



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Μελέτη της Υπερέκφρασης της Calreticulin στη Νεφρική Ύψωση

Διδακτορική Διατριβή

της φοιτήτριας

Νίκης Πράκουρα

Αθήνα

23 Σεπτεμβρίου 2013



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**

Β Ε Β Α Ι Ω Σ Η

Βεβαιώνεται ότι η κα **Πράκουρα Νίκη** του Ανδρέα και της Μαγδαληνής με αριθμό δελτίου ταυτότητας Φ 234030 / Τ.Α. Χαλκίδος, υπέβαλλε στις 19-11-2008 αίτηση για ορισμό τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, σύμφωνα με το άρθρο 9 του Ν. 3685/08, προκειμένου να εκπονήσει διδακτορική διατριβή ως Διπλωματούχος του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «**Μοριακή Ιατρική**».

Η ΓΣΕΣ της Ιατρικής Σχολής, στη συνεδρίασή της στις 19/12/2008 όρισε τους κ.κ. Δ. Βλαχάκο Αναπλ. Καθηγητή ως Επιβλέποντα, Π. Σιδερά Ερευνητή Α', Α. Χαράνη Ερευνητής Β', ως μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής η οποία θα συνεργαστεί με την υποψήφια διδάκτορα Νίκη Πράκουρα για τον καθορισμό του θέματος της διδακτορικής διατριβής και θα παρακολουθεί την εν γένει πρόοδο αυτής. Η πιο πάνω επιτροπή με δήλωση της καθόρισε ως θέμα της διδακτορικής διατριβής της «**Μελέτη της υπερέκφρασης της Calreticulin στη Νεφρική Ινώση**».

Η ΓΣΕΣ της Ιατρικής Σχολής, στη συνεδρίαση της, της 4-11-2008 όρισε ως αφετηρία για τον υπολογισμό του χρόνου εκπόνησης διδακτορικής διατριβής την ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από την ΓΣΕΣ, σύμφωνα με το άρθρο 9 του Ν. 3685/08.

Ο χρόνος εκπόνησης Διδακτορικής διατριβής δεν μπορεί να είναι μικρότερος των 3 ετών από την ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από την ΓΣΕΣ, σύμφωνα με το άρθρο 9 του Ν. 3685/08.

Επομένως ο ελάχιστος χρόνος (Ζετία) που απαιτείται για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής συμπληρώνεται την 19-12-2011 .

Η Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής





ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Πρόεδρος: Καθηγητής Μελέτιος Α.Κ. Δημόπουλος
Αν. Πρόεδρος: Καθηγητής Ευστράτιος Πατσούρης

Διοικητικό Συμβούλιο

Διευθυντές Τομέων

Βασικών Επιστημών
Καθηγητής Π. Σκανδαλάκης

Κλινικοεργαστηριακός
Καθηγητής Α. Τσακρής

Παθολογίας
Καθηγητής Ν. Ζακόπουλος

Χειρουργικός
Καθηγητής Γ. Κουράκλης

Υγείας-Μητέρας-Παιδιού
Καθηγητής Δ. Μπότσης

Κοινωνικής Ιατρικής,
Ψυχιατρικής και Νευρολογίας
Καθηγητής Α. Χατζάκης

Γραμματέας Ιατρικής Σχολής
Νικόλαος Κ. Ζωγράφος

Αθήνα, 18/6/13
Αρ. Πρωτ. 4151

ΠΡΟΣ : Καθηγητή κ. Δ. Βλαχάκο
Ερευνητή Α' κ. Π. Σιδερά
Ερευνητή Β' κ. Α. Χαρώνη
Καθηγητή, κ. Δ. Μπούμπα
Καθηγητή, κ. Η. Λιανό
Επικ. Καθηγήτρια, κ. Χ. Γιακοπούλου
Ερευνήτρια Γ', κ. Γ. Δροσοπούλου

ΚΟΙΝ. 1. κ. Νίκη Πράκουρα
2. Γραμματεία Μεταπτυχιακών Σπουδών.

ΘΕΜΑ: Έγκριση ορισμού Επταμελούς Επιτροπής της
Διδακτορικής Διατριβής κ. Νίκης Πράκουρα στα πλαίσια
του ΠΜΣ «Μοριακή Ιατρική»

Σχετ. α) Το σχετικό έγγραφο των Μελών της Συμβουλευτικής
Τριμελούς Επιτροπής
β) Το σχετικό έγγραφο του
Προέδρου των Μεταπτυχιακών Σπουδών
Καθηγητή κ. Μ. Α. Δημόπουλου.

Σας γνωρίζουμε, ότι η Γ.Σ. Ειδικής Σύνοψης της
Ιατρικής Σχολής, στην συνεδρίαση της 6-6-2013 ενέκρινε την
Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής
της Διδακτορικής φοιτήτριας κ. Νίκης Πράκουρα στα πλαίσια
του ΠΜΣ «Μοριακή Ιατρική».

Διαβιβάζοντας συνημμένα τα πιο πάνω σχετικά, μαζί με
το έγγραφο των μελών της Τριμελούς Συμβουλευτικής
Επιτροπής, σας παρακαλούμε για τις ενέργειες της
αρμοδιότητάς σας.

Μετατίμης
Ο Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής

Καθηγητής Μελέτιος Α.Κ. Δημόπουλος



M. Νικόλαος Ζωγράφος

"Επειδή η διάσημος των Ιατρών Σχολή, του Πρυτάνεως επινεύσαντος ες τους εαυτοίς διδάκτορας δοκιμάσαι με καταξίωσιν, αυτή τε και τη Πρυτανική δημοσία τηνδε δίδωμι πίστιν. Ηγήσθε με τους διδάξαντας με ταύτην την τέχνην, ίσα γενέτησιν εμοίσι, τη δε τέχνη μηδαμή επ' ευμαρή χρήσεσθαι τη εμαυτού εν τω βίω, αλλ' εις δόξαν θεού και ανθρώπων σωτηρίην και της πίστεως αυτής τιμήν τε και όνησιν παν με ό,τι ιητρού έργον εστί, πιστώσ και ακριβώς κατά δύναμιν και κρίσιν την εμήν επιτελέων, τοίσι δε νοσέουσιν, ήν τε πλούσιοι τυχώσιν όντες ήν τε πένητες, ομοίη σπουδή την εκ τέχνης επαγινέων επικουρίην μηδέ, παραβόλως αποπειρώμενος την τεο ζόην αποκυβεύσειν μηδ' τητρεύσειν επί χρηματισμώ ή φάτιος ιμέρω. Ες οικίας δε οκόσας αν εσίω, εσελεήσεσθαι επ' ωφελείη καμνόντων εκτός εών πάσης αδικίης. Α δ' αν εν θεραπήη ή ιδω ή ακούσω ή και άνευ θεραπήης κατά βίον ανθρώπων, ά μη μήποτε εκλαλέεσθαι έξω, σιγήσεσθαι άρρητα ηγευμένος τα τοιαύτα, της δε τέχνης επιμελήσεσθαι κατά δύναμιν σπουδήν πλείστην ποιευμένος ακριβώςαι ταύτης τα θέσμια. Τοίσι δε ομοτέχνοισι φιλόφρονα και φιλάνθρωπον εμαυτόν αεί παρέξειν και σφέας αδελφοίσιν ίσον επικρινέοιν άρρεσι πάν σφι προθύμως συμβαλλόμενος εξ ότεο αν ωελίη γένοιτο τοίσι κάμνουσι. Ταύτην μοι την επαγγελίην επιτελέα ποιέοντι είη επαύρασθαι βίου και τέχνης και Θεόν κτήσασθαι αρηγόνα, παραβαίνοντι δε τανάντια τουτέων".

Ορκος Ιπποκράτη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
2	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
2	SUMMARY.....	10
3	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
3.1	ΝΕΦΡΟΙ.....	11
3.1.1	Δομή του νεφρού.....	11
3.1.2	Λειτουργία του νεφρώνα και παραγωγή των ούρων.....	14
3.2	ΙΝΩΣΗ.....	15
3.2.1	Η παθογένεση της ίνωσης.....	15
3.2.2	Οι ινοβλάστες ως κύριοι μεσολαβητές της ινωτικής διαδικασίας.....	16
3.2.3	Οι μοριακοί μηχανισμοί της ίνωσης.....	18
3.2.3.1	Ο γενικός μηχανισμός της ινωτικής διαδικασίας.....	18
3.2.3.2	Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυτοκινών.....	19
3.2.3.3	Ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα TGF-β.....	22
3.2.3.3.1	Επαγωγή της ινωτικής διαδικασίας.....	23
3.2.3.3.2	Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β.....	25
A)	Το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών.....	25
B)	Άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.....	27
3.2.3.3.3	Η μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης ως αποτέλεσμα της δράσης του παράγοντα TGF-β.....	29
A)	Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	29
B)	Έλεγχος της απόπτωσης.....	30
Γ)	Επαγωγή του φαινομένου EMT.....	30
3.2.4	Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ως μεσολαβητής της νεφρικής βλάβης.....	31
3.2.5	Ζωικά μοντέλα ίνωσης.....	34
3.2.5.1	Μοντέλα νεφρικής ίνωσης: η μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε τρωκτικά.....	34
3.3	Η ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΑΝ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΝΕΦΡΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	38
3.3.1	Εφαρμογή της πρωτεωμικής ανάλυσης στο ινωτικό μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά.....	39

3.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ CALRETICULIN: ΕΝΑ ΜΟΡΙΟ ΜΕ ΠΟΛΛΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ.....	41
3.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	43
4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
4.1 ΥΛΙΚΑ.....	44
4.1.1 Διαλύματα.....	44
4.1.1.1 Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης.....	44
4.1.1.2 Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου.....	44
4.1.1.3 Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blotting).....	44
4.1.1.4 Άλλα διαλύματα.....	45
4.1.2 Θρεπτικά υλικά Κυτταροκαλλιέργειας.....	45
4.1.2.1 Θρεπτικό υλικό για βακτηριακές καλλιέργειες <i>E.coli</i>	45
4.1.2.2 Θρεπτικό υλικό για καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HK-2.....	46
4.1.3 Αντιβιοτικά.....	46
4.1.4 Στελέχη <i>E.coli</i>	46
4.1.5 Κυτταρικές σειρές.....	46
4.1.6 Ολιγονουκλεοτίδια.....	47
4.1.6.1 Ολιγονουκλεοτίδια για κατασκευή ειδικού shRNA μορίου για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin.....	47
4.1.6.2 Εκκινήτες για αντίδραση Real-time PCR.....	47
4.1.7 Αντισώματα.....	48
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
4.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών (HK-2).....	49
4.2.2 Κατασκευή κυτταρικών σειρών HK-2 με σταθερή υπερέκφραση ή υποέκφραση της πρωτεΐνης calreticulin.....	50
4.2.2.1 Κατασκευή κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα που φέρει το cDNA για την πρωτεΐνη calreticulin.....	50
4.2.2.2 Κατασκευή κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα που φέρει ειδικό shRNA μόριο για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin.....	52
4.2.2.3 Σταθερή διαμόλυνση των κυττάρων HK-2 με πλασμίδιο που φέρει το cDNA για την πρωτεΐνη calreticulin ή ειδικό shRNA μόριο για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin.....	52
4.2.3 Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	54
4.2.3.1 Γενική διαδικασία.....	54
4.2.3.2 Ειδική διαδικασία για την ανίχνευση κολλαγόνου I σε ξεχωριστά κυτταρικά κλάσματα.....	55

4.2.4	Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	56
4.2.5	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)....	57
4.2.6	Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blotting).....	58
4.2.7	Ανοσοφθορισμός.....	60
4.2.8	Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA και σύνθεση cDNA.....	62
4.2.9	Αντίδραση Real-time PCR.....	63
4.2.10	Μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε τρωκτικά.....	64
4.2.11	Χρήση διαγονιδιακών ποντικών ετερόζυγων για την calreticulin.....	65
4.2.12	Ιστολογική χρώση με Sirius Red.....	65
4.2.13	Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	66
4.2.14	Έλεγχος της απόπτωσης.....	66
4.2.15	Έλεγχος της κινητικότητας των κυττάρων.....	68
4.2.16	Στατιστική ανάλυση.....	68
5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
5.1	Το επίπεδο έκφρασης της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα HK-2 επηρεάζει χαρακτηριστικά όπως η κινητικότητα, το ενδοκυτταρικό στρες, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση.....	69
5.2	Η υπερέκφραση ή υποέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα μεταβάλλει την έκφραση επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών.....	74
5.3	Τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν το εκκριτικό προφίλ των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων.....	76
5.4	Τα σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin in vivo παρουσιάζουν αυξημένο κυτταρικό στρες και απόπτωση.....	78
5.5	Ποντίκια ετερόζυγα για την calreticulin παρουσιάζουν βελτιωμένη νεφρική εικόνα και μειωμένη συσσώρευση κολλαγόνου στο μοντέλο UUO.....	80
5.6	Τα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια έχουν αλλαγμένη έκφραση βασικών μορίων που ρυθμίζουν την πρόοδο της ίνωσης.....	82
5.7	Στα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια τα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα προστατεύονται από την απόπτωση κατά την πρόοδο της ίνωσης.....	84
5.8	Τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν την έκφραση μορίων που δρουν ανοδικά ή καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β1....	85
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95
8	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	104
9	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	105

1 ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο-ΕΚΤ) και Ελληνικούς εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος “Εκπαίδευση και Δια βίου Μάθηση” του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ)-Ερευνητικό Πρόγραμμα Χρηματοδότησης: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Επίσης, υποστηρίχθηκε από πόρους από το πρόγραμμα Αριστεία # 2681 “Νεφρική Ίνωση” από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας του Υπουργείου Εκπαίδευσης στον Α. Χαρόνη, και από πόρους από το Ίδρυμα Μποδοσάκη.

Είμαστε ευγνώμονες στον Δρ. Δημήτριο Βλαχάκο για την εποπτεία της μελέτης και στον Δρ. Μιχάλη Κατσίμπουλα για την πολύτιμη βοήθειά του με τα ζωικά μοντέλα. Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε, ακόμα, τον Δρ. Σταμάτη Παγκάκη και την Ελένη Ριγανά για την υποστήριξη σε τεχνικές απεικόνισης, καθώς και τον Πέτρο Μουστάρδα για τη βοήθειά του σε ιστοχημικές τεχνικές.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Α. Χαρόνη για την εμπιστοσύνη αυτής της μελέτης και την υποστήριξη καθόλη της διάρκειά της, όλα τα μέλη της επιτροπής της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθώς και όλους όσους μου συμπαραστάθηκαν κατά τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των συναδέλφων μου και της οικογένειάς μου.



2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νεφρική ίνωση αποτελεί το κοινό ανατομικό γνώρισμα που χαρακτηρίζει την πρόοδο της χρόνιας νεφρικής νόσου (XNN), μια βασική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Σε προηγούμενη μελέτη, δείξαμε ότι κατά την ανάπτυξη νεφρικής ίνωσης στο μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα (UUO) στον αρουραίο, η πρωτεΐνη calreticulin υπερεκφράζεται στα επιθηλιακά σωληναρικά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε *in vitro* και *in vivo* προσεγγίσεις με σκοπό να εξετάσουμε το ρόλο της calreticulin στα σωληναρικά κύτταρα και τη συνεισφορά της στην εξέλιξη της ίνωσης. Δείχνουμε ότι σε καλλιεργούμενα νεφρικά σωληναρικά κύτταρα η υπερέκφραση της calreticulin επάγει την απόκτηση ενός αλλαγμένου, προ-ινωτικού φαινοτύπου. Τα αντίθετα αποτελέσματα παρατηρούνται σε κύτταρα που υποεκφράζουν την calreticulin. Στη συνέχεια, επιβεβαιώνουμε ότι κριτικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν *in vitro* ήταν εμφανείς στα σωληναρικά κύτταρα *in vivo* στο μοντέλο UUO. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, δείχνουμε ότι ουσιαστική (50%) μείωση στην έκφραση της calreticulin εμπόδισε την ανάπτυξη της σωληναριοδιάμεσης ίνωσης σε αντίστοιχο βαθμό, επηρεάζοντας τη φλεγμονή, τη μεταγραφική ενεργοποίηση, την απόπτωση και το σηματοδοτικό μονοπάτι του παράγοντα TGF-β1. Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας καθιερώνουν την calreticulin σαν μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται κριτικά στους μοριακούς μηχανισμούς ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης και υποδεικνύουν ότι η καταστολή της έκφρασης της calreticulin μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της ίνωσης και της χρόνιας νεφρικής νόσου.

2 SUMMARY

Renal fibrosis is the common anatomical feature underlying the progression of chronic kidney disease (CKD), a leading cause of morbidity and mortality worldwide. In a previous study, we have demonstrated that during the development of renal fibrosis in the unilateral ureteric obstruction (UUO) rat model, calreticulin is up-regulated in tubular epithelial cells (TECs). Here, we used *in vitro* and *in vivo* approaches to examine the role of calreticulin in TECs and its contribution to the progression of fibrosis. We show that in cultured renal TECs calreticulin overexpression induced acquisition of an altered, pro-fibrotic cellular phenotype. Consistently, opposite effects were observed by calreticulin knock-down. Subsequently, we confirm that critical changes observed *in vitro* were also apparent in tubular cells *in vivo*, in the animal model of UUO. In agreement with these results, we demonstrate that substantial (50%) reduction in the expression of calreticulin reduced the development of tubulointerstitial fibrosis at a comparable level, through regulation of inflammation, transcriptional activation, TGF- β 1-associated effects and apoptosis. In summary, our findings establish that calreticulin is critically involved in the molecular mechanisms driving renal fibrosis progression and indicate that inhibition of calreticulin expression might be a therapeutic target to reduce fibrosis and CKD development.

3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 ΝΕΦΡΟΙ

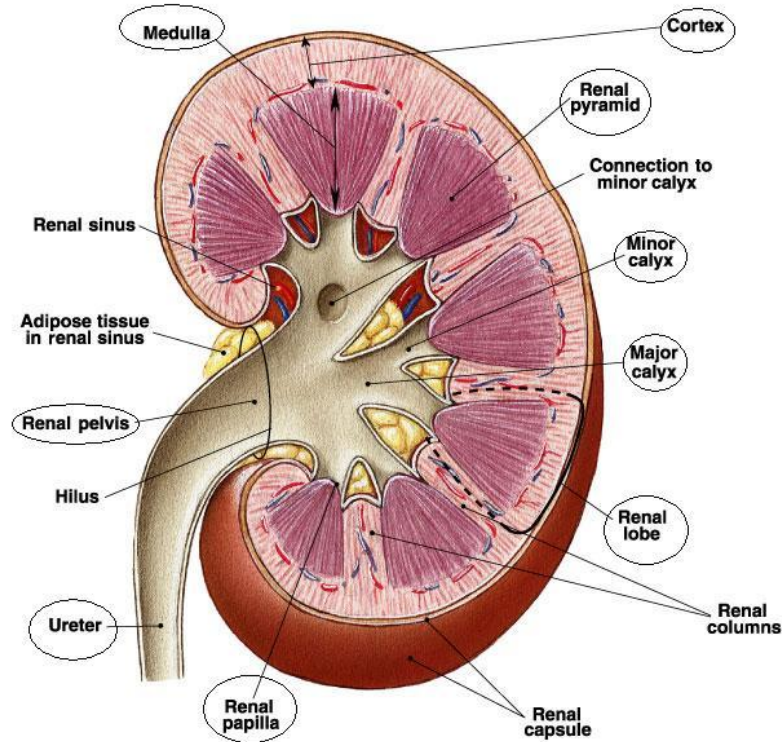
Οι νεφροί είναι τα όργανα του ανθρώπινου σώματος που φιλτράρουν το αίμα και το απαλλάσσουν από τοξίνες και ουσίες που το σώμα δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει, και τις αποβάλλουν μέσω των ούρων. Ρυθμίζουν, επίσης, την ισορροπία των μεταλλικών στοιχείων και του νερού. Οι δύο νεφροί έχουν σχήμα κυαμοειδές και βρίσκονται εκατέρωθεν της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης, ακριβώς κάτω από το διάφραγμα (1, 2).

3.1.1 Δομή του νεφρού

Ο νεφρός είναι ένα όργανο αποπλατυσμένο από εμπρός προς τα πίσω και αν κάνουμε μια τομή που να περνά από τα χείλη του θα δούμε ότι κάτω από τον ινώδη χιτώνα έχει δύο ουσίες: μια εξωτερική που λέγεται φλοιώδης (cortex) και μια εσωτερική που λέγεται μυελώδης (medulla) (βλέπε εικόνα 1). Η φλοιώδης είναι ανοιχτόχρωμη, ενώ η μυελώδης έχει σκούρο καφεκόκκινο χρώμα και αποτελείται από 8-12 πυραμιδοειδείς σχηματισμούς που ονομάζονται νεφρικές πυραμίδες (renal pyramids) και έχουν τη βάση τους στραμμένη προς τη φλοιώδη ουσία και την κορυφή προς τη νεφρική κοιλία. Στην κορυφή κάθε νεφρικής πυραμίδας υπάρχει μια θηλή (papilla), γεμάτη μικρά σωληνάκια από τα οποία αναβλύζει το ούρο. Από τη βάση της πυραμίδας προβάλλουν ακτινωτά προς τη φλοιώδη ουσία οι μυελώδεις ακτίνες και ανάμεσά τους προβάλλουν προεξοχές της φλοιώδους ουσίας, οι νεφρικοί στύλοι (renal columns). Η θηλή της νεφρικής πυραμίδας προβάλλει μέσα σ' έναν κυπελλοειδή σχηματισμό από ινώδη ιστό, το νεφρικό κάλυκα (calyx), όπου συλλέγονται τα ούρα που αναβλύζουν από τα σωληνάκια της θηλής. Όλοι οι κάλυκες εκβάλλουν με μίσχους στη νεφρική πύελο (renal pelvis) η οποία βρίσκεται στη νεφρική κοιλία. Από εκεί τα ούρα περνούν σε έναν ινομυώδη σωλήνα, τον ουρητήρα (ureter), και με αυτόν μεταφέρονται στην ουροδόχο κύστη.

Ο νεφρός λειτουργεί σαν ένας πολυσύνθετος σωληνοειδής αδένας που τα σωληνάριά του παράγουν το ούρο. Ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού θεωρείται ο νεφρώνας, ο οποίος αποτελείται από το νεφρικό σωματίο και από το ουροφόρο σωληνάριο. Η κατασκευή του νεφρώνα είναι πολύπλοκη και

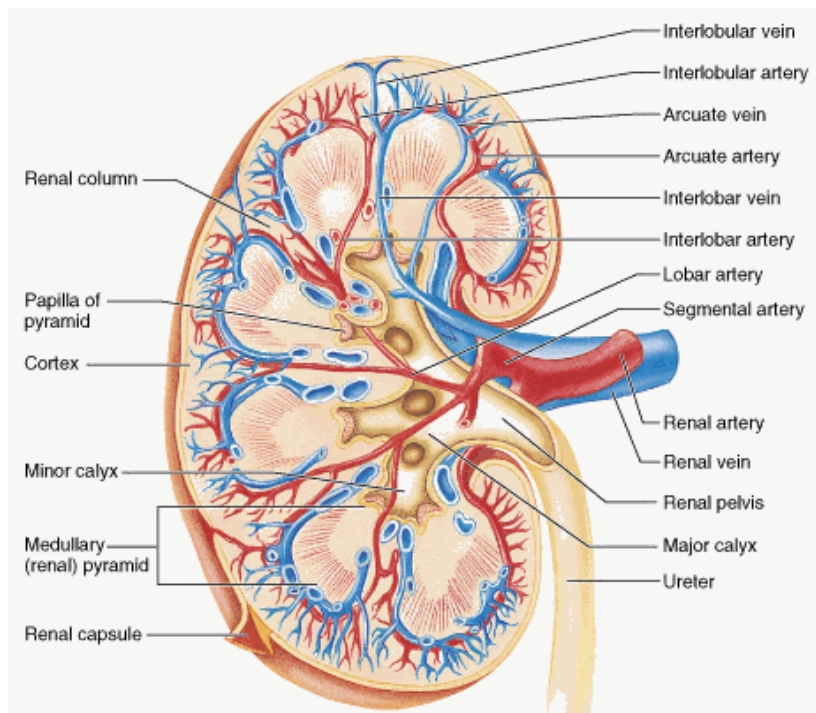
σύμφυτη με τη λειτουργική του αποστολή. Επειδή η λειτουργία του νεφρώνα στηρίζεται στην αγγείωση του νεφρού, θα αναφέρουμε μερικά για αυτήν πριν προχωρήσουμε στην περιγραφή της κατασκευής του νεφρώνα.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής του νεφρού. Από την ιστοσελίδα www4.ncsu.edu.

Στην εικόνα 2 φαίνεται πώς η νεφρική αρτηρία (renal artery), που μπαίνει μέσα στο νεφρό από την πύλη, διακλαδίζεται σε μερικούς κλάδους που κατευθύνονται προς την περιφέρεια του οργάνου και δίνουν ευθείς κλάδους, τις μεσολόβιες αρτηρίες του νεφρού (interlobar arteries). Αυτές, περνώντας ανάμεσα από τους μίσχους των καλύκων, διακλαδίζονται σε μικρότερους κλάδους που έχουν σχήμα τόξου και γι' αυτό λέγονται τοξοειδείς αρτηρίες (arcuate arteries). Οι τοξοειδείς πηγαίνουν προς την περιφέρεια και δίνουν μικρούς κλάδους από τους οποίους προέρχονται λεπτότατα αρτηριακά στελέχη, τα προσαγωγά αρτηρίδια του νεφρικού σωματίου. Αυτά τροφοδοτούν το νεφρικό σωματίο με αρτηριακό αίμα που κυκλοφορεί μέσα σε ένα λεπτότατο τριχοειδικό δίκτυο με πολλές σπείρες που ονομάζεται αγγειώδης σπείραμα. Επειδή το αίμα που φθάνει στο νεφρό από τη νεφρική αρτηρία αναγκάζεται να κυκλοφορήσει σε πολύ λεπτά τριχοειδικά δίκτυα, η πίεσή του μέσα στα τριχοειδή αγγεία του αγγειώδους σπειράματος αυξάνεται πολύ, σύμφωνα με τις αρχές της

υδροδυναμικής. Αυτό είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του νεφρικού σωματίου και την παραγωγή των ούρων.



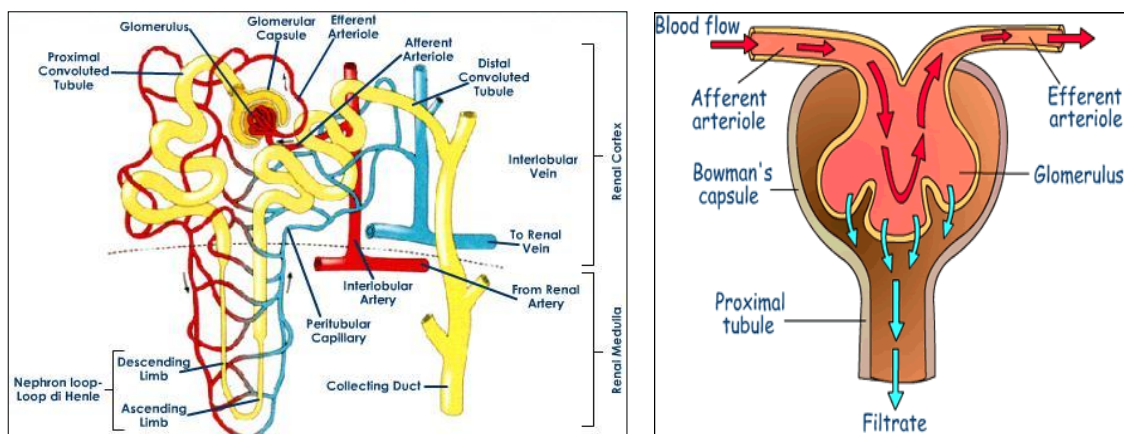
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του αγγειακού δικτύου του νεφρού. Από την ιστοσελίδα legacy.owensboro.kctcs.edu.

