/RACK-mediated vascular smooth muscle cell formation. *Genes Dev.* 23 (19): 2278-83
- Kolb M., Bonniaud P., Galt T., Sime P.J., Kelly M.M., Margetts P.J., Gauldie J. 2002. Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 gene to lungs of fibrosis-prone and fibrosis-resistant mouse strains. *Am. J. respi. Cell Mol. Biol.* 27: 141-50
- Korfei M, Ruppert C., Mahavadi P., Henneke I., Markart P., Koch M., Lang G., Fink L., Bohle R.M., Seeger W., Weaver T.E., Guenther A. 2008. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178: 273-89
- Kuba K., Imai I., Penninger J.M. 2006. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (3): 271-6
- Lee Y.I., Kwon Y.J., Joo C.K. 2004. Integrin-linked kinase function is required for transforming factor  $\beta$ -mediated epithelial to mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 316: 997-1001
- Lange A., Wickstrom S.A., Jakobson M., Zent R., Sainio K., Fassler R. 2009. Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature.* 461 (7266): 1002-1006
- Legate K.R., Montanez E., Kudlacek O., Fassler R. 2006. ILK, PINCH and parvin: the Tapp of integrin signalling. *Nature.* 7: 20-31
- Legate K.R., Fassler R. 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails. *Journal of Cell Science.* 122: 187-98
- Leung-Hagesteijn C., Mahendra A., Naruszewicz I., Hannigan G.E. 2001. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J.* 20 (9): 2160-70



- Li F., Zhang Y., Wu C. 1999. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J. Cell Sci.* 112: 4589-99
- Li S., Guan J., Chien S. 2005. Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7: 105-50
- Li Y., Dai C., Wu C., Liu Y. 2007. PINCH-1 promotes tubular epithelial-to-mesenchymal transition by interacting with Integrin-linked Kinase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 2534-43
- Li Y., Tan X., Dai C., Stolz D.B., Wang D., Liu Y. 2009. Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20 (9): 1907-18
- Li Y., Yang J., Dai C., Wu C., Liu Y. 2003. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *Journal of Clinical Investigation.* 112: 503-16
- Lin S.L., Kisseleva T., Brenner D.A., Duffield J.S. 2008. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *The American journal of Pathology.* 173 (6): 1617-27
- Liu E., Sinha S., Williams C., Cyrille M., Heller E., Snapper S.B., Georgopoulos K., St-Arnaud R., Force T., Dedhar S., Gerszten R.E. 2005. Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol. Cell Biol.* 25 (24): 11145-55
- Mackinnon A.C., Qadota H., Norman K.R., Moerman D.G., Williams B.D. 2002. C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* 12: 787-97
- Maher T.M., Wells A.U., Laurent G.J. 2007. Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *Eur. Respir. J.* 30: 835-39
- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298: 1912-34
- McPhee T.R., McDonald P.C., Oloumi A., Dedhar S. 2008. Integrin-Linked kinase Regulates E-Cadherin Expression Through PARP-1. *Developmental Dynamics.* 237: 2737-47
- Mills J., Digicaylioglu M., Legg A.T., Young C.E., Young S.S., Barr A.M., Fletcher L., O'Connor T.P., Dedhar S. 2003. Role of integrin-linked kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 23: 1638-48
- Moore B.B. and Hogaboam C.M. 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294: L152-L160
- Moustakas A., Heldin C.H. 2005. Non-Smad TGF- $\beta$  Signals. *Journal of Cell Science.* 118: 3573-84
- Muggia F.M., Louie A.C., Sikic B.I. 1983. Pulmonary toxicity of antitumor agents. *Cancer Treat Rev.* 10: 221-43