Ο νεφρώνας, όπως είπαμε, αποτελείται από το νεφρικό σωματίο και το ουροφόρο σωληνάριο (εικόνα 3). Το νεφρικό σωματίο μοιάζει με ένα ποτήρι του κονιάκ που έχει διπλά τοιχώματα και το "ποδαράκι" του είναι σωληνωτό και επικοινωνεί με την ενδιάμεση κοιλότητα που σχηματίζεται από τα διπλά τοιχώματα. Το μέρος αυτό του νεφρικού σωματίου ονομάζεται κάψα ή έλυτρο του Bowman (Bowman's capsule) και η ενδιάμεση κοιλότητά του ουροφόρα κοιλότητα. Στο εσωτερικό της κάψας περιέχεται το αγγειώδες σπείραμα (glomerulus). Το "ποδαράκι" της κάψας είναι η αρχή του ουροφόρου σωληναρίου, το οποίο δεν είναι ομοιόμορφο σε όλο του το μήκος· μετά το πρώτο ευθύ τμήμα του αρχίζει να ελίσσεται σε σπείρες και ονομάζεται εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ή εσπειραμένο σωληνάριο α' τάξης (proximal tubule). Στη συνέχεια μεταπίπτει σε μια αγκυλωτή μοίρα που ονομάζεται αγκύλη του Henle (Loop of Henle) και έχει ένα κατιόν (descending limb) και ένα ανιόν σκέλος (ascending limb). Παραπέρα, το ουροφόρο σωληνάριο γίνεται πάλι εσπειραμένο και στη θέση αυτή ονομάζεται άπω εσπειραμένο σωληνάριο ή

εσπειραμένο σωληνάριο β' τάξης (distal tubule). Μετά τη δεύτερη σπειροειδή του πορεία γίνεται ξανά ευθύ και ονομάζεται τελικό σωληνάριο. Τα τελικά σωληνάκια πολλών νεφρώνων καταλήγουν σε ένα φαρδύτερο σωληνάριο που λέγεται αθροιστικό (collecting tubule) και συλλέγει τα ούρα που έρχονται από πολλούς νεφρώνες με τα τελικά τους σωληνάκια.

3.1.2 Λειτουργία του νεφρώνα και παραγωγή των ούρων

Στην πρώτη φάση, το αίμα που έρχεται στο αγγειώδες σπείραμα με υψηλή πίεση βρίσκει την απέναντί του ουροφόρα κοιλότητα της κάψας του Bowman να έχει χαμηλότερη πίεση. Η διαφορά αυτή των πιέσεων στους δυο χώρους προκαλεί διήθηση του αίματος, καθώς πιέζει το αίμα προς την πλευρά της χαμηλότερης πίεσης, δηλαδή την ουροφόρα κοιλότητα. Η υψηλή οσμωτική πίεση οφείλεται στις ουσίες που βρίσκονται διαλυμένες μέσα στο πρόουρο, όπως ονομάζεται το πρώτο διήθημα.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του νεφρώνα (αριστερά) και του νεφρικού σωματίου (δεξιά). Από τις ιστοσελίδες tutorvista.com και actions-traitements.org.

Ο οργανισμός μέχρι στιγμής κατάφερε να απομακρύνει την ουρία που πέρασε διαλυμένη μέσα στο πρόουρο, αλλά μαζί με αυτήν έχασε σημαντικό όγκο νερού και διάφορα συστατικά που του είναι χρήσιμα (σάκχαρο, λεύκωμα κ.ά.). Το νερό και τα συστατικά αυτά τα παίρνει πάλι πίσω με τη διαδικασία της επαναρρόφησης η οποία γίνεται στο ουροφόρο σωληνάριο.

Το πρόουρο βρίσκεται στο σωληνάριο υπό υψηλή πίεση, ενώ το αίμα στα τριχοειδικά δίκτυα του απαγωγού αρτηριδίου που περιβάλλουν το σωληνάριο υπό χαμηλή πίεση. Η διαφορά της πίεσης τώρα σπρώχνει το διάλυμα προς τα τριχοειδή των δικτύων. Το διάλυμα που περνά όμως μέσα στα τριχοειδή δεν περιέχει την ουρία, η οποία αδυνατεί να περάσει την ειδική κατασκευή του τοιχώματος των τριχοειδών και του σωληναρίου· σ' αυτή τη θέση το τοίχωμα συγκρατεί την ουρία (διαλυμένη σε μια μικρή ποσότητα νερού) μέσα στον αυλό του ουροφόρου σωληναρίου, και επαναρροφά το μεγαλύτερο όγκο νερού από το πρόουρο μαζί με τα χρήσιμα συστατικά, αποδίδοντάς τα πάλι στην κυκλοφορία (μέσα στα τριχοειδή).

Στη φάση αυτή γίνεται και μια ανταλλαγή ηλεκτρολυτικών ιόντων μεταξύ πρόουρου και αίματος και έτσι, ταυτόχρονα με την παραγωγή των ούρων και την αποβολή της ουρίας, διατηρείται η ισορροπία των ηλεκτρολυτών και του όγκου των υγρών του σώματος.

Μετά την ολοκλήρωση της επαναρρόφησης τα ούρα περνούν στο τελικό σωληνάριο και από εκεί στο αθροιστικό. Μικρές ποσότητες νερού επαναρροφώνται και σε αυτά τα τμήματα του ουροφόρου σωληναρίου. Ό,τι απομένει περνά στη νεφρική θηλή και μετά στο νεφρικό κάλυκα ο οποίος είναι η αρχή της αποχετευτικής μοίρας του ουροποιητικού συστήματος.

Κάθε νεφρός έχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες αλλά δεν λειτουργούν διαρκώς όλοι, παρά μόνο οι μισοί· στη διάρκεια του 24-ώρου μπαίνουν σε λειτουργία όλοι οι νεφρώνες εκ περιτροπής.

Με τα ούρα ο οργανισμός απομακρύνει και μερικές ουσίες που του είναι άχρηστες ή βλαβερές, όπως μεταβολικά κατάλοιπα φαρμάκων και τοξικών ουσιών. Κακή λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος συνεπάγεται σοβαρές διαταραχές του οργανισμού από τη συσσώρευση πολλών άχρηστων ουσιών στο αίμα.

3.2 ΙΝΩΣΗ

3.2.1 Η παθογένεση της ίνωσης

Η ίνωση αποτελεί μια μακροχρόνια διεργασία καταστροφής των ιστών που χαρακτηρίζει μεγάλο εύρος ασθενειών σε πολλά οργανικά συστήματα,

συμπεριλαμβανομένων των ινωτικών διαταραχών του πνεύμονα, της ηπατικής κίρρωσης, της συστηματικής σκλήρωσης του δέρματος, των καρδιαγγειακών παθήσεων, της καρκινικής μετάστασης, της χρόνιας απόρριψης μοσχεύματος και της προοδευτικής νεφρικής ασθένειας. Η ίωση ορίζεται συχνά ως μια διαδικασία επούλωσης τραύματος που έχει διαφύγει από τον έλεγχο του οργανισμού. Οι βλάβες στους ιστούς μπορούν να προκύψουν από διάφορα ερεθίσματα, όπως μολύνσεις, αυτοάνοσες αντιδράσεις, μηχανικούς τραυματισμούς, τα οποία επάγουν τη φυσιολογική απόκριση του οργανισμού για την αποκατάσταση της βλάβης και την αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού. Η ίωση προκύπτει συνήθως μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους τραυματισμού, φλεγμονής και διεργασιών επιδιόρθωσης των ιστών, ως αποτέλεσμα χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων που επάγονται από κάποιο συνεχές ερέθισμα. Κύριο χαρακτηριστικό της ίωσης αποτελεί η συσσώρευση κυττάρων ινοβλαστών στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη και η ανεξέλεγκτη παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, οδηγώντας σε απώλεια της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του ιστού και σε πολλές περιπτώσεις οργανική ανεπάρκεια και θάνατο (3-5).

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η ίωση αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας, ενώ υπολογίζεται πως το 45% των θανάτων στον ανεπτυγμένο κόσμο μπορεί να αποδοθεί σε κάποια μορφή ινοπολλαπλασιαστικής ασθένειας. Ωστόσο, παρά το μεγάλο αντίκτυπό της στην ανθρώπινη υγεία, δεν έχει βρεθεί ακόμα αποτελεσματική θεραπεία στόχευσης των ινωτικών μηχανισμών.

3.2.2 Οι ινοβλάστες ως κύριοι μεσολαβητές της ινωτικής διαδικασίας

Οι βλάβες στους ιστούς επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις που διεγείρουν τη στρατολόγηση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, π.χ. ουδετερόφιλων, μακροφάγων και λευκοκυττάρων, τα οποία συμμετέχουν στα πρώτα στάδια επούλωσης του τραύματος. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τους ινοβλάστες για την παραγωγή συστατικών του εξωκυττάριαου στρώματος, όπως κολλαγόνο, ινοδωνεκτίνη και πρωτεογλυκάνες, με στόχο την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού. Η ποσότητα του συνδετικού ιστού που εναποτίθεται από τους ινοβλάστες στον εξωκυττάριαο χώρο ελέγχεται από ένζυμα καταβολισμού του κολλαγόνου, γνωστά ως

μεταλλοπρωτεάσες του στρώματος (MMPs). Σε αυτή τη φάση αναγέννησης του ιστού, ο ρυθμός σύνθεσης εξωκυττάριου στρώματος από τους ινοβλάστες υπερέρχει του ρυθμού αποικοδόμησής του, με αποτέλεσμα η τυχόν χρόνια και ανεξέλεγκτη διέγερση των ινοβλαστών να οδηγήσει στη συσσώρευση συνδετικού ιστού και την ανάπτυξη ίνωσης (4).

Παρά την ευρεία αποδοχή του ρόλου των ινοβλαστών κατά την ίνωση, οι πηγές προέλευσης και η διαδικασία ενεργοποίησής τους στον ινωτικό ιστό παραμένουν σε μεγάλο βαθμό μη καθορισμένα, εν μέρει λόγω της ετερογένειας του πληθυσμού των ινοβλαστών και της έλλειψης κάποιου καθολικού δείκτη για την ταυτοποίησή τους (6, 7). Η ενεργοποίηση του τοπικού πληθυσμού ινοβλαστών των ιστών και η διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών που εποικούν περιφερικά όργανα θεωρούνται σημαντικές πηγές ινοβλαστών στους ινωτικούς ιστούς (8-10). Επιπλέον, κάποιες μελέτες έχουν υποδείξει τη συνεισφορά του μηχανισμού αποδιαφοροποίησης επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) ως πηγή ινοβλαστών κατά την ανάπτυξη της ίνωσης (6-8).

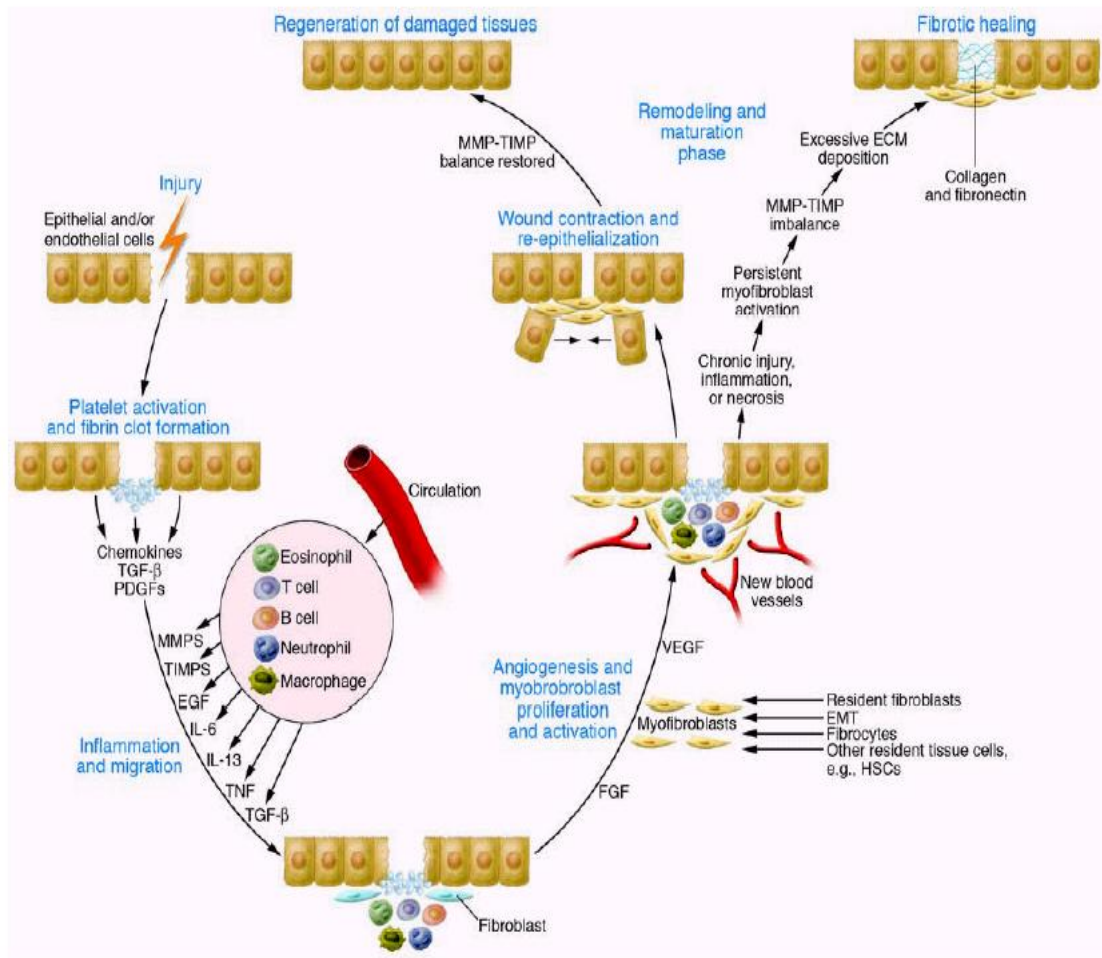
Φαινόμενα EMT έχουν περιγραφεί και μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και μορφογένεση, την οργανογένεση της καρδιάς, του μυοσκελετικού συστήματος, των κρανιακών δομών και του περιφερικού νευρικού συστήματος, ενώ θεωρείται πως αποτελούν τον υποκείμενο μηχανισμό της διεισδυτικότητας και μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων (6). Ωστόσο, λιγότερο κατανοητή και αποδεκτή είναι η διαδικασία του EMT που έχει περιγραφεί στα πλαίσια επιθηλιακής βλάβης σε όργανα όπως τα νεφρά, το ήπαρ και ο πνεύμονας. Πληθώρα *in vitro* δεδομένων υποδεικνύει πως επιθηλιακά κύτταρα νεφρικής, πνευμονικής ή ηπατικής προέλευσης εκδηλώνουν εύκολα μετάβαση σε μεσεγχυματικό φαινότυπο μετά από την επίδραση οξειδωτικού στρες, φλεγμονοδών ερεθισμάτων, τραυματισμού ή μεταβολικών παραγόντων (6, 11, 12). Από την άλλη πλευρά, τα *in vivo* στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη φαινομένων EMT σε ινωτικούς ιστούς είναι περιορισμένα και σχετίζονται κυρίως με το πειραματικό μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά (Unilateral Ureteral Obstruction) που χαρακτηρίζεται από την ταχεία εξέλιξη νεφρικής ίνωσης (βλέπε 3.2.3.3.1 και 3.2.5.1). Επιπλέον, σε βιοψίες από ανθρώπινο παθολογικό νεφρικό ιστό έχουν βρεθεί επιθηλιακά κύτταρα που συνεκφράζουν επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες, υποδεικνύοντας ένα μεταβατικό φαινότυπο (6-8). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες με χρήση διαγονιδιακών ζώων αμφισβήτησαν την

οποιαδήποτε συνεισφορά των επιθηλιακών κυττάρων στη δημιουργία των ινοβλαστών σε διάφορα μοντέλα νεφρικής ίνωσης (13, 14). Άλλες πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη πολλών πηγών ενεργοποιημένων ινοβλαστών (15). Η συγκέντρωση περισσότερων πειραματικών δεδομένων είναι απαραίτητη για τη διαλεύκανση του ρόλου του EMT όχι μόνο στη νεφρική ίνωση αλλά και την ίνωση άλλων οργάνων. Είναι πολύ πιθανό η ενεργοποίηση των ινοβλαστών στους ινωτικούς ιστούς να πυροδοτείται από ξεχωριστούς μηχανισμούς σε διαφορετικά όργανα ή διαφορετικά πειραματικά μοντέλα ίνωσης. Δεν πρέπει επίσης να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης πολλών υποπληθυσμών ινοβλαστών που δεν είναι διακριτοί με τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα μέσα/δείκτες.

3.2.3 Οι μοριακοί μηχανισμοί της ίνωσης

3.2.3.1 Ο γενικός μηχανισμός της ινωτικής διαδικασίας

Μετά την πρόκληση βλάβης ή τραυματισμού στους ιστούς, τα επιθηλιακά κύτταρα που υπέστησαν τη βλάβη εκκρίνουν αυξητικούς και χημειοτακτικούς παράγοντες, που πυροδοτούν τη στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος ξεκινώντας την πρώτη φάση επούλωσης του τραύματος (4). Τα κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν επίσης ένζυμα γνωστά ως μεταλλοπρωτεάσες του στρώματος (MMPs) που μεσολαβούν τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης του ιστού, ώστε να επιτραπεί η πρόσβαση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή του τραύματος. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν με τη σειρά τους κυτοκίνες (MMPs, TIMPs, EGF, IL-6, IL-13, TNF, TGF-β) ενισχύοντας τη φλεγμονώδη απόκριση και ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα για το σχηματισμό νέων αγγείων. Κάποια από τα εκκρινόμενα μόρια, όπως οι προ-ινωτικοί παράγοντες IL-13 και TGF-β, διεγείρουν επίσης την ενεργοποίηση των ινοβλαστών για την παραγωγή εξωκυττάριου στρώματος που θα συμβάλλει στην επούλωση του τραύματος. Η φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης ολοκληρώνεται με τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού. Ωστόσο, σε περίπτωση χρόνιων τραυματισμών παρατηρείται συνεχής φλεγμονώδης αντίδραση και ενεργοποίηση των ινοβλαστών που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας και ανάπτυξη ίνωσης (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Αποτελέσματα της διαδικασίας επούλωσης τραύματος: αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού ή ανάπτυξη ίωσης. Από τη βιβλιογραφική αναφορά (4).

3.2.3.2 Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυτοκινών

Η ινωτική διαδικασία ξεκινά με μια φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού που προάγεται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, οδηγώντας στην εισροή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στον κατεστραμμένο ιστό. Τόσο μακροφάγα και λεμφοκύτταρα όσο δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα εμπλέκονται σε αυτή τη φλεγμονώδη αντίδραση. Τα μακροφάγα των ιστών συνιστούν τα πρώτα κύτταρα που κινητοποιούνται, καθώς αυξάνονται μόλις λίγες ώρες μετά την πρόκληση της βλάβης, ενώ αργότερα σημαντικό ρόλο αναλαμβάνουν και τα λεμφοκύτταρα. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην καθιέρωση της φλεγμονής περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, το αυξημένο οξειδωτικό στρες, την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων καθώς και

την εμπλοκή μορίων προσκόλλησης και χημειοτακτικών παραγόντων (16, Εικόνα 5).

Ο NF-κB αποτελεί έναν ευρέως διαδεδομένο και καλά χαρακτηρισμένο μεταγραφικό παράγοντα με κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονής, μεταξύ άλλων λειτουργιών. Ελέγχει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-1, IL-2, TNF-α), χημειοτακτικούς παράγοντες (MCP-1, RANTES), μόρια προσκόλλησης (ICAM, VCAM, E-selectin) και αυξητικούς παράγοντες, αλλά και επαγωγέων του EMT (Snail1). Ενεργοποιείται πολύ νωρίς κατά την ινωτική διαδικασία από διάφορες κυτοκίνες όπως οι IL-1β και TNF-α, από το οξειδωτικό στρες αλλά και από άλλα μόρια όπως η Αγγειοτενσίνη II (16, 17). Αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB ελαττώνει την εισροή μακροφάγων και την επαγωγή παραγόντων φλεγμονής, αλλά και το βαθμό της ίνωσης και της απόπτωσης σε ζωικά μοντέλα νεφρικής ίνωσης (18).

Η Αγγειοτενσίνη II ενεργεί στο νεφρό σαν προ-φλεγμονώδης μεσολαβητής. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ινωτική διαδικασία οδηγεί στην ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης στο νεφρό (16, 19). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολλά μέλη της οικογένειας του NF-κB ενεργοποιούνται από την Αγγειοτενσίνη II, ενώ διαδοχικά το γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου (το πρόδρομο γονίδιο της Αγγειοτενσίνης) διεγείρεται από την ενεργοποίηση του NF-κB. Ο υποδοχέας τύπου I της Αγγειοτενσίνης II (AT1R) ρυθμίζει πολλά φλεγμονώδη γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των IL-6, MCP-1, VCAM-1, ενώ άλλα όπως ο παράγοντας RANTES ρυθμίζονται από τον υποδοχέα τύπου II (AT2R) (16). Αναστολή ή απενεργοποίηση του AT1R υποδοχέα μείωσε μερικώς την ενεργοποίηση του NF-κB και την εισροή μακροφάγων σε ζωικά μοντέλα ίνωσης, ενώ ταυτόχρονη καταστολή και των δύο υποδοχέων ήταν ικανή να εμποδίσει πλήρως τη φλεγμονώδη απόκριση (20, 21).

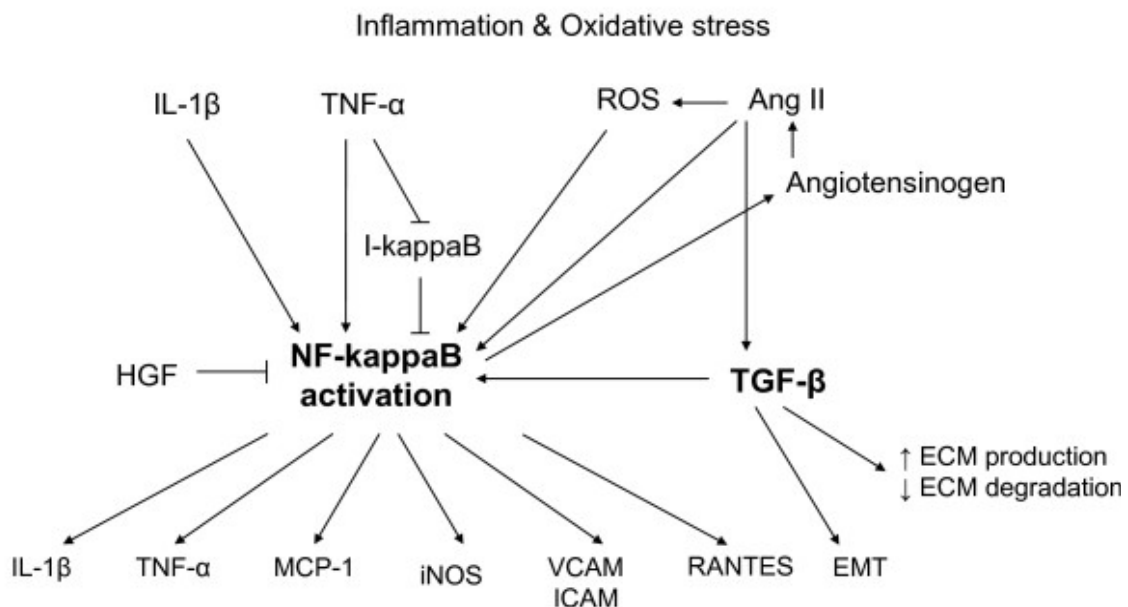
Σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού στον κατεστραμμένο ιστό παίζουν τα πρωτότυπα μέλη της οικογένειας των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, TNF-α και IL-1. Κατά την ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης, η παραγωγή του TNF-α συντελείται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού φλοιού και τα δενδριτικά κύτταρα (16). Αναστολή της δράσης τόσο του TNF-α όσο και του IL-1 οδήγησε σε μείωση της συσσώρευσης μακροφάγων και λεμφοκυττάρων σε ζωικά μοντέλα ίνωσης (22, 23). Τα κύτταρα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ίνωσης, καθώς συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των μυϊνοβλαστών από τον TGF-β, την παραγωγή εξωκυττάρου στρώματος αλλά και τη διαδικασία του EMT (16).

Τα μόρια προσκόλλησης που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως οι σελεκτίνες (selectins), τα VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) και ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), παίζουν καίριο ρόλο στην εισροή των κυττάρων φλεγμονής από τα αγγεία στους ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη (16). Οι σελεκτίνες και οι προσδέτες τους μεσολαβούν την αρχική επαφή μεταξύ των λευκοκυττάρων και του αγγειακού ενδοθηλίου οδηγώντας στην προσκόλληση και μετακίνηση των λευκοκυττάρων κατά μήκος του αγγειακού τοιχώματος. Υπάρχουν 3 διαφορετικές σελεκτίνες: η E-selectin εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η P-selectin στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια, και η L-selectin στα λευκοκύτταρα. Σε ποντίκια από τα οποία έχουν απαλειφθεί και οι 3 σελεκτίνες (EPL^{-/-} mice) παρατηρήθηκε αξιοσημείωτα μικρότερη εισροή λευκοκυττάρων, εναπόθεση κολλαγόνου και κυτταρική απόπτωση σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα, κατά την ανάπτυξη νεφρικής ίνωσης (24). Τα άλλα μόρια προσκόλλησης, VCAM-1 και ICAM-1, διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, μια αναγκαία προϋπόθεση για τη διαπήδηση των λευκοκυττάρων στον ιστό.

Τα φλεγμονώδη κύτταρα προσελκύνονται στους ιστούς από χημειοτακτικούς παράγοντες ακολουθώντας μία σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση προς την πηγή των παραγόντων αυτών. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι ο MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), ο οποίος αυξάνεται πολύ νωρίς κατά την εξέλιξη της νεφρικής ίνωσης παραμένοντας αυξημένος έως τα πιο εξελιγμένα στάδια, και εκφράζεται τόσο από τα διηθούμενα μονοκύτταρα όσο και από τα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού φλοιού (16). Μια άλλη πρωτεΐνη με χημειοτακτική δράση κατά τη νεφρική ίνωση είναι η Osteopontin, μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από τα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα και συμβάλλει στην συσσώρευση των μακροφάγων στο νεφρικό φλοιό. Απάλειψη του γονιδίου της Osteopontin σε ποντίκια οδήγησε σε μειωμένη εισροή μακροφάγων και ανάπτυξη ίνωσης (25).