- Mutsaers S.E., Bishop J.E., McGrouther G., Laurent G.J. 1997. Mechanisms of Tissue Repair: from Wound Healing to Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 5-17
- Nho R.S., Xia H., Kahm J., Kleidon J., Diebold D., Henke C.A. 2005. Role of integrin-linked kinase in regulating phosphorylation of Akt and fibroblast survival in type I collagen matrix through a beta1 integrin viability signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 280 (28): 26630-9
- Nikolopoulos S.N., Turner C.E. 2000. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell Biol.* 151: 1435-48
- Novak A., Hsu S.C., Leung-Hagesteijn C., Radeva G., Papkoff J., Montesano R., Roskelley C., Grosschedl R., Dedhar S. 1998. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and  $\beta$ -catenin signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 4374-79
- Paccione R.J., Miyazaki H., Patel V., Waseem A., Gutkind J.S., Zehner Z.E., Yeudall W.A. 2008. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol. Cancer Ther.* 7 (9): 2894-903
- Peinado H., Olmeda D., Cano A. 2007. Snail, ZEB and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer.* 7 (6): 415-28
- Persard S., Troussard A., McPhee T., Mulholland D., Dedhar S. 2001. Tumor suppressor PTEN inhibits beta-catenin nuclear localization and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation. *J. Cell Biol.* 153: 1161-73
- Persad S., Attwell S., Gray V., Mawji N., Deng J.T., Leung D., Yan J., Sanghera J., Walsh M.P., Dedhar S. 2001b. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem.* 276: 27462-69
- Petrov V.V., Fagard R.H., Lijnen P. 2000. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces angiotensin converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblasts during their differentiation to myofibroblasts. *JRAAS.* 1: 342-52
- Pinzani M., Marra F., Carloni V. 1998. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver.* 18 (1): 2-13
- Remuzzi G. and Bertani T. 1998. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N. Engl. J. Med.* 339: 1448-56
- Rennard S.I., Bitterman P.B., Crystal R.G. 2008. Response of the lower respiratory track to injury. Mechanisms of repair of the parenchymal cells of the alveolar wall. *Chest.* 1983 (84): 735-9

- Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Poitout V. 2004.  $\beta$ -cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 53: 119-24
- Rosenberger G., Jantke I., Gal A., Kutsche K. 2003. Interaction of  $\alpha$ PIX (ARHGEF6) with  $\beta$ -parvin (PARVB) suggests an involvement of  $\alpha$ PIX in integrin-mediated signaling. *Hum. Mol. Genet.* 12: 155-67
- Sakai T., Li S., Docheva D., Grashoff C., Sakai K., Kostka G., Braun A., Pfeifer A., Yurchenco P.D., Fassler R. 2003. Integrin-linked kinase is required for polarizing the epiblast, cell adhesion and controlling actin accumulation. *Genes Dev.* 17: 926-40
- Schurch W., Seemayer T.A., Gabbiani G. 1998. The myofibroblasts: a quarter century after its discovery. *Am. J. Surg. Pathol.* 22 (2): 141-7
- Scotton C.J. and Chambers R.C. 2007. Molecular targets in pulmonary fibrosis. The myofibroblast in focus. *Chest*. 132: 1311-21
- Selman M., Pardo A. 2003. The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29: S93-S96
- Selman M., Pardo A., Kaminski N. 2008. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs. *PLOS Med.* 5 (3): 0373-80
- Shroder M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 65 (6): 862-94
- Sime P.J., Xing Z., Graham F.L., Csaky K.G., Gauldie J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of Clinical Investigation*. 100 (4): 768-77
- Simon R.H., Scott M.J., Reza M.M., Killen P.D. 1993. Type IV collagen production by rat pulmonary alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell mol. Biol.* 8 (6): 640-46
- Takanami I. 2005. Increased expression of integrin-linked kinase is associated with sorter survival in in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 5: 1-7
- Tan C., Mui A., Dedhar S. 2002. Integrin-linked kinase regulates inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in an NF-kappa B-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 277 (5): 3109-16
- Tanjore H., Xu X.C., Polosukhin V.V., Degryse A.L., Li B., Han W., Sherill T.P., Plieth D., Neilson E.G., Blackwell T.S., Lawson W.E. 2009. Contribution of epithelial derived fibroblasts to bleomycin induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (7): 657-65
- Thierry J.P. and Sleeman J.P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature*. 7: 131-42
- Troussard A.A., Mawji N.M., Ong C., Mui A., St-Arnaud R., Dedhar S. 2003. Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J. Biol. Chem.* 278: 22374-78

- Umezawa H. 1974. Chemistry and mechanism of action of bleomycin. *Fed Proc.* 33: 2296-302
- Wu C., Keightley S.Y., Leung-Hagesteijn C., Radeva G., Coppolino M., Goicoechea S., McDonald J.A., Dedhar S. 1997. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 273 (1): 528-36
- Wu S., Platteau A., Chen S., McNamara G., Whitsett J., Bancalari E. 2009. Conditional over-expression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* In press.
- Wu Y., Huang Y., Herring B.P., Gunst S.J. 2008. Integrin-linked kinase regulates smooth muscle differentiation marker gene expression in airway tissue. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295 (6): L988-97
- Wu Z., Yang L., Cai L., Zhang M., Cheng X., Yang X., Xu J. 2007. Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an  $\alpha$ -smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respiratory Research.* 8: 1-11
- Wynn T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation.* 117 (3): 524-29
- Wynn T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology.* 214: 199-210
- Yamada M., Kuwano K., Maeyama T., Hamada N., Yoshimi M., Nakanishi Y., Kasper M. 2008. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol.* 129: 453-62
- Yamagi S., Suzuki A., Kanamori H., Mishima W., Yoshimi R., Takasaki H., Takabayashi M., Fujimaki K., Fujisawa S., Inshigatsubo Y. 2004. Affixin interacts with  $\alpha$ -actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. *J. Cell. Biol.* 165: 539-51
- Yang J., Liu Y. 2001. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *American Journal of Pathology.* 159 (4): 1465-75
- Yang Y., Guo L., Blattner S.M., Mundel P., Kretzler M., Wu C. 2005. Formation and phosphorylation of the PINCH-1-integrin linked kinase-alpha-parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture, and survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (7): 1966-76
- Yano H., Mazaki Y., Kurokawa K., Hanks S.K., Matsuda M., Sabe H. 2004. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J. Cell. Biol.* 166: 283-95
- Yoshimi R., Yamaji S., Suzuki A., Mishima W., Okamura M., Obana T., Matsuda C., Miwa Y., Ohno S., Ishigatsubo Y. 2006. The gamma-parvin-

integrin-linked kinase complex is critically involved in leukocyte-substrate interaction. *J. Immunol.* 176 (6): 3611-24

- Zavadil J., Germak L., Soto-Nieves N., Bottinger E.P. 2004. Integration of TGF-beta/SMAD and Jagged1/Notch signaling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 23 (5): 1155-65
- Zeisberg E.M., Potenta S., Xie L., Zeisberg M., Kalluri R. 2007. Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* 67 (21): 10123-28
- Zeisberg M., Strutz F., Muller G.A. 2001. Renal fibrosis: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10: 315-20
- Zervas C.G., Gregory S.L., Brown N.H. 2001. *Drosophilo* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 152: 1007-18
- Zhang Y., Ikegami T., Honda A., Miyazaki T., Bouscarel B., Rojkind M., Hyodo I., Matsuzaki Y. 2006. Involvement of Integrin-Linked Kinase in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis in Rats. *Hepatology.* 44 (3): 612-22
- Zoltan-Jones A., Huang L., Chatak S., Toole B.P. 2003. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 45801-10

# **ABSTRACT**

Fibrosis is a pathologic condition characterized by increased production and decreased degradation of extracellular matrix components, especially collagen. The cell that produces collagen and therefore is of significant importance for fibrogenesis, is the myofibroblasts. As far as molecular mechanisms are concerned, the fibrotic molecular mechanism resembles the normal wound healing response. The wound healing response involves an initial inflammatory phase that is followed by myofibroblasts proliferation and collagen accumulation. Finally, during tissue regeneration, myofibroblasts undergo apoptosis and collagen in excess is degraded. During fibrosis, myofibroblasts escape apoptosis and collagen production continues till tissue's normal architecture and function is compromised.