Στην προσέλκυση λευκοκυττάρων στους ιστούς συμβάλλουν και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, δηλαδή πρωτεΐνες που ρυθμίζουν μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών μεταφέροντας πληροφορίες μεταξύ κυττάρων. Ο παράγοντας TGF-β1 (Transforming Growth Factor-β1), ο ρόλος του οποίου θα αναλυθεί λεπτομερώς σε επόμενη ενότητα, εκτός από τον καίριο ρόλο που διαδραματίζει στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, αποτελεί και ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα

μονοκύτταρα (26). Από την άλλη πλευρά, έχει δειχθεί πως ασκεί και αντιφλεγμονώδη δράση ως απενεργοποιητής των μακροφάγων (27). Κατά τη νεφρική ίνωση έχει βρεθεί να παράγεται κυρίως από κύτταρα του ανοσοποιητικού αλλά και επιθηλιακά κύτταρα (16). Ένας άλλος παράγοντας, ο HGF (Hepatocyte Growth Factor), έχει δράσεις αντίθετες προς αυτές του TGF- β , αναστέλλοντας την εισροή μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων κατά την ανάπτυξη της ίνωσης (28). Αντίθετα, ο αυξητικός παράγοντας M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) παίζει σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα των μονοκυττάρων και την ενεργοποίησή τους σε μακροφάγα, και παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες (16).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση κάποιων από τους πιο σημαντικούς σηματοδοτικούς μεσολαβητές που εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης κατά την εξέλιξη της ίνωσης. Από τη βιβλιογραφική αναφορά (16).

3.2.3.3 Ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα TGF- β

Ο αυξητικός παράγοντας TGF- β είναι το πρωτότυπο μέλος μιας υπερικογένειας εκκρινόμενων σηματοδοτικών πολυπεπτιδίων με ποικίλες λειτουργίες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης των ενήλικων ιστών. Τα μέλη της οικογένειας ελέγχουν θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως η προσκόλληση, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση μιας

ποικιλίας κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων επιθηλιακών, ενδοθηλιακών, ανοσοποιητικών, νευρικών και μεσεγχυματικών κυττάρων.

Μεγάλη σημασία παρουσιάζει το γεγονός ότι η δράση του TGF- β εξαρτάται άμεσα από τον κυτταρικό τύπο και το περιβάλλον, μεσολαβώντας αντίθετα αποτελέσματα υπό διαφορετικές συνθήκες. Για παράδειγμα, ο παράγοντας TGF- β είναι καλά χαρακτηρισμένος σαν αναστολέας του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού, ενώ έχει δείχθει ότι μπορεί να επάγει ή να αναστείλει και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (γνωστό και ως απόπτωση). Από την άλλη πλευρά, ο TGF- β μπορεί να επάγει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων λόγω της ικανότητάς του να καταστέλλει τη λειτουργία των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και να επάγει την αγγειογένεση και την αποδιαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (29-32).

3.2.3.3.1 Επαγωγή της ίνωτικής διαδικασίας

Η συμβολή του TGF- β στην εξέλιξη της ίωσης έχει δείχθει σε διάφορα πειραματικά συστήματα. Διαγονιδιακά ζώα με υπερέκφραση του παράγοντα TGF- β στον ηπατικό, επιδερμικό ή νεφρικό ιστό αναπτύσσουν ίωση παρουσιάζοντας αυξημένη κυτταρική απόπτωση στους αντίστοιχους ιστούς (9, 30). Η δυνατότητα του TGF- β να προάγει την ανάπτυξη της ίωσης έχει συσχετισθεί με την ικανότητά του να επάγει φαινόμενα EMT σε διάφορα επιθηλιακά κυτταρικά συστήματα, αλλά και *in vivo* ζωικά μοντέλα κυρίως νεφρικής ίωσης (6, 7).

Σε πληθώρα επιθηλιακών κυτταρικών σειρών έχει δείχθει η ικανότητα του TGF- β να πυροδοτεί την έναρξη και ολοκλήρωση της διαδικασίας του EMT, που αποτελείται από μια αλληλουχία χρονικά συντονισμένων διεργασιών. Τα βασικά βήματα αυτής της αλληλουχίας περιλαμβάνουν την απώλεια προσκόλλησης μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, την αποδιοργάνωση της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου και την αυξημένη κινητικότητα και μετανάστευση των μετασχηματισμένων κυττάρων στο διάμεσο συνδετικό ιστό (εικόνα 6).

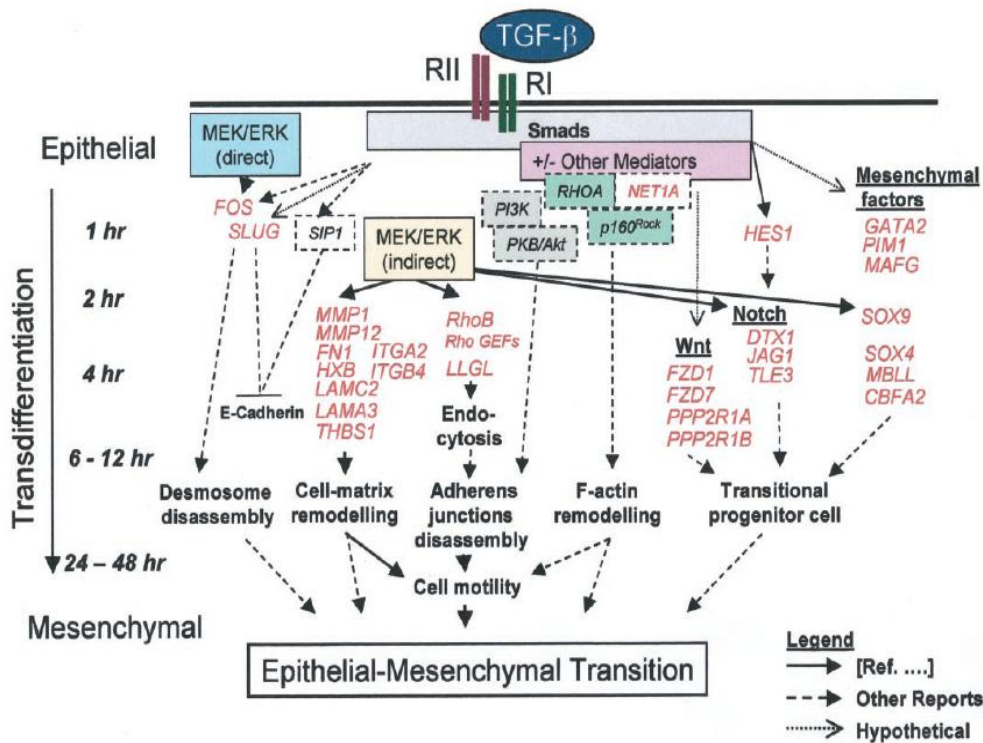
Μια πρώτη αλλαγή κατά την επαγωγή του EMT από τον TGF- β είναι η καταστολή της έκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη σύνδεση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, όπως είναι οι πρωτεΐνες E-cadherin, ZO-1, desmoplakins και cytokeratins. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι

απαραίτητες για τη διατήρηση της πολικότητας και της δομικής ακεραιότητας των επιθηλιακών ιστών, ενώ διαμεσολαμβάν επιπλέον συνδέσεις του εξωκυττάριου περιβάλλοντος με τον ενδοκυττάριο κυτταροσκελετό και διάφορα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η απώλειά τους έχει χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης αποδιαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων σε πλήθος πειραματικών συστημάτων.

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού είναι απαραίτητη διαδικασία για τα μετασχηματισμένα κύτταρα, ώστε να αποκτήσουν δυναμικό συστολής, κινητικότητα και μετανάστευση στο γειτονικό συνδετικό ιστό. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της αναδιοργάνωσης αποτελεί η επαγωγή κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως οι πρωτεΐνες α -smooth muscle actin και vimentin. Επιπλέον, η έκφραση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης FSP1 έχει περιγραφεί ως δείκτης ινοβλαστών και κυττάρων που υφίστανται EMT (8, 12). Ωστόσο, είναι σαφές πως οι πρωτεΐνες αυτές δεν εκφράζονται αποκλειστικά σε ινοβλάστες και η χρήση τους ως δείκτες φαινομένων EMT θα πρέπει να γίνεται με προσοχή και σε συνδυασμό με άλλα πειραματικά στοιχεία.

Για τη μετανάστευση των μετασχηματισμένων κυττάρων στο διάμεσο συνδετικό ιστό απαιτείται η αποδιάταξη της βασικής μεμβράνης που διαχωρίζει το επιθήλιο από το εξωκυττάριο στρώμα. Ο παράγοντας TGF- β διεγείρει την ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως οι μεταλλοπρωτεάσες του στρώματος MMP2 και MMP9, που καταστρέφουν τα κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης, όπως είναι το κολλαγόνο τύπου IV και η λαμινίνη. Η διατάραξη της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του φυσικού συνόρου της βασικής μεμβράνης επιτρέπει στα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα με την αυξημένη κινητικότητα να διεισδύσουν στον εξωκυττάριο χώρο.

Παρά την ικανότητα του TGF- β να διαμεσολαβεί το σύνολο των διεργασιών για την ολοκλήρωση του EMT, υπάρχουν πολλοί άλλοι παράγοντες που ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά το φαινόμενο, τόσο στο πλαίσιο της ίνωσης όσο και άλλων διαδικασιών (6, 7). Για παράδειγμα, οι κυτοκίνες EGF, FGF-2, IL-1 και το κολλαγόνο τύπου I προάγουν τη διαδικασία του EMT σε συνέργεια με τον παράγοντα TGF- β . Αντίθετα, οι παράγοντες HGF και BMP-7 εμποδίζουν την ικανότητα του TGF- β να επάγει το EMT σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά συστήματα. Συνεπώς, το φαινόμενο του EMT και η συμμετοχή του στη διαδικασία της ίνωσης φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης διαφορετικών σημάτων που πυροδοτούνται από ποικίλους παράγοντες.



Εικόνα 6. Απλοποιημένο μοντέλο που απεικονίζει τα κύρια ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που μεσολαβούν την επαγωγή του EMT από τον TGF-β. Από τη βιβλιογραφική αναφορά (32).

3.2.3.3.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β

Η πολυπλοκότητα των φαινομένων που περιγράφηκαν παραπάνω υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι ο παράγοντας TGF-β είναι ικανός να πυροδοτήσει πληθώρα διαφορετικών αλλά και διασυνδεδεμένων μονοπατιών μετάδοσης σήματος που μεσολαβούν τις διάφορες δράσεις του (6, 7, 29-31).

A) Το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών

Το κυριότερο και καλύτερα μελετημένο μονοπάτι του TGF-β είναι εκείνο που οδηγεί στην ενεργοποίηση της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών. Τα σήματα που πυροδοτούνται από τον TGF-β στην κυτταρική επιφάνεια μεταβιβάζονται ενδοκυτταρικά μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων με δραστηκότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Η αναγνώριση του TGF-β από τον υποδοχέα τύπου II (TβRII) επάγει τη συναρμολόγηση ετεροδιμερούς συμπλόκου με τον υποδοχέα

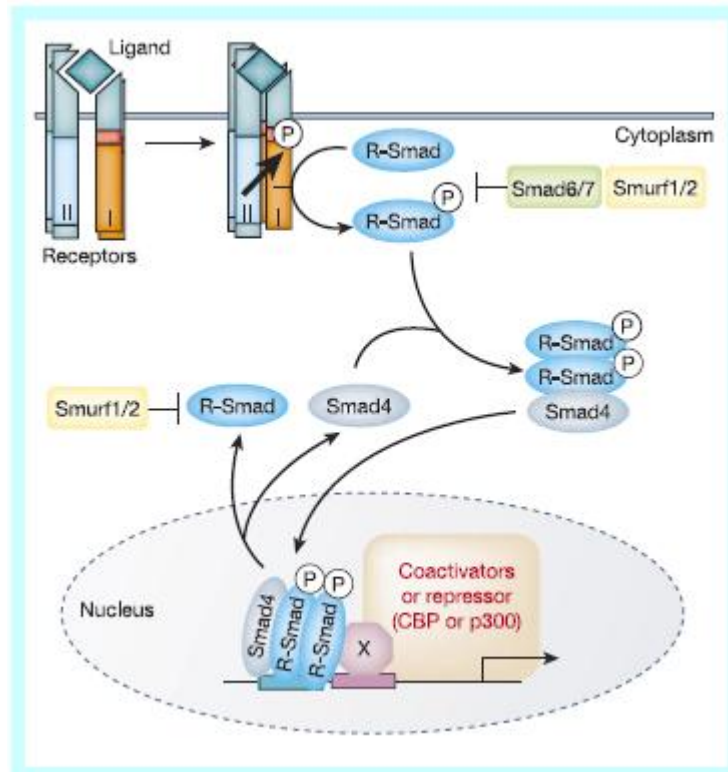
τύπου I (TβRI) και την ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας αναγνωρίζει και φωσφορυλιώνει ειδικά τις ρυθμιστικές Smad πρωτεΐνες (R-Smads), όπως είναι οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 που μεσολαβούν τις περισσότερες Smad-εξαρτώμενες δράσεις του TGF-β. Οι φωσφορυλιωμένες Smad πρωτεΐνες απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα που τις συγκρατούν στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρούν με την κοινή πρωτεΐνη Smad4 (co-Smad), σχηματίζοντας διμερή ή τριμερή σύμπλοκα που μετατοπίζονται στον πυρήνα. Εκεί προσδένονται σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων-στόχων και αλληλεπιδρώντας με διάφορους μεταγραφικούς παραγόντες επάγουν ή αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων αυτών (εικόνα 7).

Ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ διαφόρων κυτταρικών τύπων μετά από διέγερση με τον TGF-β αποκάλυψε την ταυτόχρονη ενεργοποίηση ή καταστολή εκατοντάδων γονιδίων, όπου οι διαφορετικές ομάδες των γονιδίων που εκφράζονται καθορίζουν τις διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις στον παράγοντα TGF-β (30). Δεδομένης της ύπαρξης 8 διαφορετικών Smad πρωτεϊνών και 3 TGF-β υποδοχέων τύπου I, ο ίδιος προσδέτης μπορεί να επάγει διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια ανάλογα με τη σύνθεση του υποδοχέα του και τη διαθεσιμότητα των Smad πρωτεϊνών.

Η παρουσία των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα είναι μια δυναμική διαδικασία, καθώς φαίνεται πως υφίστανται κύκλους αποφωσφορυλίωσης, μετάβασης στο κυτταρόπλασμα, επαναφωσφορυλίωσης και μεταφοράς στον πυρήνα. Επιπλέον, η ενεργότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού ελέγχεται μέσω ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης των Smad πρωτεϊνών. Η επαγωγή των ανασταλτικών πρωτεϊνών Smad6 και Smad7 από μέλη της οικογένειας του TGF-β και από τους παράγοντες EGF, TNF-α και IFN-γ αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης. Ακόμα, τα επίπεδα των Smad πρωτεϊνών ελέγχονται μετα-μεταφραστικά μέσω της αποικοδόμησής τους από το πρωτεάσωμα (31).

Η επαγωγή του EMT από τον TGF-β φαίνεται πως είναι πρωταρχικά εξαρτώμενη από τη σωστή σηματοδότηση μέσω των Smad πρωτεϊνών. Η έλλειψη της πρωτεΐνης Smad3 σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα ίνωσης και EMT, όπως μοντέλα αμφιβληστροειδοπάθειας, τραυματισμού του φακού του ματιού και νεφρικής ίνωσης, βελτιώνει την εικόνα του εκφυλισμού των επιθηλιακών κυττάρων και της επακόλουθης συσσώρευσης συνδετικού ιστού (6). Επιπλέον, η

υπερέκφραση της ανασταλτικής πρωτεΐνης Smad7 εμποδίζει την επαγωγή του EMT από την Smad3 τόσο σε *in vitro* κυτταρικά συστήματα όσο και *in vivo*.



Εικόνα 7. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών από τον TGF-β. Ο παράγοντας TGF-β προσδεδεμένος στον υποδοχέα του ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τις κυτταροπλασματικές Smad πρωτεΐνες. Οι φωσφορυλιωμένες Smad πρωτεΐνες σχηματίζουν διμερή ή τριμερή σύμπλοκα με την κοινή πρωτεΐνη Smad4, τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων. Από τη βιβλιογραφική αναφορά (31).

B) Άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια

Η σηματοδότηση μέσω των Smad πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για τις περισσότερες, αλλά όχι όλες τις δράσεις του παράγοντα TGF-β. Σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχει δειχθεί πως ο TGF-β ενεργοποιεί τα μονοπάτια μιας σειράς MAP κινασών (mitogen-activated protein kinases), όπως της ERK (extracellular-signal-regulated kinase), της p38 και της JNK (c-Jun amino-terminal kinase), γρήγορα και ανεξάρτητα από τις Smad πρωτεΐνες. Αυτό επισημαίνεται και από το γεγονός ότι μεταλλαγμένοι TGF-β υποδοχείς τύπου I

με αδυναμία αναγνώρισης των Smad πρωτεϊνών, διατηρούν την ικανότητα ενεργοποίησης των κινασών p38 και JNK (30). Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις η ενεργοποίηση των MAP κινασών από τον TGF-β πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών. Ακόμα, έχει δειχθεί πως οι MAP κινάσες μπορούν να ρυθμίσουν τη σηματοδοτική δράση των Smad πρωτεϊνών είτε με άμεση φωσφορυλίωσή τους είτε επηρεάζοντας μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αυτές, όπως τους παράγοντες c-Jun (υπόστρωμα της κινάσης JNK) και ATF-2 (υπόστρωμα της κινάσης p38). Αυτή η σύγκλιση και η επικοινωνία των σηματοδοτικών μονοπατιών που πυροδοτούνται από τον TGF-β μπορεί να οδηγήσει στην επαύξηση ή εξισορρόπηση των δράσεων των διαφορετικών μονοπατιών επηρεάζοντας άμεσα την κυτταρική απόκριση στον αυξητικό παράγοντα (30, 31).

Η σηματοδότηση μέσω των MAP κινασών αποτελεί τμήμα του επαγόμενου προγράμματος του EMT από τον TGF-β. Σε διάφορα κυτταρικά μοντέλα επαγωγής του EMT υπό την επίδραση του TGF-β, η λειτουργία της ERK κινάσης είναι απαραίτητη για την αποσυναρμολόγηση των διακυτταρικών συνδέσεων και την αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων. Ακόμα, σε επιθηλιακά κύτταρα μαστικού αδένου και εντερικού καρκινώματος έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης p38 από τον TGF-β απαιτείται για την επαγωγή του μεσεγχυματικού φαινοτύπου (6).

Εκτός όμως από τις MAP κινάσες, και άλλα σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζονται από τον TGF-β έχουν εμπλακεί στην επαγωγή του EMT και της ινωτικής διαδικασίας (εικόνα 6). Στους πιο σημαντικούς παράγοντες ανήκουν ο υποδοχέας Notch και ο προσδέτης του Jagged1 που αυξάνονται σε μια πληθώρα επιθηλιακών κυττάρων κατά την επαγωγή του EMT από τον TGF-β, ενώ η αναστολή τους εμποδίζει αυτή τη μεταβολή στον κυτταρικό φαινότυπο. Ακόμα, το μονοπάτι των Jagged1/ Notch έχει δειχθεί πως ενεργοποιείται στο νεφρικό επιθήλιο κατά την ανάπτυξη ίνωσης, στο καθιερωμένο μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά (βλέπε 3.2.5.1). Ένας άλλος γνωστός παράγοντας που συμμετέχει στην επαγωγή του EMT και της ίνωσης είναι ο μεταγραφικός συνενεργοποιητής β-catenin, ο οποίος συσσωρεύεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων αποκρινόμενος στη σηματοδότηση του TGF-β. Σε διάφορα κυτταρικά μοντέλα η πρωτεΐνη β-catenin είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την έκφραση του δείκτη α-SMA ως ενδιάμεσα στάδια στην επαγωγή του EMT (6, 7). Επίσης, ένζυμα της οικογένειας των Rho GTPases, συμπεριλαμβανομένων των RhoA, Rac και Cdc42

ενεργοποιούνται από τον TGF-β και φαίνεται πως παίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του EMT και της ίνωσης. Τα ένζυμα αυτά μεσολαβούν αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού επάγοντας το σχηματισμό λαμελλιποδίων (lamellipodia) και ινιδίων στρες (stress fibres) με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η κυτταρική μετανάστευση (7, 31).

Οι παράγοντες που περιγράφηκαν παραπάνω αποτελούν τους σημαντικότερους και καλύτερα μελετημένους μεσολαβητές της ινωτικής διαδικασίας στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β. Με βάση αυτά, φαίνεται πως ο ρόλος του TGF-β κατά την ίνωση είναι πολύπλευρος επηρεάζοντας πολλά χαρακτηριστικά της ινωτικής διαδικασίας. Λαμβάνοντας υπ' όψη την επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών και τον πιθανό ρόλο και άλλων παραγόντων, η πολυπλοκότητα της σηματοδότησης αυξάνεται ακόμα περισσότερο.

3.2.3.3 Η μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης ως αποτέλεσμα της δράσης του παράγοντα TGF-β

Τα ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια που πυροδοτούνται από τον TGF-β καταλήγουν στον πυρήνα του κυττάρου, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που μεσολαβούν τις διάφορες δράσεις του αυξητικού παράγοντα (29, 30). Οι κύριες δράσεις του TGF-β περιλαμβάνουν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης και την επαγωγή μεσεγχυματικού φαινοτύπου σε επιθηλιακά κύτταρα, γνωστή ως EMT.

A) Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Μελέτες σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές αποκάλυψαν πως η απόκριση στον παράγοντα TGF-β επάγει ένα κοινό κυτταροστατικό πρόγραμμα που περιλαμβάνει ενεργοποίηση ή καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Ο TGF-β εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας την έκφραση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p15 και p21. Η επαγωγή μεσολαβείται από τη συνέργεια των μεταγραφικών παραγόντων Smads και Sp1 και την αλληλεπίδρασή τους με τους υποκινητές των γονιδίων αυτών (33, 34).

Ακόμα, ο TGF-β αναστέλλει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων c-Myc και Id που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (35). Δεδομένου ότι ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc ρυθμίζει αρνητικά την

έκφραση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p15 και p21, η αναστολή του c-Myc από τον παράγοντα TGF-β υποδεικνύει το συνδυασμό ενός μηχανισμού απομάκρυνσης της μεταγραφικής καταστολής με ένα μηχανισμό μεταγραφικής ενεργοποίησης για την τελική επαγωγή των γονιδίων p15 και p21 (36-38).

B) Έλεγχος της απόπτωσης

Σε αντίθεση με την κυτταροστατική του δράση, μια άλλη βασική λειτουργία του TGF-β, η ικανότητά του να επάγει ή να αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το περιβάλλον. Τα ποικίλα αποπτωτικά μονοπάτια που επάγονται από τον TGF-β καταλήγουν τελικά στην ενεργοποίηση της βασικής κυτταρικής μηχανής που ρυθμίζει την απόπτωση, η οποία σχετίζεται με μεταβολές στην έκφραση, τον εντοπισμό και την ενεργοποίηση προ- και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL2 καθώς και την ενεργοποίηση των κασπασών (30).

Γ) Επαγωγή του φαινομένου EMT

Η τρίτη κύρια δράση του TGF-β, η ικανότητά του να επάγει μεσεγχυματικό φαινότυπο σε επιθηλιακά κύτταρα σε διάφορες περιπτώσεις (βλέπε 3.2.3.3.1), σχετίζεται με την ολική αναδιοργάνωση του γονιδιακού προγράμματος του κυττάρου και μεσολαβείται τόσο από τις Smad πρωτεΐνες όσο και από εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια (6, 29). Μάλιστα, στην περίπτωση της μετάστασης καρκινικών κυττάρων πιστεύεται πως τα μετασηματισμένα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα κυτταροστατικής απόκρισης στον TGF-β, αλλά διατηρούν κάποια συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού που τους επιτρέπουν να υποστούν EMT αυξάνοντας τη διεισδυτικότητά τους (30).

Ένα ευρύ φάσμα μεταγραφικών παραγόντων έχει εμπλακεί στη ρύθμιση του EMT και ο TGF-β είναι ικανός να ελέγξει την έκφραση πολλών από αυτούς (6). Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν οι πρωτεΐνες Snail και Slug (ή Snail1 και Snail2 αντίστοιχα) που λειτουργούν σαν καταστολείς της μεταγραφής αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες στους υποκινητές γονιδίων-στόχων. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούνται απευθείας από τον TGF-β μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών, αλλά το πρότυπο ενεργοποίησής τους είναι αμοιβαία αποκλειόμενο και εξαρτώμενο από τον

κυτταρικό τύπο. Τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ζωικών μοντέλων όσο και σε διάφορες κυτταρικές σειρές οι παράγοντες Snail και Slug καταστέλλουν την έκφραση πρωτεϊνών που μεσολαβούν τις συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, όπως είναι οι πρωτεΐνες E-cadherin, desmoplakin και desmoglein, η καταστολή των οποίων είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή του EMT. Σημασία παρουσιάζει το γεγονός ότι η εκτοπική έκφραση του Slug στη νεφρική κυτταρική σειρά MDCK είναι ικανή να καταστείλλει την έκφραση της E-cadherin και να επάγει ολόκληρη τη διαδικασία του EMT. Επιπλέον, η καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων Id (Inhibitors of differentiation) και η ενεργοποίηση του παράγοντα Twist, ενός σημαντικού ρυθμιστή της εμβρυϊκής μορφογένεσης, συμβάλλει στην καταστολή των πρωτεϊνών διαμεσολάβησης των συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και την ταυτόχρονη επαγωγή μεσεγχυματικών δεικτών.

Μια άλλη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων, οι παράγοντες της οικογένειας Hairy/Enhancer-of-split (H/Esp1) συμβάλλουν στην εξέλιξη του EMT και ενεργοποιούνται από τον TGF- β τόσο μέσω του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών όσο και μέσω της σηματοδότησης των Jagged1/Notch (βλέπε 3.2.3.3.2.). Η επαγωγή των πρωτεϊνών H/Esp1 φαίνεται πως είναι ειδική για το EMT, καθώς δεν παρατηρείται σε κύτταρα που δεν υφίστανται EMT ως απόκριση στον TGF- β , όπως είναι τα πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (6).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό πως προχωρώντας καθοδικά στο μονοπάτι του TGF- β η πολυπλοκότητα της σηματοδότησης και της γονιδιακής ρύθμισης αυξάνεται εκθετικά, οδηγώντας στον τελικό συντονισμό μιας πληθώρας κυτταρικών χαρακτηριστικών και λειτουργιών.

3.2.4 Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ως μεσολαβητής της νεφρικής βλάβης

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum, ER) παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου συνεισφέροντας στον έλεγχο της βιοσύνθεσης, αναδίπλωσης και μετακίνησης των πρωτεϊνών. Διαταραχές όπως η υποξία, η στέρηση γλυκόζης και το οξειδωτικό στρες οδηγούν σε δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου και συσσώρευση

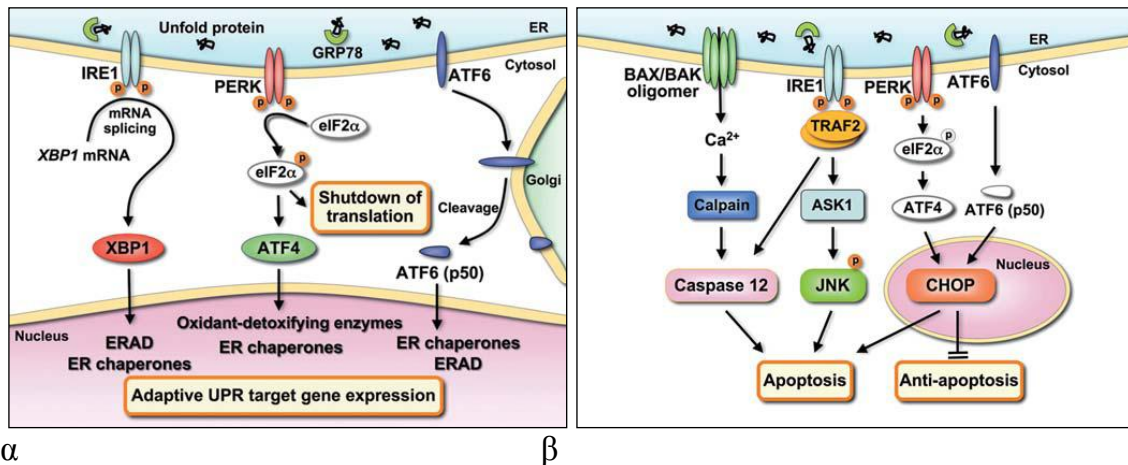
ανώμαλα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, επάγοντας μια κατάσταση που είναι γνωστή ως στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) (39, 40).

Το οξειδωτικό στρες και το επακόλουθο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου έχουν εμπλακεί στην παθογένεση πολλών μορφών νεφρικής βλάβης, τόσο σε περιπτώσεις οξείας όσο και χρόνιας ασθένειας (39). Τα οξειδωτικά μόρια που παράγονται από τα εισρέοντα κύτταρα του ανοσοποιητικού αλλά και τα νεφρικά κύτταρα συμβάλλουν στο αυξημένο οξειδωτικό στρες κατά την ανάπτυξη της ίνωσης. Τόσο τα ενεργά μόρια οξυγόνου όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αυξάνονται ραγδαία κατά τη νεφρική ίνωση (16, 41). Παράλληλα, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάση και υπεροξειδική δισμουτάση μειώνονται. Επιπλέον, η οξυγενάση της αίμης (heme oxygenase-1), ένας ευαίσθητος δείκτης οξειδωτικού στρες, αυξάνεται πολύ νωρίς μετά την επαγωγή της ίνωσης (16). Το οξειδωτικό στρες αποτελεί κύριο ενεργοποιητή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, επάγοντας έτσι τη φλεγμονώδη απόκριση (16, 41). Ακόμα, διεγείρει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Snail και ευνοεί το φαινόμενο EMT (16).

Ο πρωταρχικός σκοπός του στρες που επάγεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι να διευκολύνει την προσαρμογή του κυττάρου στο διαφοροποιημένο περιβάλλον που το προκαλεί και να επαναφέρει τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου. Κάποια από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται ενισχύουν την ικανότητα αναδίπλωσης πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων όπως οι μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) που υποβοηθούν στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες GRP78 (glucose-regulated protein-78) και calreticulin (39). Η πρωτεΐνη GRP78, επίσης γνωστή και ως BiP, αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της λειτουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου· προσδένει και διατηρεί σε ανενεργή κατάσταση διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου όπως οι IRE1 (inositol-requiring enzyme-1), PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase) και ATF6 (activating transcription factor-6). Όταν ανώμαλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η GRP78 απελευθερώνει τις παραπάνω διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν σαν στόχο την αποκατάσταση της ομοιόστασης και της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα μονοπάτια αυτά ενισχύουν την παραγωγή μοριακών συνοδών, παραγόντων

για την αποικοδόμηση των συσσωρευμένων πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών ενζύμων (εικόνα 8α) (39, 40).

Στην περίπτωση που τα κύτταρα υπό συνθήκες υπερβολικού ή παρατεταμένου στρες αποτύχουν να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω των μηχανισμών προσαρμογής, επάγεται η απόπτωση. Η κατάληξη αυτή αντιπροσωπεύει την τελευταία επιλογή του οργανισμού ώστε να απαλλαγεί από δυσλειτουργικά κύτταρα. Η απόπτωση που επάγεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, μεσολαβείται από τους εξής παράγοντες: 1) τον μεταγραφικό παράγοντα CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein), που βρίσκεται καθοδικά των μονοπατιών της PERK και της ATF6, 2) το μονοπάτι της IRE1 που ενεργοποιεί την κινάση JNK (c-Jun N-terminal kinase) και 3) την κασπάση-12 που αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και ενεργοποιείται μέσω της απελευθέρωσης ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (εικόνα 8β) (39, 40). Η πρωτεΐνη GRP78 αποτελεί κύριο αισθητήρα του στρες που επάγεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και βασικό μηχανισμό επιβίωσης του κυττάρου, καθώς είναι ικανή να μπλοκάρει την απόπτωση σε διάφορα στάδια (40). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η απόπτωση που επάγεται από βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων στα νεφρικά σωληνάκια, μεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει από το ενδοπλασματικό δίκτυο (39).



Εικόνα 8. Με σκοπό την επιβίωση του κυττάρου υπό συνθήκες στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, οι πρωτεΐνες IRE1, PERK και ATF6 επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια προσαρμογής, που περιλαμβάνουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για μοριακούς συνοδούς, παράγοντες αποικοδόμησης των συσσωρευμένων πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικά ένζυμα (α). Τα κύτταρα που καθίστανται δυσλειτουργικά λόγω έντονου ή παρατεταμένου στρες εξαλείφονται

από τον οργανισμό μέσω αποπτωτικών μονοπατιών που μεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες CHOP, JNK ή caspase 12 (β). Από τη βιβλιογραφική αναφορά (39).

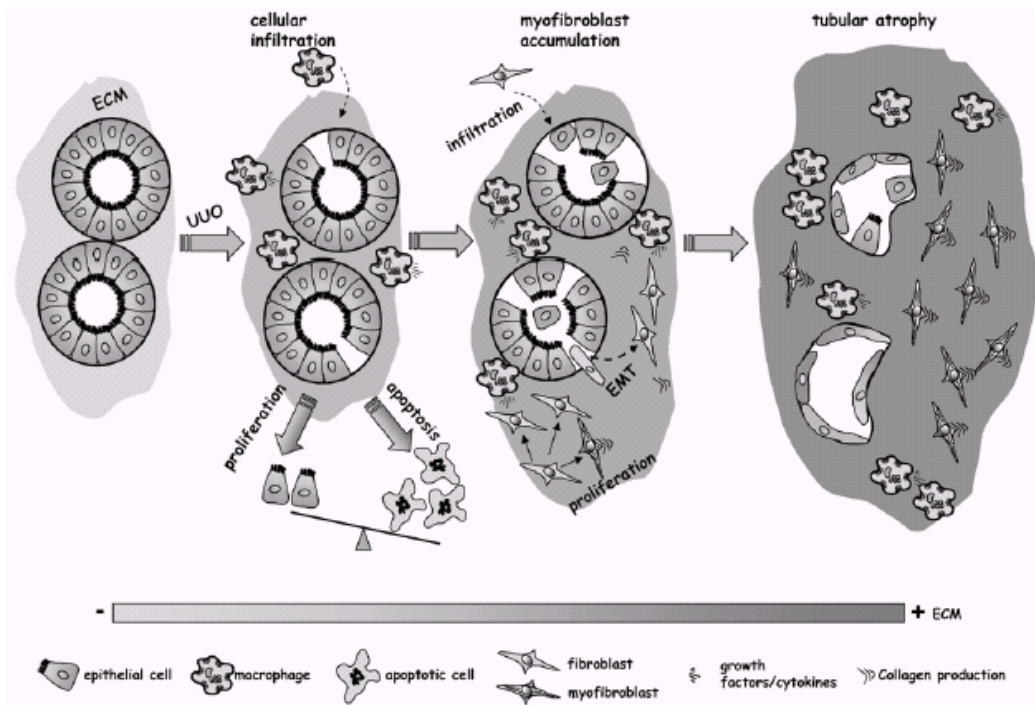
3.2.5 Ζωικά μοντέλα ίνωσης

Οι διαδικασίες ανάπτυξης της ίνωσης έχουν μελετηθεί σε διάφορα μοντέλα, κυρίως τρωκτικών, τα οποία εξετάζουν την πρόκληση ίνωσης σε συγκεκριμένα όργανα υπό την επιρροή διαφορετικών παραγόντων. Πολύ γνωστά είναι τα μοντέλα της ενδοτραχειακής χορήγησης μπλεομυκίνης στον πνεύμονα, της απάλειψης του γονιδίου της δεσμίνης στη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα στη νεφρική ίνωση (42-45). Στις περιπτώσεις αυτές, η ίνωση των διαφόρων οργάνων παρουσιάζει όμοια αλλά και διαφορετικά χαρακτηριστικά, που μπορεί να αντανακλούν τις διαφορές στη λειτουργία και το χαρακτήρα κάθε οργάνου, την ξεχωριστή επίδραση κάθε παράγοντα ερεθισμού, καθώς και την πολυπλοκότητα του φαινομένου. Για παράδειγμα, η ίνωση του πνεύμονα στο μοντέλο της μπλεομυκίνης αναπτύσσεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και χαρακτηρίζεται από την εισροή μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών κυττάρων και ινοβλαστών στον πνεύμονα, ενώ η απώλεια των καρδιακών κυττάρων καθώς και η ανάπτυξη φλεγμονής και ίνωσης στη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια παρατηρούνται σε μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.2.5.1 Μοντέλα νεφρικής ίνωσης: η μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε τρωκτικά

Στην περίπτωση του νεφρού, η ίνωση που αναπτύσσεται στο διάμεσο χώρο μεταξύ των νεφρικών σωληναρίων (tubulointerstitial fibrosis) είναι το τελικό αποτέλεσμα πολλών νεφρικών ασθενειών και οδηγεί σε προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Για τη μελέτη της νεφρικής ίνωσης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ζωικά μοντέλα, όπως τρωκτικά μετά από χορήγηση θειαζιδίων και άλλων χημικών παραγόντων (αδριαμυκίνη, πουρομυκίνη) ή αντισωμάτων που στοχεύουν τη βασική μεμβράνη των νεφρικών σωληναρίων ή των σπειραμάτων, διαγονιδιακοί ποντικοί που υπερεκφράζουν τον παράγοντα TGF-β1 σε συγκεκριμένο τμήμα του νεφρού, διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν τα γονίδια ρενίνης ή αγγειοτενσίνης, καθώς και μοντέλα αποφρακτικής νεφροπάθειας (9, 10, 45-47).

Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο νεφρικής ίνωσης αποτελεί εκείνο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά (Unilateral Ureteral Obstruction model) που χαρακτηρίζεται από οξεία και πλήρη απόφραξη του ουρητηρικού αγωγού, οδηγώντας σε εκφυλισμό των νεφρικών σωληναρίων και ανάπτυξη ίνωσης. Η κατάσταση αυτή συναντάται σπάνια στους ανθρώπους (π.χ. σε νεογνά με συγγενείς ανωμαλίες του ουρικού σωλήνα και σε άνδρες με ασθένεια του αδένου του προστάτη), αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι μιμείται σε σύντομο χρονικό διάστημα τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης και για το λόγο αυτό αποτελεί πλέον ένα από τα καθιερωμένα μοντέλα μελέτης. Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά της ινωτικής παθολογίας αναπτύσσονται όλα μέσα σε μια εβδομάδα από την άσκηση της απόφραξης και εμφανίζουν υψηλή αναπαραγωγιμότητα από το ένα πείραμα στο άλλο. Αυτά περιλαμβάνουν την εισροή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο νεφρικό διάμεσο χώρο (tubulointerstitium), τον αυξημένο πολλαπλασιασμό αλλά και απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων με τελικό αποτέλεσμα τον εκφυλισμό τους, τη συσσώρευση μυοϊνοβλαστών και την ανεξέλεγκτη εναπόθεση εξωκυττάριου στρώματος (εικόνα 9) (45).



Εικόνα 9. Περίληψη των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης της αποφρακτικής νεφροπάθειας. Η πειραματική ουρητηρική απόφραξη επάγει τη διείσδυση μακροφάγων στο διάμεσο χώρο των

νεφρικών σωληναρίων. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που από τη μια πλευρά ευνοούν την απόπτωση και ατροφία των νεφρικών κυττάρων, και από την άλλη επάγουν την ενεργοποίηση των ινοβλαστών. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες παράγουν εξωκυττάριο στρώμα που σταδιακά συσσωρεύεται οδηγώντας στην ανάπτυξη ίνωσης. Από τη βιβλιογραφική αναφορά (45).

Λίγες ώρες μετά την ουρητηρική απόφραξη παρατηρείται διείσδυση και συσσώρευση φλεγμονοδών κυττάρων στο διάμεσο χώρο μεταξύ των νεφρικών σωληναρίων. Τα κύτταρα αυτά, που περιλαμβάνουν κυρίως μακροφάγα, προέρχονται από τα τοπικά αιμοφόρα αγγεία και εισέρχονται στο νεφρικό διάμεσο χώρο δημιουργώντας επαφές μεταξύ υποδοχέων της επιφανείας τους και μορίων προσκόλλησης που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Δεδομένα που αποκτήθηκαν από τη δημιουργία ποντικών με απάλειψη κάποιων από αυτά τα μόρια (knockout ποντίκια) έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών osteopontin και CD44 καθώς και εκείνη μεταξύ των μορίων sulfatide και L-selectin, που βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων αντίστοιχα, είναι απαραίτητες για τη μετανάστευση των μακροφάγων στο νεφρικό ιστό στο μοντέλο UUO. Ακόμα, άλλα σημαντικά μόρια προσκόλλησης και κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των ICAM-1, VCAM-1 και MCP-1, συνεισφέρουν στη στρατολόγηση των μακροφάγων και των άλλων λευκοκυττάρων στο μοντέλο UUO (16).

Τα στρατολογούμενα μακροφάγα εκκρίνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που επάγουν μια ανισορροπία ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των νεφρικών κυττάρων, οδηγώντας στην προοδευτική κυτταρική ατροφία και απώλεια των νεφρικών σωληναρίων. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ρυθμίζεται θετικά από τις κυκλίνες (cyclins) και τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases), και αρνητικά από αναστολείς του κυτταρικού κύκλου που απενεργοποιούν τα σύμπλοκα κυκλινών-κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors). Κάποιοι από αυτούς τους αναστολείς, όπως οι p21 και p27 που ανήκουν στην οικογένεια των αναστολέων CIP/KIP, έχει δείξει πως συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο νεφρικό ιστό μετά την επαγωγή ίνωσης με ουρητηρική απόφραξη. Απάλειψη των γονιδίων p21 και p27 με τη δημιουργία knockout ποντικών είχε σαν αποτέλεσμα τον υψηλότερο πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστών και των επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων αντίστοιχα, χωρίς όμως να επηρεάσει την ανάπτυξη της

επαγόμενης ίνωσης. Μια άλλη πρωτεΐνη που επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή την απόπτωση είναι ο μεταγραφικός παράγοντας p53. Knockout ποντίκια για τον παράγοντα p53 παρουσίασαν λιγότερη κυτταρική απόπτωση μετά την επαγωγή ίνωσης στο μοντέλο UUO. Ωστόσο, το γεγονός ότι η απάλειψη συγκεκριμένων παραγόντων ελέγχου του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης δεν επηρέασε ολοκληρωτικά τις συγκεκριμένες διεργασίες υποδεικνύει ότι ένας μεγάλος αριθμός μεσολαβητών με πιθανόν λειτουργική συμπληρωματικότητα και χρονικά ή τοπικά περιορισμένη δράση εμπλέκεται στη ρύθμισή τους.

Εκτός από τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των νεφρικών κυττάρων, οι εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες πυροδοτούν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστών, ένα σημαντικό γνώρισμα του νεφρικού ιστού μετά την επαγωγή της ουρητηρικής απόφραξης. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες παράγουν παθολογικά αυξημένη ποσότητα εξωκυττάριου στρώματος, γεγονός που εγκαθιστά μια ανισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση και την αποικοδόμησή του οδηγώντας στην ανάπτυξη ίνωσης. Η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας πιστεύεται πως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου που ενεργοποιεί με τη σειρά του τις μεταλλοπρωτεάσες του στρώματος (MMPs). Ο κύριος αναστολέας των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου, η πρωτεΐνη PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), βρίσκεται αυξημένη σε όλες σχεδόν τις νεφρικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένων των αποφρακτικών παθήσεων του νεφρού. Η εφαρμογή ουρητηρικής απόφραξης σε knockout ποντίκια για τον παράγοντα PAI-1 οδήγησε στην ανάπτυξη ίνωσης σε σημαντικά χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με τα control ποντίκια, συνοδευόμενη από μείωση στον αριθμό των μυοϊνοβλαστών. Ωστόσο, στα knockout ποντίκια δεν παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργοποίηση του συστήματος του πλασμινογόνου, αλλά σημαντική μείωση στον αριθμό των ενεργοποιημένων μακροφάγων, γεγονός που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο του παράγοντα PAI-1 στη φλεγμονώδη αντίδραση.

Ένα άλλο σύστημα που προάγει την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας στις νεφρικές ασθένειες είναι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, γνωστό με τη συντομογραφία RAS (Renin Angiotensin System). Στο σύστημα αυτό, η αγγειοτενσίνη II είναι ο κύριος προ-ινωτικός παράγοντας που παράγεται από το πρόδρομο αγγειοτενσινογόνο μέσω της δράσης της ρενίνης και του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης I σε II (Angiotensin Converting Enzyme). Η αγγειοτενσίνη II συνδέεται σε διαμεμβρανικούς κυτταρικούς υποδοχείς

ενεργοποιώντας ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την παραγωγή μεγάλου αριθμού προ-φλεγμονοδών και προ-ινωτικών κυτοκινών, όπως τα μόρια TNFα και TGFβ. Η δράση της αγγειοτενσίνης II στο μοντέλο UUO εξισορροπείται από την παραγωγή της βραδυκινίνης μέσω του συστήματος κινίνης-καλλικρεΐνης. Η βραδυκινίνη προσδένεται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς οδηγώντας στην ενδοκυτταρική ενεργοποίηση του συστήματος του πλασμινογόνου, την παραγωγή των μεταλλοπρωτεασών του στρώματος και την επακόλουθη αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Παρά τις ουσιώδεις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί μέχρι σήμερα πάνω στη ρύθμιση της παραγωγής του εξωκυττάριαου στρώματος, περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για τη διαλεύκανση της αλληλεπίδρασης των συστημάτων που περιγράφηκαν και την καλύτερη κατανόηση των ιδιοτήτων και του ρόλου τους στις ινωτικές ασθένειες.

Ένα τελευταίο μόριο-κλειδί της ινωτικής διαδικασίας, ο ρόλος του οποίου έχει μελετηθεί και στο μοντέλο της ουρητηρικής απόφραξης, είναι ο παράγοντας TGF-β. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα, ο TGF-β αποτελεί το μόνο γνωστό παράγοντα ικανό να επάγει όλα τα στάδια της ινωτικής διαδικασίας, ενώ οι δράσεις του σχετίζονται με μείωση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεασών του στρώματος, αύξηση των αναστολέων TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) και PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), καθώς και αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Η εφαρμογή ουρητηρικής απόφραξης σε knockout ποντίκια για συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β υπέδειξε το σημαντικό ρόλο του στην επαγωγή της ίνωσης (βλέπε 3.2.3.3.2). Ακόμα, δεδομένα από knockout ποντίκια αποκάλυψαν πως η παραγωγή ενεργού παράγοντα TGF-β ελέγχεται από τις ιντεγκρίνες (διαμεμβρανικοί κυτταρικοί υποδοχείς για συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας) και το σύστημα του πλασμινογόνου.

3.3 Η ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΑΝ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΝΕΦΡΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Η πρόσφατη πρόοδος στη βιοτεχνολογία και την πρωτεωμική ανάλυση προσέφερε έναν αρτιότερο τρόπο μελέτης των αλλαγών που συντελούνται στους

ιστούς σε παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των νεφρικών ασθενειών (48-51). Μια από τις πολλά υποσχόμενες τεχνικές αποτελεί η φασματοσκοπία μάζας των πρωτεϊνών (mass spectrometry), μέσω της οποίας μπορούν να ταυτοποιηθούν πρωτεΐνες που βρίσκονται σε υγρά του σώματος ή δείγματα ιστών, σε μεγάλη κλίμακα. Κάποιες από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την έγκαιρη πρόγνωση και διάγνωση των νεφρικών ή άλλων ασθενειών, καθώς και ως στόχοι θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Ειδικότερα όσον αφορά στις νεφρικές ασθένειες, η πρωτεωμική ανάλυση κυρίως δειγμάτων ούρων έχει αποκαλύψει την παρουσία σε αυτά γνωστών πρωτεϊνών που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις στα νεφρά και προέρχονται από εκκρίσεις των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων (48). Τέτοιες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις aquaporin-2, polycystin-1, podocin, non-muscle myosin II, angiotensin-converting enzyme, $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC2), thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) και άλλες. Ακόμα, πρωτεωμικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί τόσο σε ανθρώπινα δείγματα όσο και σε ζωικά μοντέλα για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών στη διαβητική νεφροπάθεια, την αλβουμινουρία, καθώς και άλλες παθήσεις του νεφρικού σπειράματος και των νεφρικών σωληναρίων, με σκοπό το διαγνωστικό διαχωρισμό του παθολογικού από το φυσιολογικό ιστό αλλά και τη βαθύτερη κατανόηση των μορίων και των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση των ασθενειών (49, 52).

3.3.1 Εφαρμογή της πρωτεωμικής ανάλυσης στο ινωτικό μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά

Η διεξαγωγή πρωτεωμικής ανάλυσης για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με νεφρικές ασθένειες πραγματοποιείται συχνότερα σε δείγματα ούρων, καθώς μπορούν να αποκτηθούν με μη επεμβατικό τρόπο και σε μεγάλη ποσότητα. Ωστόσο, από τα δείγματα αυτά απουσιάζουν πολλές πρωτεΐνες του νεφρικού ιστού που μπορεί να μεταβάλλονται σημαντικά σε παθολογικές καταστάσεις διαδραματίζοντας ουσιαστικό ρόλο στην εξέλιξη της νεφρικής ασθένειας.

Με σκοπό την πληρέστερη εξέταση των μορίων που εμπλέκονται στη νεφρική ίνωση, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας λεπτομερής πρωτεωμική

ανάλυση του νεφρικού φλοιού στο μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε αρουραίο, η οποία δεν είχε αναφερθεί μέχρι τότε στη βιβλιογραφία (53). Αν και στο συγκεκριμένο μοντέλο η συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας παρατηρείται μετά την παρέλευση μίας εβδομάδας από την ουρητηρική απόφραξη, η πρωτεωμική ανάλυση διεξήχθη και σε νωρίτερα χρονικά διαστήματα ώστε να επιτευχθεί βαθύτερη ανάλυση των αρχικών σταδίων της ασθένειας και των μορίων που εμπλέκονται σε αυτά.

Συνολικά πραγματοποιήσαμε ανάλυση και σύγκριση δειγμάτων νεφρικού φλοιού από τέσσερις κατηγορίες ζώων: αρουραίους που υπέστησαν ουρητηρική απόφραξη και θυσιάστηκαν μετά από 2 ή 8 ημέρες και τα αντίστοιχα control ζώα των 2 και 8 ημερών. Μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών από τα δείγματα αυτά σε κατάλληλο διάλυμα, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός τους με τη μέθοδο της δυσδιάστατης ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνικών κηλίδων που προέκυψαν, για τον εντοπισμό ποιοτικών και ποσοτικών διαφορών ανάμεσα στα control και τα παθολογικά δείγματα. Οι κηλίδες που παρουσίαζαν ενδιαφέρον υποβλήθηκαν σε MALDI-TOF-TOF φασματοσκοπία μάζας ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες στις οποίες αντιστοιχούσαν.

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των διαφορών ανάμεσα στα δείγματα που συλλέχθηκαν 2 ή 8 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη και τα αντίστοιχα control δείγματα έδειξαν μεταβολές σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αναπτυξιακές διαδικασίες, στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, καθώς και στην κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα (53). Το γεγονός αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, εφόσον αυτές οι διαδικασίες έχουν συνδεθεί με αλλαγές που παρατηρούνται κατά την εξέλιξη της ίνωσης (βλέπε 3.2.3). Κάποιες από τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες παρουσίασαν αλλαγή στην έκφρασή τους και στις δύο παραπάνω συγκρίσεις. Μεταξύ αυτών, οι πρωτεΐνες calreticulin και β -actin βρέθηκαν επιπλέον να μεταβάλλονται ανάμεσα στα ινωτικά δείγματα των 2 και 8 ημερών. Δεδομένου ότι η calreticulin δεν είχε συσχετισθεί μέχρι τότε με ινωτικές διαδικασίες, η μελέτη της πιθανής εμπλοκής της στην εξέλιξη της ίνωσης παρουσιάζει ενδιαφέρον. Τμήμα αυτής της μελέτης αποτελεί η παρούσα διδακτορική διατριβή.

3.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ CALRETICULIN: ΕΝΑ ΜΟΡΙΟ ΜΕ ΠΟΛΛΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Η calreticulin απομονώθηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου 30 χρόνια από το σαρκοπλασματικό δίκτυο μυός κουνελιού, σαν μια πρωτεΐνη με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης ιόντων Ca^{2+} . Σήμερα είναι γνωστό ότι αποτελεί μια κύρια πρωτεΐνη πρόσδεσης και αποθήκευσης ιόντων Ca^{2+} στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, συμβάλλοντας στην ομοιόσταση και τη σηματοδότηση μέσω των ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η ονομασία calreticulin αντανακλά τόσο την ιδιότητα της πρωτεΐνης να προσδένει ιόντα Ca^{2+} όσο και τον εντοπισμό της στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου.

Η αξιοσημείωτη συντήρηση που παρατηρείται τόσο στη γενωμική οργάνωση όσο και την ακολουθία αμινοξέων της πρωτεΐνης σε διαφορετικούς οργανισμούς υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της στην κυτταρική λειτουργία (54). Είναι αποδεκτό ότι η πλειοψηφία των μορίων της calreticulin στο κύτταρο εντοπίζεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Μια από τις λειτουργίες που επιτελεί η πρωτεΐνη εκεί είναι η συμβολή της στην αναδίπλωση και την απόκτηση της τρισδιάστατης δομής πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών. Το ενδοπλασματικό δίκτυο διαθέτει μια εξειδικευμένη ομάδα τέτοιων μοριακών συνοδών, μεταξύ των οποίων βρίσκονται οι ομόλογες προς την calreticulin πρωτεΐνες calnexin και calmeglin. Η calreticulin πιστεύεται πως αναγνωρίζει τα υποστρώματά της μέσω πρόσδεσης στις υδατανθρακικές ομάδες των γλυκοπρωτεϊνών αλλά και σε πεπτιδικές αλληλουχίες.