Fibrosis can occur in every human tissue. Therefore, although there are basic fibrotic mechanisms that are common for every tissue, there are also important fibrotic features that exhibit tissue specificity. Recently, myofibroblast origin is regarded as one of the features exhibiting tissue specificity since it has been proven that myofibroblasts can origin from several sources including the epithelium, endothelium, resident fibroblasts, bone marrow derived cells, hepatic stellate cells etc.

The present study focuses on pulmonary fibrosis which is a common feature of a large group of lung diseases, called interstitial lung diseases, ILDs. The most common ILD is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) for which there is no effective treatment available since the molecular mechanisms underlying the disease are unknown. One of the unknown elements in the pathogenesis of IPF is the origin of myofibroblasts since the existing studies are inconclusive, implicating epithelia, endothelial, bone marrow derived and resident sources, to a bigger or smaller extent, in myofibroblasts accumulation. Identification of the primary myofibroblast source, or of the extent that each source contributes to the overall accumulation is considered to be crucial for the generation of an effective treatment.

Integrin-linked kinase (ILK) is a serine/threonine kinase involved in the regulation of several cell processes. Due to its interaction with the  $\beta 1$  and  $\beta 3$  cytoplasmic tails of integrins, ILK is involved in the regulation of structural functions such as maintenance of tissue integrity and cell shape, resistance to mechanical forces and cell movement. Moreover, it has been proposed that ILK phosphorylates substrates such

as protein kinase B (Akt) and glucogen synthase kinase-3 $\beta$ , meaning that ILK is indirectly involved in the regulation of several other functions involving resistance to apoptosis, angiogenesis etc.

As far as fibrosis is concerned, ILK has been extensively studied in the kidney and to a lesser extent in the liver. In both cases, it is involved in mechanisms regarding myofibroblasts production. In renal fibrosis, ILK mediates, in response to TGF- $\beta$ , the initiation of epithelial to mesenchymal transition (EMT), a process through which epithelial cells transform into myofibroblasts. In liver fibrosis, ILK mediates a similar process through which hepatic stellate cells transform into myofibroblasts. However, ILK's role in pulmonary fibrosis has not been studied so far.

In order to examine ILK's role in pulmonary fibrosis, we performed both an in vitro and an in vivo approach. For the in vitro study, human alveolar epithelial cells of the A549 cell line were used. Cells were incubated with human recombinant TGF- $\beta$  in order to induce acquisition of fibrotic features and EMT. After we showed that ILK is upregulated in response to TGF- $\beta$  through a smad-dependent mechanism, we used the siRNA technique in order to unravel ILK's role in alveolar EMT. Our results showed that, in contrast to renal fibrosis, ILK is not involved in the initiation of EMT but in later stages such as the expression of mesenchymal markers and possibly cell migration. Using the same technique, we also evaluated ILK's role in several cells processes and our results showed that it is involved in maintenance of cell shape, cell adhesion and cell migration. However, in contrast to its role in many other cell types, ILK is not involved in protection from apoptosis in alveolar epithelial cells.

For the in vivo study we initially used the adenovirus TGF- $\beta$  overexpression model but our results were inconclusive. Then we used the bleomycin model where we showed that ILK is initially increased in response to bleomycin. During the intermediate time intervals, it decreases significantly while at the later time points it tends to increase till it reaches control levels. To better understand the reasons of the variations in ILK levels, we performed immunohistochemistry and double immunofluorescent experiments so as to define the cell populations that express ILK in every time interval. Our results showed that ILK's downregulation during intermediate intervals is due to the apoptosis and/or necrosis of epithelial populations



which express ILK. The re-increase observed during late time intervals is due to the influx of cell populations expressing ILK to a bigger or a lesser extent such as cells of the immune system and a subpopulation of myofibroblasts.

Conclusively, our results show that ILK is a multifunctional protein that can have distinct roles among different fibrotic tissues. We believe that our findings support the idea that key molecules and mechanisms involved in fibrosis should be examined in a tissue specific manner.