Η αποκάλυψη του σημαντικού ρόλου και των ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών της calreticulin προήλθε από την κατασκευή κυτταρικών σειρών και ζώων με έλλειψη της πρωτεΐνης. Η κατασκευή knockout ποντικού για το γονίδιο της calreticulin αποτέλεσε την πρώτη αναφορά απόλειψης μιας πρωτεΐνης του ενδοπλασματικού δικτύου σε ζωντανό οργανισμό. Το πιο αξιοπρόσεκτο χαρακτηριστικό των ποντικών αυτών είναι ότι πεθαίνουν κατά το εμβρυϊκό στάδιο λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, γεγονός που υποδεικνύει τη μεγάλη σημασία της calreticulin για την ανάπτυξη της καρδιάς. Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην καρδιά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, ενώ η έκφρασή της στην ώριμη καρδιά μετά τη γέννηση μειώνεται αισθητά. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι το γονίδιο της calreticulin αποτελεί στόχο μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων ενεργοποιητών και καταστολέων της

μεταγραφής, που εμπλέκονται στο καρδιακό αναπτυξιακό πρόγραμμα (55, 56). Αν και ο τρόπος με τον οποίο η calreticulin ελέγχει την ανάπτυξη της καρδιάς δεν είναι πλήρως κατανοητός, το πιθανότερο είναι πως η ιδιότητα της πρωτεΐνης να ρυθμίζει τα κυτταρικά αποθέματα Ca^{2+} παίζει σημαντικό ρόλο (54, 57).

Στο κυτταρικό επίπεδο η έλλειψη της πρωτεΐνης έχει λιγότερο σοβαρές συνέπειες, επιτρέποντας στα κύτταρα να επιζήσουν και να μεγαλώνουν με κανονικούς ρυθμούς ανάπτυξης. Ωστόσο, η απάλειψη ή υπερέκφραση της calreticulin σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχει συσχετίσει την πρωτεΐνη με τη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η απόπτωση, η γονιδιακή έκφραση, η ανοσολογική απόκριση και η κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση (54).

Η ικανότητα της calreticulin να ρυθμίζει την απόπτωση έχει μελετηθεί σε διάφορα συστήματα. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στην κυτταρική σειρά HeLa οδήγησε σε αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων στην απόπτωση, που συνοδευόταν από αυξημένη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Σε αντίθεση, η απάλειψη της πρωτεΐνης από τα κύτταρα είχε τα αντίστροφα αποτελέσματα (58). Αντίστοιχα, η υπερέκφραση της calreticulin σε καρδιομυοκύτταρα αύξησε την ευαισθησία των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες και την απόπτωση που προκλήθηκε από υπεροξείδιο του υδρογόνου (59). Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η λειτουργία της calreticulin είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση και τον πυρηνικό εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα p53, ενός γνωστού επαγωγέα της απόπτωσης (60).

Εξίσου σημαντική φαίνεται να είναι η εμπλοκή της calreticulin στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης (54, 61-65). Η πρωτεΐνη αποτελεί συστατικό των λυτικών κυστιδίων των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, ενώ έχει δειχθεί η αλληλεπίδρασή της με συστατικά του συμπληρώματος και η ικανότητά της να ρυθμίζει την ωρίμανση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των περιφερικών T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, φαίνεται πως η calreticulin ενεργοποιεί τις ανοσολογικές αποκρίσεις, καθώς αυξάνει την εισροή λεμφοκυττάρων σε όγκους και προωθεί την αναγνώριση και απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Αν και η calreticulin διαθέτει μια ειδική πεπτιδική αλληλουχία υπεύθυνη για την παραμονή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, έχει βρεθεί στην επιφάνεια μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων. Ο μηχανισμός μετατόπισης της πρωτεΐνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική επιφάνεια δεν είναι γνωστός, αλλά είναι πιθανό να εμπλέκει το εκκριτικό μονοπάτι του κυττάρου. Έχει δειχθεί η

ικανότητα της calreticulin να διαμορφώνει την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα είτε προσδεδεμένη στις πρωτεΐνες του εξωκυττάρου στρώματος ινωδογόνο και λαμινίνη και σχηματίζοντας σύμπλοκα με τις ιντεγκρίνες (54) είτε επηρεάζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια και την γονιδιακή έκφραση των κυττάρων (66-68). Επιπλέον, η calreticulin στην κυτταρική επιφάνεια αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του εξωκυττάρου στρώματος thrombospondin I επάγοντας την αποσυναρμολόγηση των εστιακών επαφών με το υπόστρωμα και την κυτταρική μετανάστευση (69).

3.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Από τα παραπάνω φαίνεται πως η calreticulin, μια πρωτεΐνη που αρχικά εντοπίστηκε χάρη στην ικανότητά της να προσδένει με υψηλή συγγένεια ιόντα Ca^{2+} , αποτελεί μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη μεγάλης σπουδαιότητας για το κύτταρο που φέρει ποικίλους ρόλους σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Στα πειράματά μας η calreticulin εντοπίστηκε σαν μια πρωτεΐνη που αυξάνεται σημαντικά κατά την εξέλιξη της νεφρικής ίνωσης στο μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα στον αρουραίο. Μάλιστα, η αύξηση δεν παρατηρήθηκε μόνο στα ινωτικά ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, αλλά και κατά την εξέλιξη της ίνωσης από τις 2 στις 8 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Μια αρχική μελέτη με τις τεχνικές του Western blotting και Real-time PCR επιβεβαίωσε την παρατηρούμενη αύξηση της calreticulin στον ινωτικό νεφρικό ιστό τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο RNA (53).

Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να διαλευκάνει το ρόλο που διαδραματίζει η calreticulin, μια πρωτεΐνη με τόσες κυτταρικές λειτουργίες, κατά την εξέλιξη της ινωτικής διαδικασίας, εξετάζοντας την πιθανή συσχέτισή της με κρίσιμες αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την ίνωση. Η ανάλυση αυτή είναι δυνατόν να συμβάλλει στην εύρεση μελλοντικών φαρμακευτικών στόχων με σκοπό την καθυστέρηση ή τη θεραπεία της ανάπτυξης της ίνωσης.

4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΥΛΙΚΑ

4.1.1 Διαλύματα

4.1.1.1 Ηλεκτροφόρηση αгарόζης

5x TBE	54 g Tris 27.5 g Boric acid 20 ml 0.5M EDTA pH 8.0 dH ₂ O μέχρι το 1lt
6x DNA loading buffer	0.25% bromophenol blue 40% (w/v) sucrose σε dH ₂ O

4.1.1.2 Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου

5x Running buffer	15.1 g Tris 94 g Glycine 50 ml 10% SDS dH ₂ O μέχρι το 1lt
--------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

4.1.1.3 Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blotting)

10x Transfer buffer	30.3 g Tris 144.1 g Glycine dH ₂ O μέχρι το 1lt
Blocking buffer	5% dry milk 0.05% Tween20 σε 1x TBS ή 3% dry milk σε 1x PBS (ειδικό για την Calreticulin)
Washing buffer	0.05% Tween20 σε 1x TBS ή

	H ₂ O και PBS-0.05% Tween20 (ειδικό για την Calreticulin)
--	----------------------------------------------------------------------

4.1.1.4 Άλλα διαλύματα

Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x	80 g NaCl 2 g KCl 14.4 g Na ₂ HPO ₄ 2.4 g KH ₂ PO ₄ dH ₂ O μέχρι το 1lt Ρύθμιση του pH στο 7.4 με HCl
Tris Buffered Saline (TBS) 10x	80 g NaCl 2 g KCl 30 g Tris dH ₂ O μέχρι το 1lt Ρύθμιση του pH στο 7.4 με HCl
RIPA	50 mM Tris pH 7.4 1% NP40 0.25% DOC 150mM NaCl 1mM Na ₂ EDTA 1mM PMSF 1ml cocktail inhibitors /10 ⁹ κύτταρα σε dH ₂ O

4.1.2 Θρεπτικά υλικά Κυτταροκαλλιέργειας

4.1.2.1 Θρεπτικό υλικό για βακτηριακές καλλιέργειες *E.coli*

Υγρές καλλιέργειες	Στερεές καλλιέργειες (σε τρυβλία Petri)
Luria Broth medium (Sigma)	Luria Agar medium (Sigma)

4.1.2.2 Θρεπτικό υλικό για καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HK-2

DMEM περιεκτικότητας 4.5% σε γλυκόζη αναμεμειγμένο με ίση ποσότητα F12 και συμπληρωμένο με	10% fetal bovine serum (FBS) L-glutamine (2mM) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)
--------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------

4.1.3 Αντιβιοτικά

Όνομασία	Συγκέντρωση διαλύματος αντιβιοτικού	Συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα
Αμπικιλίνη	50 mg/ml (500x)	100 µg/ml

4.1.4 Στελέχη *E.coli*

Όνομασία	Γονότυπος
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(<i>tet^r)</i>]</i>
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

4.1.5 Κυτταρικές σειρές

Όνομασία	Προέλευση	Περιγραφή
HK-2	Ανθρώπινα κύτταρα από το επιθήλιο των εγγύς νεφρικών σωληναρίων ενήλικου ατόμου	Επιθηλιακή μορφολογία, ισχυρή προσκόλληση στο υπόστρωμα

4.1.6 Ολιγονουκλεοτίδια

4.1.6.1 Ολιγονουκλεοτίδια για κατασκευή ειδικού shRNA μορίου για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin

Όνομασία	Αλληλουχία	Προϊόν υβριδισμού
CALRshRNA-sense	5'GATCCCCGGAGCAGTTTCTGGACG GATTCAAGAGATCCGTCCAGAACT GCTCCTTTTTC 3'	μόριο shRNA ειδικό για την calreticulin
CALRshRNA-antisense	5'TCGAGAAAAAGGAGCAGTTTCTG GACGGATCTCTTGAATCCGTCCAGA AACTGCTCCGGG 3'	μόριο shRNA ειδικό για την calreticulin

4.1.6.2 Εκκινητές για αντίδραση Real-time PCR

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία	Προϊόν Real-time PCR
humCALR-For	GCTGGATCGAATCCAAACAC	human calreticulin
humCALR-Rev	GAGCATAAAAGCGTGCATCC	human calreticulin
18S rRNA-For	AACTTTCGATGGTAGTCGCCG	18S rRNA
18S rRNA-Rev	CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT	18S rRNA
hCOL1A1-Fw	GCCCCGACGGCTCAGAGTCA	human COL1A1
hCOL1A1-Rv	GGATGCCATCTCGGCCAGGG	human COL1A1
hCOL4A1-Fw	CGGCCGTGGGACCTGCAATT	human COL4A1
hCOL4A1-Rv	GACTTGGCAGCGGCTGACGT	human COL4A1
hFN1-Fw	TCATCCCAGAGGTGCCCAACT	human FN1
hFN1-Rv	CTGCCGCAACTACTGTGATGCG	human FN1
hEcadherin-Fw	ATAGAGAACGCATTGCCACATACA	human E-cadherin
hEcadherin-Rv	TTCTGATCGGTTACCGTGATCA	human E-cadherin
hVimentin-Fw	GAATGACCGCTTCGCCAACT	human Vimentin
hVimentin-Rv	CCGCATCTCCTCCTCGTAG	human Vimentin
hActa2-Fw	CGGGACTAAGACGGGAATCCTGTG	human Acta2
hActa2-Rv	CCCAGCAAAGCCGGCCTTACA	human Acta2
hSnai1-Fw	CACTATGCCGCGCTCTTTCCTCG	human Snai1
hSnai1-Rv	CAGCAGGTGGGCCTGGTCGTAG	human Snai1
hSnai2-Fw	GCCAAACTACAGCGAACTGGACACA	human Snai2

hSnai2-Rv	TGGAGCAGCGGTAGTCCACACA	human Snai2
hTSP1-Fw	GACTAGGCGTCCTGTTCCCTG	human TSP1
hTSP1-Rv	CAAACACGCTGTTGTCTCCG	human TSP1
hTNFa-Fw	CCCATGTTGTAGCAAACCCTC	human TNFa
hTNFa-Rv	TATCTCTCAGCTCCACGCCA	human TNFa
hMCP1-Fw	TCTGTGCCTGCTGCTCATAG	human MCP1
hMCP1-Rv	GGGCATTGATTGCATCTGGC	human MCP1
hIL8-Fw	TGTGAAGGTGCAGTTTTGCCA	human IL8
hIL8-Rv	GGGGTGGAAAGGTTTGGAGTA	human IL8
mouse-CALR-fw	TGCTCCTTTTCGGTGCCGCTC	mouse calreticulin
mouse-CALR-rv	CCAGCGGTTGGTCCAGGCATC	mouse calreticulin
mCol1a1-Fw	TGGACGGCTGCACGAGTCAC	mouse Col1a1
mCol1a1-Rv	GCAGGCGGGAGGTCTTGGTG	mouse Col1a1
mCol3a1-Fw	CTGGTCAAGCTGGTCCGGCA	mouse Col3a1
mCol3a1-Rv	AGGTCCAGGCAGTCCACGCT	mouse Col3a1
mCol4a1-Fw	ATGGAATCCCGGGGTCCGGCA	mouse Col4a1
mCol4a1-Rv	GGGAAGCCGGGAAGCCTCT	mouse Col4a1
mFn1-Fw	GCTGCCAGGAGACAGCCGTG	mouse Fn1
mFn1-Rv	GTCTTGCCGCCCTTCGGTGG	mouse Fn1
mTgfb1-Fw	GTGGACCGCAACAACGCCATCT	mouse Tgfb1
mTgfb1-Rv	GCAATGGGGGTTTCGGGCACT	mouse Tgfb1
mSnai1-Fw	TCCGCACCCACACTGGTGAGA	mouse Snai1
mSnai1-Rv	GGTTTGGAGGTGGGCACGCA	mouse Snai1
mSnai2-Fw	ACGCCTCCAAGAAGCCCAACT	mouse Snai2
mSnai2-Rv	GGGCTGTATGCTCCCGAGGTG	mouse Snai2
mTSP1-Fw	CAATTTTCAGGGGGTGCTGC	mouse TSP1
mTSP1-Rv	CCGTTACACGTTGTTGTC	mouse TSP1
mMcp1-Fw	CATCCACGTGTTGGCTCA	mouse Mcp1
mMcp1-Rv	GATCATCTTGTGGTGAATGAGT	mouse Mcp1
mTNFa-Fw	TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG	mouse TNFa
mTNFa-Rv	ATGAGAGGGAGGCCATTTG	mouse TNFa

4.1.7 Αντισώματα

Όνομασία αντισώματος	Εταιρεία	Κωδικός
a-calreticulin	Upstate	#06-661

a-E-cadherin	BD	610181
a-vinculin	Sigma	V9131
a-vimentin	Thermo Scientific	#MS-129
a-GRP78	Acris	AP06149PU-N
a-fibronectin	Santa Cruz	sc-8422
a-COL1A1	Santa Cruz	sc-25974
a-phospho-Smad3	Abcam	ab52903
a-Smad3	Cell Signaling	#3102
a-β-actin	Sigma	A5316
a-β-tubulin	Abcam	ab6046
a-BrdU	Abcam	ab6326
a-collagen IV	Sigma	C1926
a-cleaved caspase-3	Cell Signaling	#9661
a-alpha SMA	Abcam	ab76549
a-rabbit/mouse/goat-HRP	Sigma	n/a
Alexa Fluor fluorescent secondary antibodies	Invitrogen	n/a

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών (HK-2)

Η κυτταρική σειρά HK-2 καλλιεργήθηκε στο ειδικό θρεπτικό υλικό (βλέπε 4.1.2.2) σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂, παρουσία υγρασίας. Τα κύτταρα διατηρούνταν σε φλάσκες καλλιέργειας των 25 cm² ή των 75 cm² σε συνολικό όγκο 5 και 10 ml αντίστοιχα, ενώ ανακαλλιεργούνταν κάθε 3-4 ημέρες σε αναλογία 1:4 με μεταφορά σε νέες φλάσκες με φρέσκο θρεπτικό υλικό.

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιούνταν όταν ο κυτταρικός πληθυσμός είχε φτάσει στο σημείο να καλύπτει την επιφάνεια της φλάσκας σε ποσοστό ~80%, ώστε τα κύτταρα να συνεχίζουν να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Αφού το καλλιεργητικό υλικό αφαιρούνταν από τη φλάσκα, τα κύτταρα επωάζονταν με 1-2 ml διαλύματος θρυψίνης στους 37°C για χρονικό διάστημα 5-10 λεπτών, ώστε να ξεκολλήσουν από την επιφάνεια της φλάσκας. Ακολουθούσε προσθήκη στη φλάσκα 2πλάσιου όγκου θρεπτικού υλικού με ορό για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε 15 ml falcon και φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 10 λεπτά.

Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και μεταφερόταν σε νέες φλάσκες όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για το πάγωμα και την αποθήκευση των κυττάρων στους -135°C , ακολουθούσαν η διαδικασία της θρυψινοποίησης που περιγράφηκε παραπάνω, και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 7,5% DMSO και μεταφερόταν σε ειδική αμπούλα όγκου 2ml. Ακολουθούσε σταδιακή ψύξη στους -20°C , στη συνέχεια στους -80°C , και γινόταν τελική αποθήκευση στους -135°C . Για την επανακαλλιέργεια των κυττάρων, οι αμπούλες ξεπάγωναν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C και τα κύτταρα κατακρημνίζονταν με προσθήκη 3πλάσιου όγκου θρεπτικού υλικού σε 15 ml falcon και φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και μεταφερόταν σε φλάσκες καλλιέργειας.

4.2.2 Κατασκευή κυτταρικών σειρών HK-2 με σταθερή υπερέκφραση ή υποέκφραση της πρωτεΐνης calreticulin

4.2.2.1 Κατασκευή κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα που φέρει το cDNA για την πρωτεΐνη calreticulin

Ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το cDNA για την πρωτεΐνη calreticulin του ποντικού (pcDNA-mCRT) μας χορηγήθηκε από τον Dr. Yoshito Ihara (Wakayama Medical School, Japan). Η αλληλουχία του cDNA της calreticulin (mCRT) υπο-κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, σχεδιασμένο για υπερέκφραση πρωτεϊνών, που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη (pcDNA3.1-hygro), ως εξής:

- Η αλληλουχία του cDNA της calreticulin απομονώθηκε από το πλασμίδιο με πέψη με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού.
- Το προϊόν της πέψης φορτώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης ώστε να διαχωριστεί το τμήμα του cDNA της calreticulin από τον πλασμιδιακό φορέα.
- Το τμήμα του cDNA της calreticulin απομονώθηκε από το gel αγαρόζης με τη μέθοδο του gel extraction, με χρήση του QIAquick Gel Extraction kit από την QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Στη συνέχεια, ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-hygro (βλέπε παράρτημα) έγινε γραμμικός με πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που έχουν μοναδικές θέσεις αναγνώρισης στην αλληλουχία multiple cloning site (MCS) του φορέα. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ένζυμα με τα οποία είχε απομονωθεί το cDNA της calreticulin από τον προηγούμενο πλασμιδιακό φορέα. Με τον τρόπο αυτό ο φορέας και το cDNA απέκτησαν συμπληρωματικά άκρα.
- Ο γραμμικός πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα του cDNA συνδέθηκαν ομοιοπολικά από την T4 DNA λιγάση στα συμβατά τους άκρα, ώστε να δημιουργηθεί ένα νέο, ανασυνδυασμένο, κυκλικό πλασμίδιο που φέρει το cDNA της calreticulin του ποντικού καθοδικά ενός ισχυρού υποκινητή (CMV promoter), ο οποίος είναι ικανός να μεταγράψει το cDNA της calreticulin σε μεγάλες ποσότητες.
- Το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli* τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri με LB-agar και επώαστηκαν στους 37°C overnight, ώστε να αναπτυχθούν αποικίες που θα έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
- Επιλεγμένες αποικίες στη συνέχεια εμβολιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια LB (3ml) και επώαστηκαν στους 37°C overnight για να αναπτυχθούν. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-preparation) από μέρος της καλλιέργειας με χρήση του QIAprep Spin Miniprep kit της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Το απομονωμένο DNA υπέστη πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ακολούθως ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης, ώστε να διαπιστωθεί με βάση τα τμήματα που προέκυψαν από την αντίδραση πέψης εάν το απομονωμένο πλασμίδιο περιλαμβάνει πράγματι το cDNA της calreticulin ή τον άδειο φορέα.
- Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες από τις οποίες απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εμβολιάστηκαν σε μεγαλύτερη υγρή καλλιέργεια (100ml) και επώαστηκαν στους 37°C overnight για να αναπτυχθούν. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi-preparation) με χρήση του Plasmid Midi kit της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο (pcDNA3.1-hygro-mCRT) χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κυττάρων HK-2, με σκοπό την κατασκευή κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη calreticulin.

4.2.2.2 Κατασκευή κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα που φέρει ειδικό shRNA μόριο για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin

Ειδικές sense και antisense αλληλουχίες (βλέπε 4.1.6.1) υβριδίστηκαν σε διάλυμα 10mM Tris pH 8.0/50mM NaCl, με επώαση στους 95°C για 5 λεπτά και σταδιακή επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν σε ειδικό πλασμιδιακό φορέα, pSuper.retro.puro (βλέπε παράρτημα), που είχε κοπεί με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού με διαδικασία ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε 4.2.2.1). Τα ανασυνδυσμένα πλασμίδια απομονώθηκαν με την ίδια διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και εμβολιασμού υγρής καλλιέργειας, ακολουθούμενων από παρασκευή πλασμιδιακού DNA. Το πλασμίδιο που απομονώθηκε (pSuper.retro.puro-shRNA.CRT) χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κυττάρων HK-2, με σκοπό την κατασκευή κυτταρικών σειρών που υποεκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη calreticulin.

4.2.2.3 Σταθερή διαμόλυνση των κυττάρων HK-2 με πλασμίδιο που φέρει το cDNA για την πρωτεΐνη calreticulin ή ειδικό shRNA μόριο για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin

Για το σκοπό της διαμόλυνσης, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειας σε πιάτο των 6 θέσεων (6-well plate), κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας (βλέπε 4.2.1). Μετά τη θρυψινοποίηση των κυττάρων και την επαναδιάλυση σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, μετρήθηκε ο αριθμός τους με τη βοήθεια ενός αιμοκυτταρόμετρου και επιστρώθηκαν 3×10^5 κύτταρα/well στο πιάτο των 6 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες 37°C/5%CO₂ overnight και διαμολύνθηκαν την επόμενη ημέρα. Για την κατασκευή κυτταρικών σειρών που θα υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη calreticulin, ένα μέρος των κυττάρων διαμολύνθηκε με το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο pcDNA3.1-hygro-mCRT. Ένα άλλο μέρος των κυττάρων διαμολύνθηκε με τον άδειο

πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-hygro, ώστε να κατασκευαστούν κυτταρικές σειρές που θα χρησιμοποιηθούν ως control. Αντίστοιχα, για την κατασκευή κυτταρικών σειρών που θα υποεκφράζουν την calreticulin, ένα μέρος των κυττάρων διαμολύνθηκε με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pSuper.retro.puro-shRNA.CRT και ένα άλλο μέρος των κυττάρων με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pSuper.retro.puro.

Η διαμόλυνση των κυττάρων HK-2 διεξήχθη με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 (λιποφεκταμίνη) από την Invitrogen, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Το προς διαμόλυνση πλασμιδιακό DNA (3μg) αναμείχθηκε με 100 μl Optimem (θρεπτικό υλικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό, Invitrogen) και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 2 μl λιποφεκταμίνης αναμείχθηκαν με 100 μl Optimem και επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες.
- Το μείγμα του DNA προστέθηκε, στη συνέχεια, σταδιακά στο μείγμα της λιποφεκταμίνης και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 0.5 ml Optimem/well και μετά την προσθήκη 800 μl Optimem σε κάθε well, προστέθηκαν σταγόνα-σταγόνα τα σύμπλοκα του DNA με τη λιποφεκταμίνη.
- Ακολούθησε επώαση στους 37°C/5%CO₂ για 4-5 ώρες, ώστε τα κύτταρα να προσλάβουν τα σύμπλοκα του DNA.
- Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό διαμόλυνσης αφαιρέθηκε λόγω της τοξικότητας της λιποφεκταμίνης και αντικαταστάθηκε με το συνηθισμένο θρεπτικό υλικό για την κυτταρική σειρά HK-2.
- Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες στις συνθήκες ανάπτυξής τους και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας των 10mm (10mm culture dishes) με θρυψινοποίηση.
- Την επόμενη ημέρα προτέθηκε στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων το αντιβιοτικό υγραμοκίνη (hygromycin) σε τελική συγκέντρωση 200 μg/ml για τα κύτταρα με υπερέκφραση ή πουρομοκίνη (puromycin) σε τελική συγκέντρωση 2 μg/ml για τα κύτταρα με υποέκφραση, ώστε να αρχίσουν να πεθαίνουν σταδιακά τα κύτταρα που δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίστατο κάθε 2-3 ημέρες με την προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικό.

- Τα κύτταρα που προσέλαβαν το πλασμίδιο κατά τη διαμόλυνση επιβίωσαν και πολλαπλασιάστηκαν φτιάχνοντας ξεχωριστούς κλώνους κυττάρων στο πιάτο καλλιέργειας, μετά από διάστημα 10-12 ημερών.
- Οι ξεχωριστοί κλώνοι μεταφέρθηκαν σε διαφορετικές θέσεις πιάτου καλλιέργειας 24 θέσεων (24-well plate) σε θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, και αφού πολλαπλασιάστηκαν μεταφέρθηκαν σταδιακά σε 12-well και 6-well plates.
- Τα κύτταρα από τα 6-well plates επεξεργάστηκαν με τους εξής τρόπους: για κάθε ξεχωριστό κλώνο, ένα μέρος των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (βλέπε 4.2.3) και ένα άλλο μέρος καταψύχθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό (βλέπε 4.2.1).
- Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε ώστε να ελεγχθεί με την τεχνική του Western blotting το επίπεδο της υπερέκφρασης ή υποέκφρασης της calreticulin στους κλώνους που συλλέχθηκαν. Συγκρίθηκε η έκφραση της calreticulin στους κλώνους με την υπερέκφραση σε σχέση με τους control κλώνους και επιλέχθηκαν οι επιθυμητοί κλώνοι για επακόλουθη μελέτη: ένας control κλώνος, ένας κλώνος με μικρή και ένας με μεγάλη υπερέκφραση. Ακόμα, συγκρίθηκε η έκφραση της calreticulin στους κλώνους με την υποέκφραση σε σχέση με τους control κλώνους και επιλέχθηκαν οι επιθυμητοί κλώνοι για επακόλουθη μελέτη: ένας control κλώνος και δύο κλώνοι με σημαντική μείωση της έκφρασης της calreticulin.
- Οι επιλεγμένοι κλώνοι αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 100 μg/ml υγρομυκίνη (κύτταρα με υπερέκφραση) ή 1 μg/ml πουρομυκίνη (κύτταρα με υποέκφραση).

4.2.3 Εκχύλιση πρωτεϊνών

4.2.3.1 Γενική διαδικασία

Η εκχύλιση πρωτεϊνών από καλλιεργούμενα κύτταρα HK-2 ή νεφρικό ιστό πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη συλλογή δειγμάτων για Western blotting.

Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε πιάτα καλλιέργειας των 6 θέσεων (6-well plates) και επωάζονταν στις συνθήκες ανάπτυξής τους μέχρι να καλύψουν το 80% της επιφάνειας (έως 48 ώρες). Στη συνέχεια συλλέγονταν με

θρυψινοποίηση: το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και τα κύτταρα επωάζονταν με 0.5 ml θρυψίνη/well μέχρι να ξεκολλήσουν από την επιφάνεια του καλλιεργητικού πιάτου (περίπου 5 λεπτά στους 37°C). Ακολουθούσε προσθήκη 1.5 ml θρεπτικού υλικού ανά well για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε 2 ml erpendorfs και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα ξεπλενόταν με 1 ml PBS και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά την απόχυση του PBS τα κύτταρα λύονταν με επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl διαλύματος RIPA και επώαση για 45 λεπτά στον πάγο, συνοδευόμενη από ανάδευση του εκχυλίσματος κάθε 10-15 λεπτά. Κατόπιν, πραγματοποιούνταν κατακρήμνιση των κυτταρικών μεμβρανών με φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές/4°C για 20 λεπτά, και το υπερκείμενο που περιείχε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφερόταν σε νέα erpendorfs.

Για την περίπτωση του ιστού, κομμάτια νεφρικού ιστού αποθηκευμένα στους -80°C ομογενοποιούνταν σε 500 μl διαλύματος RIPA με τη χρήση ειδικού εμβόλου, μεταφέρονταν σε erpendorf tubes και επωάζονταν 45 λεπτά στον πάγο, με ανάδευση κάθε 10-15 λεπτά. Ακολουθούσε κατεργασία του εκχυλίσματος με υπερήχους (sonication), 2 φορές για 15 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει καλύτερη διάσπαση των κυττάρων και εκχύλιση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές/4°C για 20 λεπτά και το υπερκείμενο που περιείχε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφερόταν σε νέα erpendorfs.

4.2.3.2 Ειδική διαδικασία για την ανίχνευση κολλαγόνου I σε ξεχωριστά κυτταρικά κλάσματα

Η ανίχνευση κολλαγόνου I πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά στο θρεπτικό υλικό, στο εξωκυττάριο στρώμα και στο κυτταρικό εκχύλισμα καλλιεργούμενων κυττάρων HK-2.

Για την ανίχνευση κολλαγόνου I στο θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 24 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού για 48 ώρες. Ακολουθούσε συλλογή του θρεπτικού υλικού παρουσία αναστολέων των πρωτεασών (protease inhibitors), φυγοκέντρηση για κατακρήμνιση των κυττάρων και συμπύκνωσή του σε ειδικό μηχάνημα (Concentrator 5301/Erpendorf). Ίσοι όγκοι από όλα τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε gel πολυακρυλαμιδίου και ακολουθούσε

ανοσοαποτύπωμα κατά Western χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα (βλέπε 4.1.7).

Για την εξέταση της έκφρασης του κολλαγόνου I ξεχωριστά στο κυτταρικό εκχύλισμα και το εξωκυττάριο στρώμα, πραγματοποιήσαμε διαχωρισμό των κλασμάτων αυτών με χρήση deoxycholate (DOC), σύμφωνα με τους Van Duyn Graham et al. (70). Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε πιάτα των 6 θέσεων, καλλιεργούνταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 24-48 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού για άλλες 48 ώρες. Ακολουθούσε ξέπλυμα με PBS, συλλογή των κυττάρων με απόξεση σε διάλυμα DOC (4% DOC σε 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, με προσθήκη 1x διαλύματος αναστολέων πρωτεασών) και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο διατηρούνταν σαν το διαλυτό κυτταρικό κλάσμα, ενώ το ίζημα που περιείχε το αδιάλυτο κλάσμα του εξωκυτταρίου στρώματος επαναδιαλυόταν σε 1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών. Το συνολικό κλάσμα εξωκυτταρίου στρώματος και το 1/10 του κυτταρικού κλάσματος ηλεκτροφορούνταν σε gel πολυακρυλαμίδιου και ακολουθούσε ανοσοαποτύπωμα κατά Western χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα (βλέπε 4.1.7).

4.2.4 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford, η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 απορροφά στα 595 nm όταν συνδέεται με πρωτεΐνες. Η μέθοδος απαιτεί την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα BSA σε dH₂O συγκέντρωσης 1 μg/μl. Διαφορετικές ποσότητες του διαλύματος (0, 5, 10, 20, 25 μl) αραιώνονταν με dH₂O σε τελικό όγκο 100 μl, προσθέτονταν σε 2 ml 1x διαλύματος χρωστικής BIORAD protein assay και η απορρόφησή τους μετρίονταν στα 595 nm. Με βάση τις μετρήσεις κατασκευαζόταν πρότυπη καμπύλη που αντιστοιχούσε τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων BSA σε συγκεκριμένες τιμές απορρόφησης.

Όσον αφορά στα πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων θέλαμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση, η διαδικασία που ακολουθούσαμε ήταν η εξής: κάθε δείγμα αραιωνόταν 1:100 με dH₂O σε τελικό όγκο 100 μl,

προσθέτονταν σε 2 ml 1x διαλύματος χρωστικής και φωτομετρούνταν στα 595 nm. Από τις τιμές απορρόφησης που λαμβάνονταν υπολογιζόταν η πρωτεϊνική συγκέντρωση σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη, και πολλαπλασιάζοντας με το συντελεστή αραίωσης παίρναμε τη συγκέντρωση του αρχικού δείγματος.

4.2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών δειγμάτων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος πραγματοποιούνταν ηλεκτροφόρηση σε κάθετο gel πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Το gel πολυακρυλαμιδίου προέκυπτε από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου και αποτελούνταν από δύο συστατικά μέρη: το gel διαχωρισμού (resolving gel) και το gel συμπύκνωσης των δειγμάτων (stacking gel), που τοποθετούνταν πάνω από εκείνο του διαχωρισμού. Η σύσταση των δύο ειδών gel που παρασκευάζονταν φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

	10% gel διαχωρισμού	5% gel συμπύκνωσης
H₂O	4 ml	2.7 ml
30% Acrylamide/Bis solution (Biorad)	3.3 ml	0.67 ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5 ml	—
1.0M Tris pH 6.8	—	0.5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.04 ml
10% Ammonium Persulfate	0.1 ml	0.04 ml
TEMED	0.004 ml	0.004 ml
	10 ml	4 ml

Μετά τον πολυμερισμό του, το gel πολυακρυλαμιδίου μεταφερόταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης καλυπτόμενο από 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (running buffer).

Για την προετοιμασία των δειγμάτων που θα διαχωρίζονταν κατά μήκος του gel, 30-50 µg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμειγνύονταν με 10x DTT και 4x διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (sample buffer, Invitrogen), και

συμπληρώνονταν με dH₂O μέχρι τελικό όγκο 20 μl. Ακολουθούσε βρασμός των δειγμάτων στους 100°C για 10 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες, και φόρτωσή τους στις ειδικές οπές του stacking gel. Παράλληλα φορτωνόταν στο gel κάποια πρότυπη κλίμακα γνωστών μεγεθών πρωτεϊνικών μορίων, που εξυπηρετούσε τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών στα δείγματά μας.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε σταθερή τάση 120-150 Volts σε θερμοκρασία δωματίου, για χρονικό διάστημα περίπου 1 ώρας. Μετά το διαχωρισμό του μείγματος των πρωτεϊνών κατά μήκος του gel ακολουθούσε η ηλεκτροφορητική μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη διαδικασία του Western blotting, που περιγράφεται στην ενότητα 4.2.6.

4.2.6 Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blotting)

Η μέθοδος του Western blotting χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από το μείγμα των πρωτεϊνών που διαχωρίζονταν με ηλεκτροφόρηση, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο στάδια: την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και την ανοσοενζυμική ανίχνευσή τους.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη απαιτεί τη χρήση ειδικής κασέτας (Invitrogen), στο εσωτερικό της οποίας και από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο τοποθετούνταν δύο σφουγγάρια διαστάσεων 9x7 cm, ένα διηθητικό χαρτί Whatman ίδιων διαστάσεων, το gel πολυακρυλαμιδίου, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα δεύτερο διηθητικό χαρτί και ακόμα δύο σφουγγάρια. Η μεταφορά λάμβανε χώρα σε 1x κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (transfer buffer) συμπληρωμένο με 10% μεθανόλη, σε σταθερές συνθήκες 160mA/25Volts και θερμοκρασίας δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφερόταν σε διάλυμα χρώσης Ponceau-S, που βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά όλων των πρωτεϊνικών ζωνών στη μεμβράνη. Ακολουθούσε αποχρωματισμός της μεμβράνης με dH₂O.

Για τη διεξαγωγή του δεύτερου σταδίου της μεθόδου, την ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών, απαιτείται η επώαση της μεμβράνης με δύο αντισώματα: το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody) που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, και το δευτερογενές αντίσωμα

(secondary antibody) που αναγνωρίζει ειδικά το πρώτο. Με σκοπό την παρεμπόδιση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων, η μεμβράνη επωαζόταν αρχικά με διάλυμα blocking (βλέπε 4.1.1.3) για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα blocking. Η επώαση λάμβανε χώρα στους 4°C overnight. Την επόμενη ημέρα η νιτροκυτταρίνη ξεπλενόταν από την περίσσεια του μη προσδεμένου αντισώματος με διάλυμα washing (βλέπε 4.1.1.3). Πραγματοποιούνταν 3 ξεπλύματα 10 λεπτών έκαστο, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωαζόταν με το δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα blocking, για 1,5 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα, εκτός της ειδικότητας που έχει για το πρωτογενές, φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Μετά την πραγματοποίηση 3 νέων ξεπλυμάτων για την απομάκρυνση της περίσσειας και του δευτερογενούς αντισώματος, γινόταν η ανίχνευση της πρόσδεσης των αντισωμάτων με τη μέθοδο του ECL (Enhanced Chemiluminescence).

Κατά τη μέθοδο ECL, η λουμινόλη οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από το ένζυμο της υπεροξειδάσης εκπέμποντας φως. Το φως αυτό μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το ECL kit της Perkin Elmer. Τα αντιδραστήρια Oxidizing Reagent και Enhanced Luminol Reagent του kit αναμειγνύονταν σε ίση ποσότητα και ακολουθούσε επώαση της μεμβράνης με το μείγμα αυτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετούνταν σε ειδική κασέτα και εκτίθεντο σε φιλμ για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα ανάλογα με την ένταση του σήματος (από λίγα δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά). Η εμφάνιση των φιλμ πραγματοποιούνταν με τη χρήση ειδικού μηχανήματος που μεσολαβούσε την εμβάπτισή τους σε διαλύματα ανάπτυξης (Developer) και μονιμοποίησης (Fixer).

Τα φιλμ σκανάρωνταν και οι εικόνες αναλύονταν με τη χρήση του λογισμικού Quantity One για την ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών. Τα δεδομένα από τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντός μας κανονικοποιούνταν με βάση τις τιμές πυκνότητας για τις πρωτεΐνες αναφοράς β -actin ή β -tubulin.

4.2.7 Ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε τόσο σε κύτταρα HK-2 όσο και σε τομές νεφρικού ιστού με σκοπό τη μορφολογική μελέτη ή/και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης διάφορων πρωτεϊνών. Η τεχνική βασίζεται στην επώαση του δείγματος με δύο αντισώματα: το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody) που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να μελετήσουμε, και το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) που αναγνωρίζει ειδικά το πρώτο και φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη μια φθορίζουσα χρωστική.

Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε πιάτα καλλιέργειας των 24 θέσεων (24-well plates) πάνω σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine, ώστε να διευκολυνθεί η προσκόλληση των κυττάρων σε αυτές. Σε κάθε well τοποθετούνταν αρχικά μια καλυπτρίδα και στη συνέχεια επιστρώνονταν 5×10^4 κύτταρα/well και επωάζονταν για 24 ώρες (overnight) στις συνθήκες ανάπτυξής τους. Για την επαγωγή οξειδωτικού στρες πριν τη χρώση με ενεργοποιημένη κασπάση-3, τα κύτταρα επωάζονταν με 50 μM H_2O_2 σε θρεπτικό υλικό, για 2 ώρες στις συνθήκες ανάπτυξής τους. Στη συνέχεια εφαρμοζόταν το ακόλουθο πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού:

- Τα κύτταρα ξεπλένονταν 2 φορές με PBS στο πιάτο καλλιέργειας και μονιμοποιούνταν με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε PBS, για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά από 2-3 ξεπλύματα με PBS ακολουθούσε επώαση των κυττάρων με διάλυμα blocking 5% FBS-0.1% Triton-X 100 σε PBS, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Αυτή η κατεργασία των κυττάρων αποσκοπούσε στην παρεμπόδιση της μη ειδικής επακόλουθης πρόσδεσης των αντισωμάτων σε πρωτεΐνες.
- Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες αφαιρούνταν από το πιάτο καλλιέργειας με τη βοήθεια λαβίδας και μεταφέρονταν σε τρυβλίο Petri πάνω σε parafilm, όπου πραγματοποιούνταν η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα (έναντι ενεργοποιημένης κασπάσης-3 ή κολλαγόνου IV). Το ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 1% FBS σε PBS, προσθέτονταν στο parafilm, και ακολούθως τοποθετούνταν η καλυπτρίδα με τέτοιο τρόπο ώστε η επιφάνεια στην οποία βρίσκονταν προσκολλημένα τα κύτταρα να έρχεται σε επαφή με το αντίσωμα. Η επώαση λάμβανε χώρα στους 4°C overnight.

- Την επόμενη ημέρα οι καλυπτρίδες ξεπλένονταν 3 φορές με PBS και επώαζονταν με το δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα 1% FBS σε PBS, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος.
- Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαζονταν με διάλυμα της χρωστικής DAPI σε PBS συγκέντρωσης 1μg/ml, η οποία βάφει το γενετικό υλικό και αποτελεί δείκτη των κυττάρων σε πειράματα ανοσοφθορισμού. Η επώαση πραγματοποιούνταν για 10 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά από 3 ξεπλύματα με PBS οι καλυπτρίδες μονιμοποιούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε σταγόνες κόλλας Mowiol 4-88 Reagent, με την επιφάνεια των κυττάρων να εφάπτεται στην πλάκα, και παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο φθορισμού.
- Φυλλάσσονταν στους 4°C.

Τα παρασκευάσματα εξετάζονταν σε μικροσκόπιο φθορισμού και λαμβάνονταν τυχαίες μη επικαλυπτόμενες φωτογραφίες σε μεγέθυνση 200x. Για την ποσοτικοποίηση της χρώσης με ενεργοποιημένη κασπάση-3 γινόταν μέτρηση 500 κυττάρων ανά δείγμα και τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως ποσοστό των μετρήσεων για την ενεργοποιημένη κασπάση-3 (θετικά κύτταρα) προς το DAPI (συνολικά κύτταρα).

Για τη διπλή χρώση τομών νεφρικού ιστού, τομές παραφίνης πάχους 5μm ενυδατώνονταν με σταδιακή επώαση σε διαλύματα ξυλόλης, 100% αιθανόλης, 90% αιθανόλης, 70% αιθανόλης και PBS. Στη συνέχεια, οι τομές επώαζονταν σε διάλυμα 10mM Sodium Citrate pH 6.0 στους 100°C για 10 λεπτά, με σκοπό την αποκάλυψη κρυμμένων αντιγόνων (antigen retrieval). Ακολουθούσε blocking σε διάλυμα 10% FBS-0,1% Triton σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν επώαση με τους επιθυμητούς συνδυασμούς πρωτογενών αντισωμάτων (anti-GRP78/anti-Calreticulin ή anti-Calreticulin μετά από χρώση με TUNEL) σε κατάλληλη αραιώση για 24 ώρες στους 4°C. Η ανίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων γινόταν με επώαση με δευτερογενή φθορίζοντα αντισώματα (βλέπε 4.1.7) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε χρώση των πυρήνων με τη χρωστική DAPI και μονιμοποίηση σε κόλλα Mowiol 4-88 Reagent με τοποθέτηση καλυπτρίδας. Εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού λαμβάνονταν στη συνέχεια σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

Για την χρώση τομών νεφρικού ιστού με α-SMA (α-smooth muscle actin), οι τομές παραφίνης ενυδατώνονταν και γινόταν επώαση σε διάλυμα 10mM Sodium Citrate pH 6.0 στους 80°C για 20 λεπτά. Ακολουθούσε επώαση σε

διαλύματα blocking, πρωτογενούς αντισώματος, δευτερογενούς φθορίζοντος αντισώματος, DAPI και μονιμοποίηση όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, λαμβάνονταν μη επικαλυπτόμενες εικόνες του συνολικού νεφρικού φλοιού σε μεγέθυνση 400x με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Το ποσοστό της χρωματισμένης με α -SMA περιοχής ποσοτικοποιούνταν σε όλες τις εικόνες με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού επεξεργασίας εικόνας (Image J Fiji).

4.2.8 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA και σύνθεση cDNA

Για τη μελέτη της έκφρασης του μηνύματος RNA συγκεκριμένων γονιδίων σε κύτταρα HK-2 ή νεφρικό ιστό ήταν απαραίτητη η απομόνωση του RNA και η σύνθεση του αντίστοιχου cDNA. Ολικό RNA παρασκευάστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI Reagent από την MRC.

Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε πιάτα των 6 θέσεων (6-well plates) και επωάζονταν στις συνθήκες ανάπτυξής τους μέχρι να καλύψουν το 80% της επιφάνειας (24 έως 48 ώρες). Στη συνέχεια, ξεπλένονταν με PBS, λύονταν με την προσθήκη 1 ml TRI Reagent και μεταφέρονταν σε ξεχωριστά erpendorf tubes. Για την περίπτωση του ιστού, κομμάτια νεφρικού ιστού αποθηκευμένα στους -80°C ομογενοποιούνταν σε 1 ml TRI Reagent με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου και μεταφέρονταν σε erpendorf tubes. Σε αυτά προσθέτονταν 100 μl 1-bromo-3-chloropropane και γινόταν γρήγορη ανάδευση για αρκετά δευτερόλεπτα ώστε να δημιουργηθεί ένα αδιαφανές μείγμα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C , ώστε να γίνει διαχωρισμός του RNA από το DNA και τις πρωτεΐνες του δείγματος. Το διαφανές υπερκείμενο που περιείχε το RNA μεταφερόταν σε άλλο erpendorf και σε αυτό προσθέτονταν 500 μl ισοπροπανόλη. Γινόταν καλή ανάμειξη και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C , με σκοπό την κατακρύμνιση του RNA. Το ίζημα του RNA ξεπλενόταν με 70% αιθανόλη και αφηνόταν να στεγνώσει στον αέρα για μερικά λεπτά. Στη συνέχεια επαναδιαλυόταν σε 40 μl RNase-free H_2O .

Μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης, 2-5 μl από κάθε δείγμα ηλεκτροφορούνταν σε 1% gel αγαρόζης, για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ακέραιου RNA. Στην εικόνα του gel φαίνονταν έντονες οι μπάντες που αντιστοιχούσαν στο 18S και 28S rRNA στα 750 και 1500 bp αντίστοιχα. Στη συνέχεια, υπολογιζόταν η συγκέντρωση του RNA με φωτομέτρηση στα 260 nm

και ακολουθούσε κατεργασία των δειγμάτων με το ένζυμο DNaseI (Promega) για την αποικοδόμηση υπολειμμάτων DNA. Σε κάθε αντίδραση προσθέτονταν 10 μg δείγματος RNA, 10 μl DNaseI, 10x διάλυμα αντίδρασης και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 35 μl και επώζονταν στους 37°C για 1 ώρα. Ακολουθούσε προσθήκη 1 μl DNase Stop Solution για τον τερματισμό της αντίδρασης και επώαση στους 65°C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Μετά την κατεργασία με τη DNase μετριόταν πάλι η συγκέντρωση του δείγματος RNA στα 260 nm και διεξαγόταν η σύνθεση του cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, με τη χρήση του ενζύμου ImProm-II reverse transcriptase από την Promega. Σε κάθε αντίδραση προσθέτονταν αρχικά 1 μg RNA, 500 ng μείγματος τυχαίων εκκινητών (random primers) και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 12 μl, και μετά από επώαση 5 λεπτών στους 70°C για την αποδιάταξη του RNA η αντίδραση μεταφερόταν στον πάγο. Ακολουθούσε προσθήκη 4 μl 5x διαλύματος αντίδρασης, 1 μl 10mM dNTPs, 2,4 μl 25mM MgCl₂ και 1 μl ενζύμου. Κατόπιν, πραγματοποιούνταν επώαση σε αυξανόμενες θερμοκρασίες: στους 25°C για 10 λεπτά (πρόσδεση των εκκινητών), στους 42°C για 60 λεπτά (σύνθεση cDNA) και στους 70°C για 15 λεπτά (απενεργοποίηση ενζύμου). Ακολουθούσε φύλαξη του cDNA στους -80°C.

4.2.9 Αντίδραση Real-time PCR

Η αντίδραση Real-time PCR εφαρμόστηκε για την ποσοτική μελέτη της έκφρασης του μηνύματος RNA συγκεκριμένων γονιδίων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του SYBR GreenER kit της Invitrogen σε συνδυασμό με ειδικούς εκκινητές για τα γονίδια που μελετήθηκαν (βλέπε 4.1.6.2), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το cDNA που είχε παραχθεί από RNA απομονωμένο από κύτταρα HK-2 ή νεφρικό ιστό.

Σε κάθε αντίδραση προσθέτονταν 9 μl αραιωμένο cDNA (αραίωση 1:20), 300 nM από τον ειδικό 5'- και 3'-εκκινητή, 10 μl από το SYBR Green supermix (περιέχει την πολυμεράση, το διάλυμα αντίδρασης και τα dNTPs) και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 25 μl. Η αντίδραση λάμβανε χώρα στο ειδικό μηχάνημα ABI Prism 7000 από την Applied Biosystems στις εξής συνθήκες: επώαση στους 50°C για 2 λεπτά, κατόπιν στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούσαν 40 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων στους 95°C, και τέλος μια επώαση στους 60°C για 1 λεπτό. Την αντίδραση συνόδευε ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος (melting curve analysis) από τους 60°C στους 95°C με λήψη μετρήσεων κάθε

0,5°C. Η ανάλυση αυτή διαβεβαιώνει για την παρουσία ενός μόνο προϊόντος στην αντίδραση.

Τα δεδομένα για τα γονίδια ενδιαφέροντος κανονικοποιούνταν με βάση εκείνα από τα γονίδια αναφοράς (18S rRNA ή GAPDH), ώστε να αντισταθμιστούν τυχόν αποκλίσεις στην ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΔΔCt, κατά την οποία υπολογίζεται η διαφορά των C(t)s που λήφθηκαν για το γονίδιο αναφοράς από εκείνα που λήφθηκαν για τα γονίδια του ενδιαφέροντός μας.

4.2.10 Μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε τρωκτικά

Η μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε τρωκτικά (μυς, επίμυες) χρησιμοποιήθηκε ως ένα ευρέως διαδεδομένο ζωικό μοντέλο ανάπτυξης νεφρικής ίνωσης. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε αρσενικούς ενήλικες επίμυες (αρουραίοι) Wistar ή μύες (ποντίκια) C57BL/6J. Για την ουρητηρική απόφραξη, τα ζώα αναισθητοποιούνταν με εισπνοή ισοφλουρανίου παρουσία οξυγόνου, με τη χρήση ειδικού μηχανήματος (Veterinary Anesthesia Ventilator), και διατηρούνταν υπό αναισθησία με συνεχή εισπνοή ισοφλουρανίου καθόλη τη διάρκεια της εγχείρησης. Σε όλη τη διάρκεια του χειρουργείου διατηρούνταν άσηπτες συνθήκες. Πραγματοποιούνταν μικρή τομή στο ύψος της κοιλιακής χώρας του ζώου και ακολουθούσε πλήρης απολίνωση του δεξιού ουρητήρα περίπου 1 cm χαμηλότερα από τη νεφρική πύελο. Η τομή κλεινόταν με ράμματα, τα ζώα ανακτούσαν γρήγορα τις αισθήσεις τους και επέστρεφαν στα κλουβιά τους, όπου είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό, μέχρι να θυσιαστούν. Σαν ομάδα ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν είτε ζώα που είχαν υποστεί τη διαδικασία της εγχείρησης χωρίς απολίνωση του ουρητήρα είτε ο αριστερός κάθε φορά νεφρός που δεν υφίστατο απολίνωση. Μετά την παρέλευση του κατάλληλου χρονικού διαστήματος (από 2 έως 17 ημέρες), τα ζώα θυσιάζονταν και οι νεφροί τους συλλέγονταν, ξεπλένονταν σε διάλυμα PBS και κόβονταν σε μικρά κομμάτια, τα οποία είτε μονιμοποιούνταν για 24 ώρες σε διάλυμα 10% φορμαλίνης και εγκλείονταν σε παραφίνη για λήψη τομών, είτε πάγωναν στιγμιαία σε υγρό άζωτο και χρησιμοποιούνταν για εκχύλιση πρωτεϊνών και RNA.

4.2.11 Χρήση διαγονιδιακών ποντικών ετερόζυγων για την calreticulin

Τα knock-out ποντίκια για την calreticulin, δηλαδή ποντίκια από τα οποία λείπουν και τα 2 αλληλόμορφα του γονιδίου της, πεθαίνουν κατά το εμβρυϊκό στάδιο. Για τις μελέτες μας χρησιμοποιήσαμε ενήλικα ετερόζυγα ποντίκια (C57BL/6J), με ένα λειτουργικό αλληλόμορφο της calreticulin, τα οποία είναι πλήρως βιώσιμα και εκφράζουν περίπου τη μισή ποσότητα πρωτεΐνης σε σχέση με τα φυσιολογικά αγρίου τύπου (wild-type) ποντίκια. Τα ποντίκια αυτά κατασκευάστηκαν από το τμήμα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου της Alberta στον Καναδά (71), το οποίο και μας τα παραχώρησε.

Στα ποντίκια αυτά πραγματοποιήσαμε ουρητηρική απόφραξη, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα, και τα θυσιάσαμε μετά από 8 ή 17 ημέρες για συλλογή των νεφρών και επακόλουθη μελέτη. Σαν control χρησιμοποιήσαμε τον αριστερό μη απολινωμένο νεφρό.

4.2.12 Ιστολογική χρώση με Sirius Red

Η χρώση αυτή είναι ειδική για το κολλαγόνο και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της εναπόθεσης κολλαγόνου στον εξωκυττάριο χώρο κατά την ανάπτυξη της ίνωσης στο νεφρικό ιστό.

Τομές παραφίνης πάχους 5 μm σε αντικειμενοφόρους πλάκες ενυδατώνονταν με σταδιακή επώαση σε διαλύματα ξυλόλης, 100% αιθανόλης, 90% αιθανόλης, 70% αιθανόλης και H_2O . Ακολουθούσε χρώση με διάλυμα 0,1% picric acid (0,5g Sirius red σε 500 ml κορεσμένου υδατικού διαλύματος picric acid) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και 2 δεκάλεπτα ξεπλύματα με όξινο H_2O (5 ml acetic acid σε 1 lt dH_2O). Οι τομές αφυδατώνονταν με σταδιακή επώαση σε διαλύματα 100% αιθανόλης και ξυλόλης, και μονιμοποιούνταν σε κατάλληλο μέσο (DPX mounting medium), με την τοποθέτηση καλυπτρίδας.

Οι τομές εξετάζονταν σε οπτικό μικροσκόπιο και λαμβάνονταν μη επικαλυπτόμενες φωτογραφίες του συνολικού νεφρικού φλοιού σε 400x μεγέθυνση. Το ποσοστό της χρωματισμένης με Sirius Red επιφάνειας υπολογιζόταν με τη χρήση δημόσια διαθέσιμου λογισμικού επεξεργασίας εικόνας (Image J Fiji software).

4.2.13 Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο πολλαπλασιασμός κυττάρων σε καλλιέργεια μελετήθηκε για να συγκριθεί ο ρυθμός ανάπτυξης διαφορετικών ομάδων κυττάρων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ενσωμάτωσης στο DNA της χημικής ουσίας BrdU (βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη).

Τα κύτταρα επιστρώονταν σε στρογγυλές καλυπτρίδες και καλλιεργούνταν για 24 ώρες στις συνθήκες ανάπτυξής τους. Την επόμενη ημέρα επώαζονταν με διάλυμα BrdU για 2 ώρες στους 37°C, ώστε να ενσωματωθεί η ουσία στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4% PFA (paraformaldehyde) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ ακολουθούσε επώαση με διάλυμα 2N HCl για 10 λεπτά, ώστε να γίνει διαπερατή η πλασματική μεμβράνη. Το διάλυμα HCl απενεργοποιούνταν με επώαση των κυττάρων σε διάλυμα 0,1M NaBorate pH 8,5 για 20 λεπτά και ακολουθούσε επώαση με διάλυμα blocking (5% FBS-0,1% Triton σε PBS) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση της ενσωματωμένης ουσίας BrdU γινόταν με επώαση των κυττάρων με πρωτογενές anti-BrdU αντίσωμα (overnight στους 4°C), ακολουθούμενη από επώαση με φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα (για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαζονταν με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI που βάφει μη ειδικά τους πυρήνες (10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου) και μονιμοποιούνταν με την τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε ειδικό μονιμοποιητικό μέσο (Mowiol 4-88 Reagent) πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Τα κύτταρα εξετάζονταν σε μικροσκόπιο φθορισμού και λαμβάνονταν τυχαίες μη επικαλυπτόμενες εικόνες σε μεγέθυνση 200x. Ακολουθούσε μέτρηση του αριθμού των θετικών BrdU σημάτων σε 500 κύτταρα ανά δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν αναλογία των μετρήσεων BrdU (πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα) προς τις μετρήσεις του DAPI (συνολικός αριθμός κυττάρων).

4.2.14 Έλεγχος της απόπτωσης

Η μελέτη της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε τόσο σε καλλιεργούμενα κύτταρα όσο και σε τομές νεφρικού ιστού. Χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό kit από

τη Roche (TUNEL fluorescein), το οποίο μαρκάρει τους πυρήνες με κατακερματισμένο DNA, ένα βασικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης.

Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε καλυπτρίδες και καλλιεργούνταν για 24 ώρες. Για την ευαισθητοποίηση των κυττάρων με H_2O_2 πριν την εξέταση της απόπτωσης, τα κύτταρα επωάζονταν με 50 μM H_2O_2 σε θρεπτικό υλικό, για 2 ώρες στις συνθήκες καλλιέργειάς τους. Στη συνέχεια, μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4% PFA (paraformaldehyde) για 20 λεπτά και γίνονταν διαπερατά με επώαση σε διάλυμα 0.1% Triton X-100 σε 10mM Sodium Citrate pH 6.0, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε επώαση με το μείγμα αντίδρασης TUNEL για 1 ώρα στους 37°C, όπου ειδικό ένζυμο ενσωμάτωνε φθορίζοντα νουκλεοτίδια στο κατακερματισμένο DNA των αποπτωτικών κυττάρων. Οι πυρήνες των κυττάρων μαρκάρονταν με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και τα δείγματα μονιμοποιούνταν σε ειδικό μέσο (Mowiol 4-88 Reagent).

Για τον εντοπισμό των αποπτωτικών κυττάρων στο νεφρικό ιστό, τομές παραφίνης ενυδατώνονταν με σταδιακή επώαση σε διαλύματα ξυλόλης, 100% αιθανόλης, 90% αιθανόλης, 70% αιθανόλης, H_2O και PBS, ενώ ακολουθούσε η ίδια διαδικασία χρώσης και μονιμοποίησης όπως περιγράφηκε παραπάνω για τα κυτταρικά παρασκευάσματα.

Για την μέτρηση της απόπτωσης, τα παρασκευάσματα εξετάζονταν σε μικροσκόπιο φθορισμού και λαμβάνονταν τυχαίες μη επικαλυπτόμενες φωτογραφίες σε μεγέθυνση 200x. Για τα κυτταρικά παρασκευάσματα γινόταν μέτρηση των αποπτωτικών θετικών για TUNEL πυρήνων σε 500 κύτταρα ανά δείγμα και τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως ποσοστό των μετρήσεων TUNEL προς DAPI. Για τα ιστολογικά παρασκευάσματα γινόταν μέτρηση των αποπτωτικών πυρήνων σωληναριακών κυττάρων σε 8-10 εικόνες ανά δείγμα, ενώ τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως μέσος όρος μετρήσεων ανά εικόνα.

Για διπλή χρώση σε νεφρικές τομές παραφίνης, πραγματοποιούνταν πρώτα η διαδικασία χρώσης με TUNEL και ακολουθούσε τυπική χρώση ανοσοφθορισμού (βλέπε 4.2.7).

Ενδεικτική της απόπτωσης στα καλλιεργούμενα κύτταρα ήταν και η χρώση με ενεργοποιημένη κασπάση-3 που περιγράφεται στην ενότητα του ανοσοφθορισμού (βλέπε 4.2.7).

4.2.15 Έλεγχος της κινητικότητας των κυττάρων

Η κινητικότητα των κυττάρων εξετάστηκε με τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος στην κυτταρική επιφάνεια (wound-healing closure assay). Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε πιάτα 48 θέσεων (48-well plates) και καλλιεργούνταν μέχρι να καλύψουν όλη την επιφάνεια. Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαθιστόταν με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό 24 ώρες πριν τη δημιουργία του τραύματος. Τρεις ώρες πριν τη δημιουργία του τραύματος, η ουσία μιτομυκίνη C προσθέτονταν στα κύτταρα σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, για να σταματήσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για την πρόκληση του τραύματος, ένα πλαστικό tip συρόταν ελαφρά κατά μήκος της διαμέτρου της κυτταρικής επιφάνειας, ώστε να δημιουργηθεί μια κενή κυττάρων περιοχή εύρους περίπου 1mm. Τα κύτταρα παρατηρούνταν σε οπτικό μικροσκόπιο και φωτογραφίζονταν σε μεγέθυνση 50x στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά την πρόκληση του τραύματος. Για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής μετανάστευσης μετριόταν το εμβαδόν της κενής από κύτταρα τραυματισμένης περιοχής στα προαναφερθέντα χρονικά σημεία, με τη χρήση ειδικού προγράμματος επεξεργασίας εικόνας (Image J software). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό της τραυματισμένης περιοχής σε κάθε χρονικό σημείο.

4.2.16 Στατιστική ανάλυση

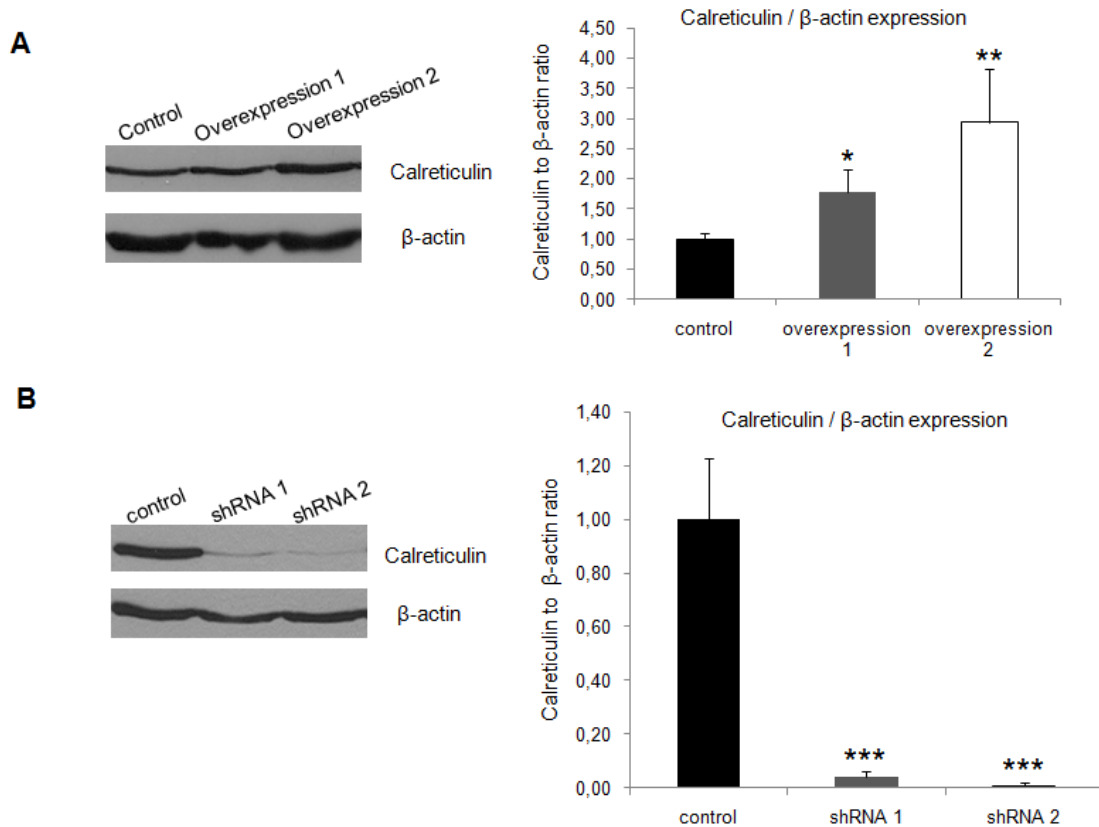
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση. Για τον υπολογισμό της στατιστικής διαφοράς ανάμεσα σε δύο ομάδες δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε αμφίπλευρο (two-tailed) Student's *t* test. Για τη σύγκριση πολλαπλών ομάδων δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA με *post-hoc* ανάλυση. Η τιμή *p* (*p* value) μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Το επίπεδο έκφρασης της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα HK-2 επηρεάζει χαρακτηριστικά όπως η κινητικότητα, το ενδοκυτταρικό στρες, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τον τρόπο με τον οποίο η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού επηρεάζει την εξέλιξη της ίνωσης στο μοντέλο UUO, αναλύσαμε το φαινότυπο κυτταρικών σειρών που είτε υπερεκφράζουν είτε υποεκφράζουν την calreticulin. Για το σκοπό της υπερέκφρασης, χρησιμοποιήσαμε μια καθιερωμένη κυτταρική σειρά που προέρχεται από το ανθρώπινο εγγύς εσπειραμένο επιθήλιο (HK-2) και κατασκευάσαμε κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν σταθερά το cDNA της calreticulin. Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε μια κυτταρική σειρά με χαμηλή και μια με υψηλή υπερέκφραση, καθώς και μια κυτταρική σειρά ελέγχου (control) (Εικόνα 1A). Με σκοπό την υποέκφραση της calreticulin, κατασκευάσαμε κυτταρικές σειρές HK-2 που εκφράζουν σταθερά ένα ειδικό shRNA μόριο για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin και χρησιμοποιήσαμε δύο κυτταρικές σειρές με σημαντική καταστολή στην έκφραση της πρωτεΐνης, καθώς και μία control κυτταρική σειρά (Εικόνα 1B).

Αρχικά, παρατηρήσαμε πως τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin απέκτησαν μια πιο ατρακτοειδή, μεσεγχυματική μορφή και ήταν χαλαρά προσκολλημένα μεταξύ τους, σε σχέση με τα control κύτταρα (Εικόνα 2A). Στη συνέχεια, εξετάσαμε την κινητικότητα των κυττάρων με μία δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound-healing assay). Τα κύτταρα με την υπερέκφραση έδειξαν σημαντικά αυξημένη κινητικότητα σε σχέση με τα control κύτταρα έως και 72 ώρες μετά τη δημιουργία του τραύματος στην κυτταρική επιφάνεια, σε βαθμό ανάλογο προς την έκφραση της calreticulin (Εικόνα 2B). Το φαινόμενο αυτό δεν οφείλεται σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, καθώς είχε προστεθεί στα κύτταρα το αντιβιοτικό mitomycin C που αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU στο DNA έδειξε πως τα κύτταρα με υπερέκφραση πολλαπλασιάζονται με μικρότερο ρυθμό (Εικόνα 2C).

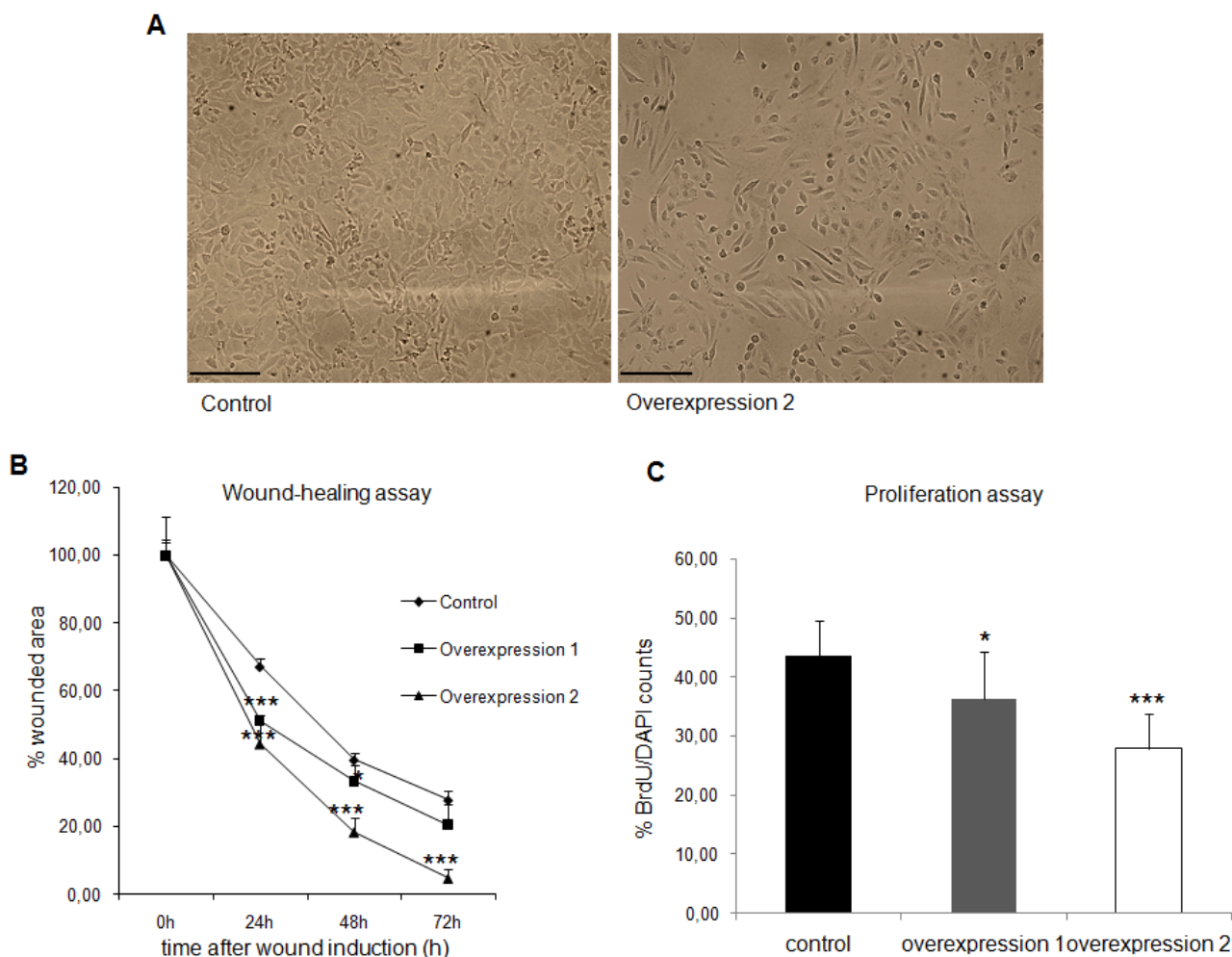


Εικόνα 1. Η υπερέκφραση και υποέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα HK-2. **(A)** Τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin κατασκευάστηκαν με σταθερή διαμόλυνση πλασμιδίου που περιέχει το cDNA για την calreticulin του ποντικού. Χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά control (που διαμολύθηκε με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα), μια κυτταρική σειρά με χαμηλή (Overexpression 1) και μια με υψηλή υπερέκφραση (Overexpression 2). **(B)** Τα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin κατασκευάστηκαν με σταθερή διαμόλυνση πλασμιδίου που περιέχει ένα shRNA μόριο ειδικό για το ανθρώπινο γονίδιο της calreticulin. Χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά control (που διαμολύθηκε με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα) και δύο κυτταρικές σειρές με σημαντική καταστολή της calreticulin. Η έκφραση της calreticulin σε κάθε κυτταρική σειρά αξιολογήθηκε με τη μέθοδο του Western blotting και κανονικοποιήθηκε ως προς την έκφραση της β-actin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ προς το control.

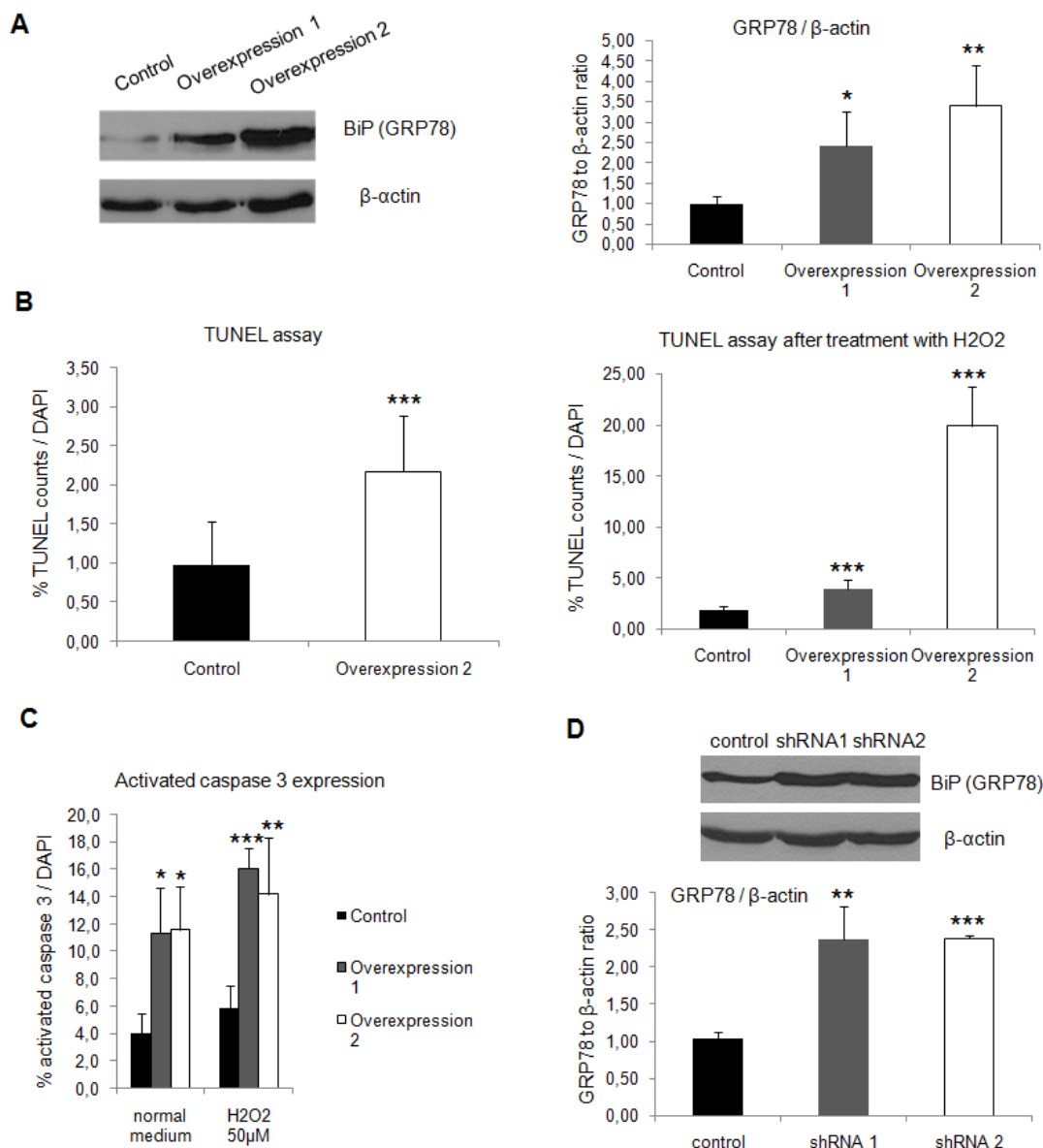
Κατόπιν, μελετήσαμε το ενδοκυτταρικό στρες εξετάζοντας τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GRP78, ενός κύριου αισθητήρα του στρες που προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress) (40). Τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα της GRP78, υποδεικνύοντας πως η υπερέκφραση της calreticulin επάγει κυτταρικούς

μηχανισμούς απόκρισης στο στρες (Εικόνα 3A). Δεδομένου ότι το στρες που προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση και κυτταρικό θάνατο (72), εξετάσαμε τα επίπεδα της απόπτωσης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TUNEL που ανιχνεύει το κατακερματισμένο DNA, ένα βασικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης. Τα κύτταρα με υπερέκφραση της calreticulin παρουσίασαν διπλάσια απόπτωση σε σχέση με τα control κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Επιπλέον, μετά από επώαση των κυττάρων με H₂O₂ η απόπτωση των κυττάρων με υπερέκφραση αυξήθηκε δραματικά, ειδικά για τη σειρά με τη μεγαλύτερη υπερέκφραση (Εικόνα 3B). Ακόμα, η έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3, ενός βασικού μεσολαβητή της αποπτωτικής διαδικασίας, ήταν σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα με την υπερέκφραση, τόσο απουσία όσο και παρουσία H₂O₂ στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων (Εικόνα 3C).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin παρατηρήθηκε επίσης σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GRP78 (Εικόνα 3D), πιθανόν για να αντισταθμίσει τη μεγάλη μείωση των επιπέδων της calreticulin. Ωστόσο, ο ρόλος της GRP78 και της επαγωγής του στρες είναι πιθανό να διαφέρουν μεταξύ των κυττάρων που υποεκφράζουν ή υπερεκφράζουν calreticulin. Αυτό υποστηρίζεται, επιπλέον, από το γεγονός ότι τα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin δεν παρουσίασαν σημαντική αλλαγή στους ρυθμούς πολλαπλασιασμού, βιωσιμότητας ή απόπτωσης, χαρακτηριστικά που μπορούν να επηρεαστούν από το στρες (δεδομένα που δεν παρουσιάστηκαν).



Εικόνα 2. Η υπερέκφραση της calreticulin μεταβάλλει τη μορφολογία, την κινητικότητα και το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων HK-2. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες control κυττάρων και κυττάρων με υπερέκφραση calreticulin που δείχνουν την απώλεια της επιθηλιακής προσκόλλησης και την απόκτηση μιας πιο επιμηκυμένης, μεσεγχυματικής μορφολογίας εξαιτίας της υπερέκφρασης της calreticulin. (B) Δοκιμασία επούλωσης τραύματος στην κυτταρική επιφάνεια, παρουσία μιτομυκίνης C για αναστολή του πολλαπλασιασμού, που δείχνει αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων με υπερέκφραση της calreticulin έως και 72 ώρες μετά τη δημιουργία του τραύματος. Η τραυματισμένη επιφάνεια μετρήθηκε στα χρονικά σημεία 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά τη δημιουργία του τραύματος. (C) Δοκιμασία ενσωμάτωσης BrdU στο DNA, που δείχνει μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων με υπερέκφραση της calreticulin. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν ποσοστό της αναλογίας των μετρήσεων BrdU προς DAPI. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ προς το control. Κλίμακα: 250 μm (A).



Εικόνα 3. Η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα επάγει κυτταρικούς μηχανισμούς στρες και απόπτωσης. (A) Αντιπροσωπευτικό blot που δείχνει αυξημένη έκφραση της GRP78, μιας πρωτεΐνης-αισθητήρα του στρες που προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. (B) Αναλογία των μετρήσεων των θετικών για TUNEL κυττάρων προς το DAPI στα control κύτταρα και τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (αριστερά) ή μετά από επώαση με 50 μ M H₂O₂ για 2 ώρες (δεξιά). (C) Αναλογία των μετρήσεων των θετικών κυττάρων για ενεργοποιημένη κασπάση-3 προς το σύνολο του κυτταρικού πληθυσμού (DAPI) στα control κύτταρα και τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης ή μετά από επώαση με 50 μ M H₂O₂ για 2 ώρες. Τα κύτταρα με την υπερέκφραση παρουσίασαν αυξημένη απόπτωση σε σχέση με τα control κύτταρα τόσο στη δοκιμασία με TUNEL όσο και με ενεργοποιημένη κασπάση-3, δείχνοντας επίσης αυξημένη

ευαισθησία στην επώαση με H₂O₂. (D) Αντιπροσωπευτικό blot που δείχνει αυξημένη έκφραση της GRP78 στα κύτταρα με υποέκφραση της calreticulin. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 προς το control.

5.2 Η υπερέκφραση ή υποέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα μεταβάλλει την έκφραση επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών

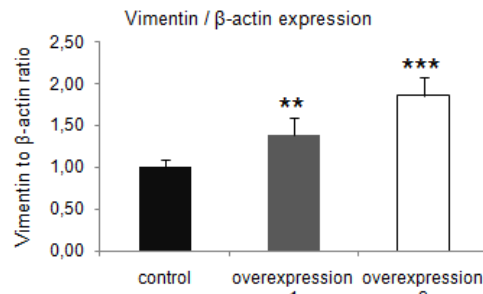
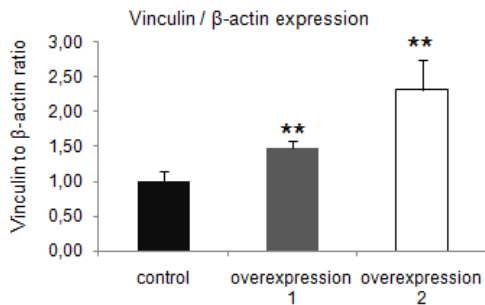
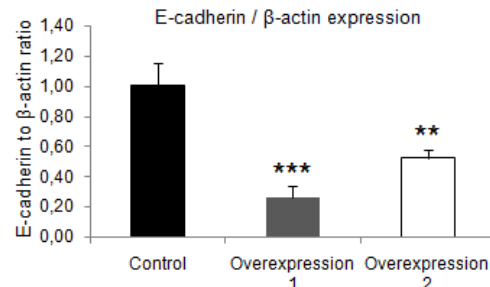
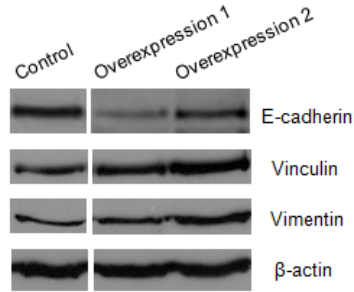
Δεδομένου ότι η εξέλιξη της ίνωσης έχει συσχετισθεί με αλλαγές στον επιθηλιακό φαινότυπο (73, 74), εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών τόσο στα κύτταρα που υπερεκφράζουν όσο και σε αυτά που υποεκφράζουν calreticulin. Η επιθηλιακή πρωτεΐνη των διακυτταρικών συνδέσμων E-cadherin ήταν σημαντικά μειωμένη στα κύτταρα με την υπερέκφραση. Παράλληλα, μεσεγχυματικές πρωτεΐνες όπως η vinculin και η vimentin ήταν αυξημένες (Εικόνα 4A). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η υπερέκφραση της calreticulin προκαλεί μια εξασθένηση του επιθηλιακού φαινοτύπου, ευνοώντας έναν πιο μεσεγχυματικό χαρακτήρα.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε περαιτέρω κάποιους δείκτες στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Τα γονίδια της *E-cadherin* και της *Vimentin* ακολούθησαν το ίδιο πρότυπο έκφρασης με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες (Εικόνα 4B). Οι μεταγραφικοί παράγοντες *Snai1* (snail) και *Snai2* (slug), καταστολείς της E-cadherin και ισχυροί ενεργοποιητές του EMT (5, 75, 76), αυξήθηκαν σημαντικά στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Ωστόσο, η έκφραση του γονιδίου *Acta2* (το γονίδιο που κωδικοποιεί για την α-SMA), του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου δείκτη για τους μυοϊνοβλάστες, ήταν μειωμένη στα κύτταρα με την υπερέκφραση, υποδεικνύοντας πως παρά τις φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin, δεν προωθείται η πλήρης μετάβαση σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT).

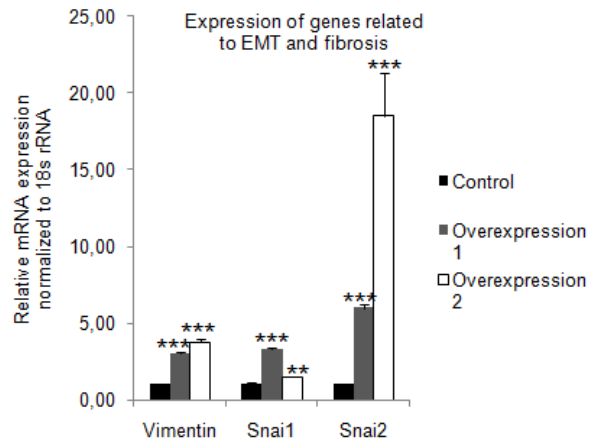
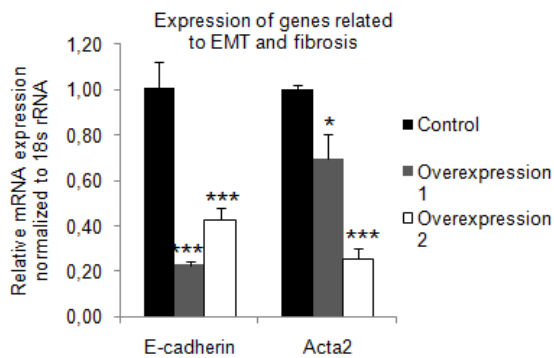
Η υποέκφραση της calreticulin οδήγησε σε σημαντική αύξηση στην έκφραση της E-cadherin τόσο στο επίπεδο της πρωτεΐνης (Εικόνα 4C) όσο και του mRNA (Εικόνα 4D), δείχνοντας τον αντίθετο φαινότυπο από τα κύτταρα με την υπερέκφραση. Άλλοι δείκτες του EMT όπως οι *Snai1* και *Acta2* δεν μεταβλήθηκαν (Εικόνα 4D). Ωστόσο, η επαγωγή και των δύο δεικτών από τον παράγοντα TGF-β1 όσο και η καταστολή της E-cadherin αναστάλθηκαν στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin (Εικόνα 4D). Τα αποτελέσματα αυτά

δείχνουν ότι η υποέκφραση της calreticulin αναστέλλει διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις στον προ-ινωτικό παράγοντα TGF-β1, υποστηρίζοντας έναν προ-ινωτικό ρόλο για την calreticulin.

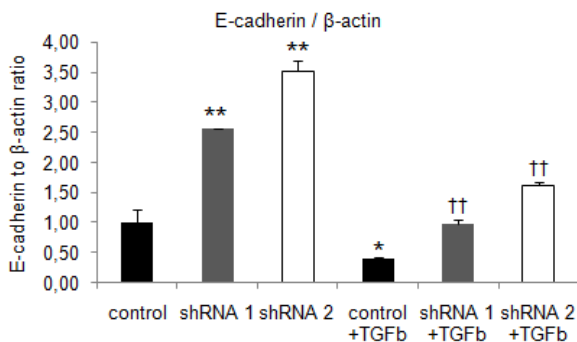
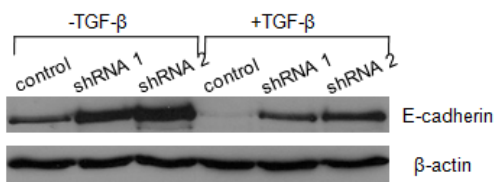
A



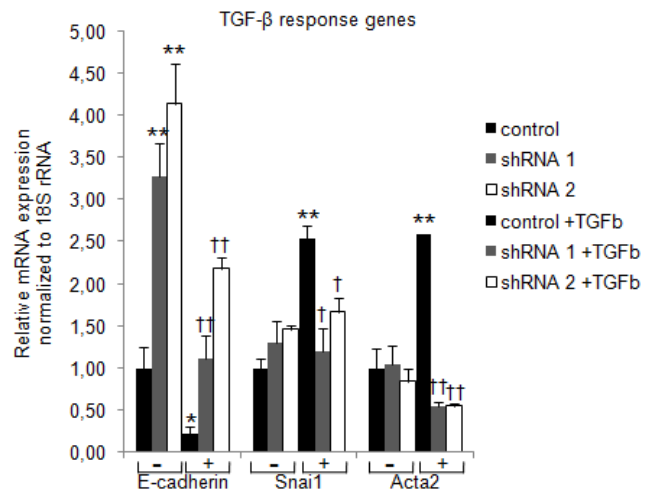
B



C



D

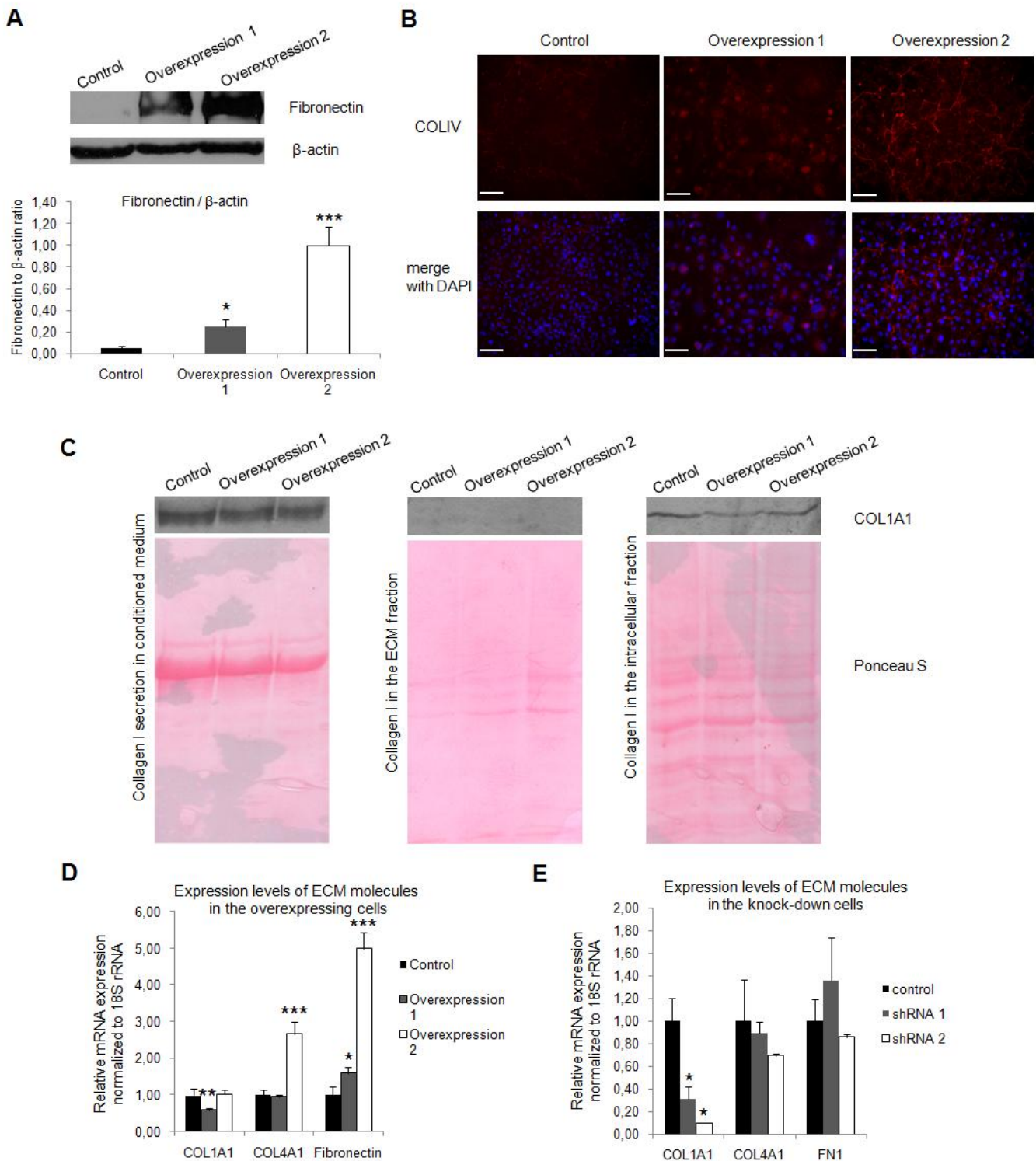


Εικόνα 4. Αλλαγμένη έκφραση επιθηλιακών και μεσεγγυματικών δεικτών προκαλούμενη από την υπερέκφραση ή υποέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα. (A) Αντιπροσωπευτικά blots που δείχνουν σημαντικά μειωμένη έκφραση της E-cadherin και αυξημένη έκφραση της vimentin και της vinculin στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. (B) Σχετική ποσότητα mRNA (καθορισμένη με ποσοτική ανάλυση RT-PCR) διάφορων δεικτών του EMT (*E-cadherin*, *Vimentin*, *Acta2*, *Snai1*, *Snai2*) στα control κύτταρα και τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Αξιοσημείωτα, τα επίπεδα έκφρασης της *Acta2* μειώθηκαν στα κύτταρα με την υπερέκφραση, δείχνοντας πως παρά τη φαινοτυπική τους αλλαγή, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin δεν προωθούνται σε πλήρη μεσεγγυματικό μετασχηματισμό. (C) Αντιπροσωπευτικό blot της έκφρασης της E-cadherin στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin, απουσία ή παρουσία του παράγοντα TGF-β1. Η E-cadherin είναι σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα με την υποέκφραση, και η καταστολή της έκφρασής της από τον TGF-β1 παρεμποδίζεται. (D) Σχετική ποσότητα mRNA γονιδίων απόκρισης στον TGF-β1 στα κύτταρα που υποεκφράζουν την calreticulin. Η υποέκφραση της calreticulin καταστέλλει τη σηματοδότηση του TGF-β1 στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ προς το control, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ προς το control + TGF-β.

5.3 Τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν το εκκριτικό προφίλ των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων

Καθώς η εξέλιξη της ίνωσης βασίζεται στη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας, εξετάσαμε κατά πόσον η υπερέκφραση ή υποέκφραση της calreticulin επηρεάζει την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Βρήκαμε πως η έκφραση της fibronectin ήταν σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, τόσο στο επίπεδο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA (Εικόνα 5A και 5D). Επιπλέον, το κολλαγόνο IV, ένα κύριο συστατικό της βασικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων, ήταν αυξημένο στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin (Εικόνα 5B και 5D). Ωστόσο, το κολλαγόνο I το οποίο παράγεται κυρίως από τους ινοβλάστες, δεν αυξήθηκε στα κύτταρα με την υπερέκφραση, ούτε στο επίπεδο της πρωτεΐνης (στα ξεχωριστά κλάσματα θρεπτικού υλικού, κυτταρικού εκχυλίσματος ή εξωκυττάριου στρώματος) ούτε στο επίπεδο του mRNA (Εικόνα 5C και 5D). Αντίθετα, η υποέκφραση της calreticulin οδήγησε σε δραματική μείωση της έκφρασης του γονιδίου *Coll1a1* χωρίς να επηρεάσει τα μετάγραφα των γονιδίων *Fnl* και *Col4a1* (Εικόνα 5E). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα HK-2 προάγει την επιλεκτική παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, χωρίς την επαγωγή πλήρους μετασχηματισμού σε

μεσεγχυματικό φαινότυπο; ωστόσο, η υποέκφρασή της είναι ικανή να καταστείλει την έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών όπως το γονίδιο *Coll1*.



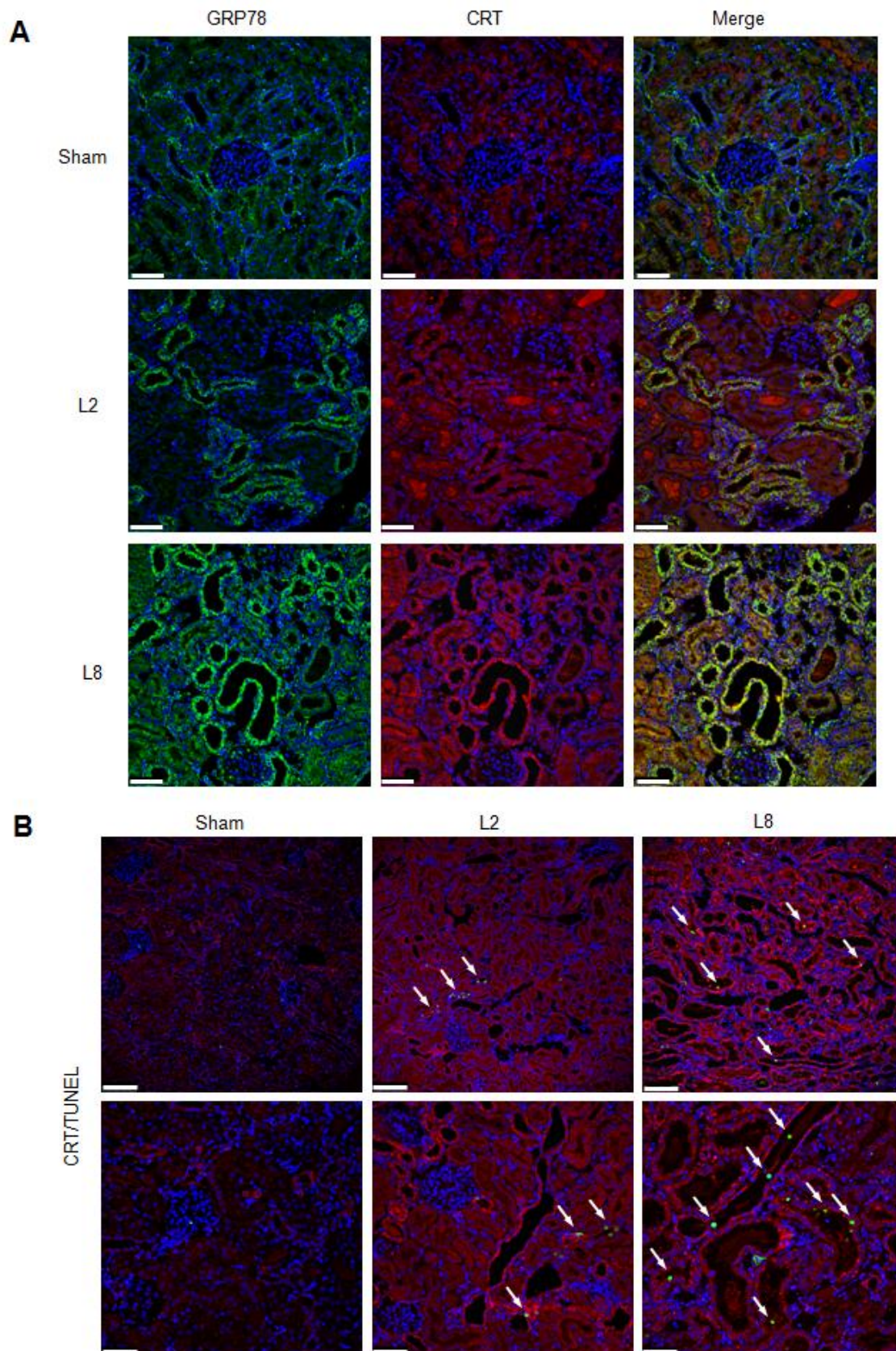
Εικόνα 5. Η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα επάγει την επιλεκτική παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. (A) Αντιπροσωπευτικό blot που δείχνει αυξημένη έκφραση fibronectin στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. (B)

Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού κολλαγόνου IV σε control κύτταρα και κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Η έκφραση του κολλαγόνου IV είναι εμφανώς αυξημένη στα κύτταρα με την υπερέκφραση. (C) Αντιπροσωπευτικά blots που δείχνουν την έκφραση του COL1A1 στο θρεπτικό υλικό (αριστερά), το εξωκυττάριο στρώμα (μέση) και το κυτταρικό εκχύλισμα (δεξιά) από control κύτταρα και κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Η χρώση με Ponceau S χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο φόρτωσης ίσης ποσότητας πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα. Το COL1A1, ένας τύπος κολλαγόνου που παράγεται κυρίως από τους ινοβλάστες, δεν αυξάνεται στα επιθηλιακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. (D) Σχετική ποσότητα mRNA (καθορισμένη με ποσοτική ανάλυση RT-PCR) των *Colla1*, *Col4a1* και *Fibronectin*. Τα επίπεδα των μεταγράφων ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με την πρωτεϊνική έκφραση. (E) Σχετική ποσότητα mRNA (καθορισμένη με ποσοτική ανάλυση RT-PCR) μορίων της εξωκυττάριας ουσίας στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin. Η έκφραση του *Colla1* είναι σημαντικά μειωμένη, ενώ η έκφραση των μεταγράφων *Col4a1* και *Fnl* δεν μεταβάλλεται. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ προς το control. Κλίμακα: 100 μm (B).

5.4 Τα σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin *in vivo* παρουσιάζουν αυξημένο κυτταρικό στρες και απόπτωση

Το κυτταρικό στρες που προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και η απόπτωση θεωρούνται όλο και περισσότερο ως βασικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης (39, 77). Δεδομένου ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα καλλιεργούμενα κύτταρα αύξησε τόσο το ER στρες όσο και την απόπτωση, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε ότι τα σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin *in vivo* στο μοντέλο UUO παρουσιάζουν αντίστοιχα χαρακτηριστικά. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε χρώση διπλού ανοσοφθορισμού σε νεφρικές τομές από control ζώα (sham) και ζώα με ουρητηρική απόφραξη 2 και 8 ημερών (L2 και L8 αντίστοιχα). Όπως φαίνεται στην εικόνα 6A, η πρωτεΐνη GRP78, ένας δείκτης του ER στρες, και η calreticulin εκφράζονται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα στα control ζώα. Ωστόσο, τα επίπεδα και των δύο πρωτεϊνών αυξήθηκαν σταδιακά στις 2 και 8 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη και παρουσίασαν ευρύ συνεντοπισμό στα κύτταρα των σωληναρίων. Συνεντοπισμός παρατηρήθηκε επίσης και κατά τη διπλή χρώση με calreticulin και TUNEL, για τον εντοπισμό αποπτωτικών κυττάρων. Ενώ οι θετικοί για TUNEL πυρήνες είναι ελάχιστοι στα control ζώα, αυξάνονται προοδευτικά μετά από 2 και 8 ημέρες ουρητηρικής

απόφραξης, και εντοπίζονται σε επιθηλιακά κύτταρα σωληναρίων όπου υπερεκφράζεται η calreticulin (Εικόνα 6B).



Εικόνα 6. Αυξημένο κυτταρικό στρες και απόπτωση χαρακτηρίζουν τα σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin *in vivo*. **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες GRP78 (πράσινο) και calreticulin (CRT, κόκκινο) σε control ζώα (sham) και ζώα με ουρητηρική απόφραξη για 2 ή 8 ημέρες (L2 και L8 αντίστοιχα). Τόσο η GRP78 όσο και η CRT εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στα control ζώα, αλλά αυξάνονται σταδιακά και συνεντοπίζονται στα σωληναριακά κύτταρα του ινωτικού νεφρού μετά από 2 και 8 ημέρες ουρητηρικής απόφραξης (φαίνεται με κίτρινο χρώμα), υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin *in vivo* παρουσιάζουν αυξημένο στρες. **(B)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού για calreticulin (κόκκινο) και TUNEL (πράσινο) σε control ζώα (sham) και ζώα με ουρητηρική απόφραξη για 2 ή 8 ημέρες (L2, L8). Οι θετικοί για TUNEL πυρήνες (βέλη), που υποδεικνύουν τα αποπτωτικά κύτταρα, αυξάνονται προοδευτικά από τα control στα ινωτικά ζώα και εντοπίζονται σε σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Κλίμακες: 50 μm (**A** και **B** κάτω σειρά), 100 μm (**B** πάνω σειρά).

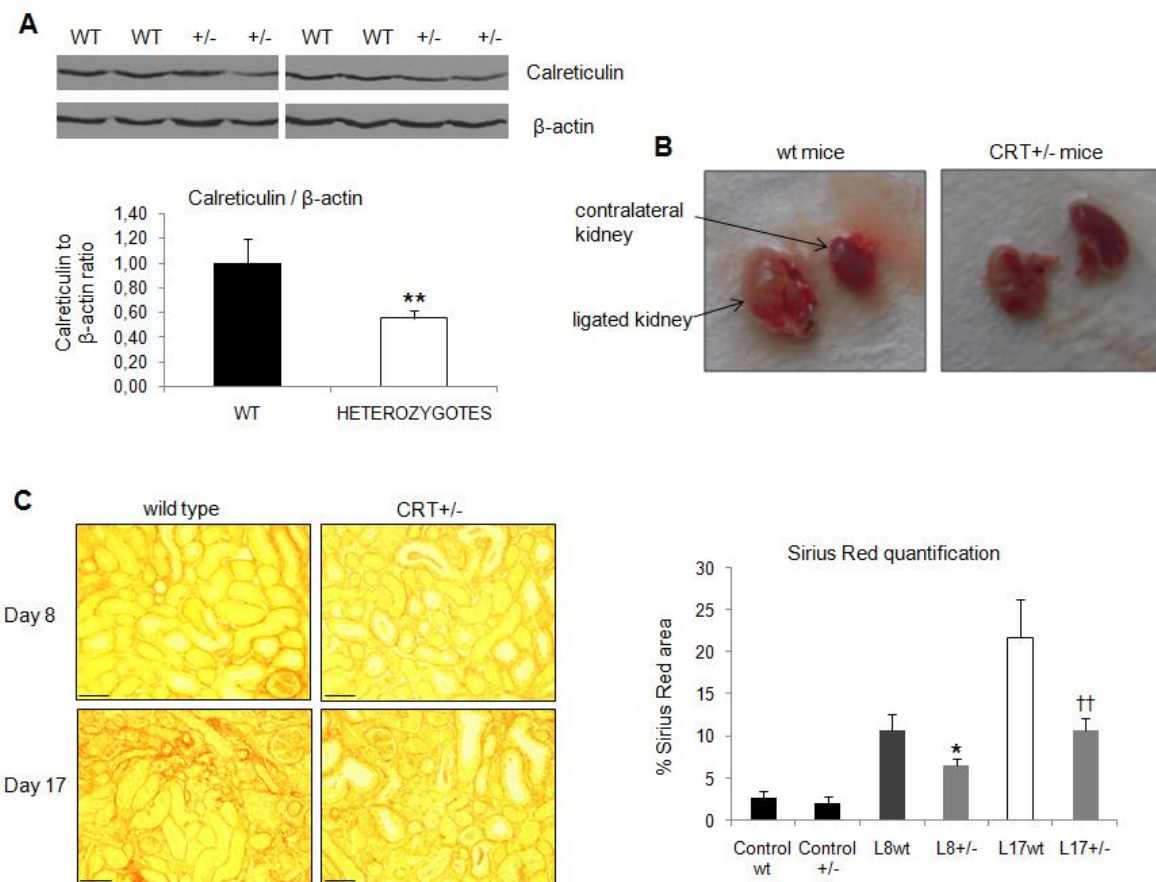
5.5 Ποντίκια ετερόζυγα για την calreticulin παρουσιάζουν βελτιωμένη νεφρική εικόνα και μειωμένη συσσώρευση κολλαγόνου στο μοντέλο UUO

Αφού οι παρατηρήσεις μας έδειξαν ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα επάγει έναν προ-ινωτικό φαινότυπο, χρησιμοποιήσαμε ένα ζωικό μοντέλο με μειωμένη έκφραση calreticulin, ποντίκια ετερόζυγα για την calreticulin (71), με σκοπό να ερευνήσουμε άμεσα το ρόλο της στην πρόοδο της ίνωσης στο μοντέλο UUO.

Αρχικά, επιβεβαιώσαμε ότι τα ετερόζυγα ποντίκια παράγουν περίπου τη μισή ποσότητα calreticulin σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυσιολογικά ποντίκια (Εικόνα 7A). Στη συνέχεια, με σκοπό να μελετήσουμε προχωρημένα στάδια της ίνωσης, θυσίασαμε τα ζώα στις 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη.

Στις 17 ημέρες από την απόφραξη υπήρχε μια εμφανής ανατομική διαφορά μεταξύ των απολινωμένων νεφρών των αγρίου τύπου και των ετερόζυγων ζώων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7B, οι απολινωμένοι νεφροί των αγρίου τύπου ποντικών παρουσιάζουν σημαντική διάταση και αλλαγή χρώματος σε σχέση με τους αντίστοιχους νεφρούς των ετερόζυγων ποντικών. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στις 8 ημέρες από την απόφραξη, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό. Η βελτιωμένη εικόνα των ινωτικών νεφρών στα ετερόζυγα ποντίκια ήταν η πρώτη ένδειξη για τη θετική συσχέτιση της ποσότητας της calreticulin με την πρόοδο της ίνωσης.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω εάν η μείωση της calreticulin επηρεάζει την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας κατά την πρόοδο της ίνωσης, πραγματοποιήσαμε χρώση νεφρικών τομών με Sirius Red. Η ποσοτικοποίηση της έκτασης της χρώσης έδειξε σημαντική μείωση του εξωκυττάριας κολλαγόνου στους νεφρούς των ετερόζυγων ζώων, τόσο στις 8 όσο και στις 17 ημέρες από την απόφραξη (Εικόνα 7C). Είναι αξιοσημείωτο ότι η συσσώρευση του κολλαγόνου μειώθηκε κατά 35% και 50% στις 8 και 17 ημέρες αντίστοιχα, υποδεικνύοντας πως η μείωση της έκφρασης της calreticulin προστατεύει από την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας σε πολύ εξελιγμένα στάδια της ίνωσης.

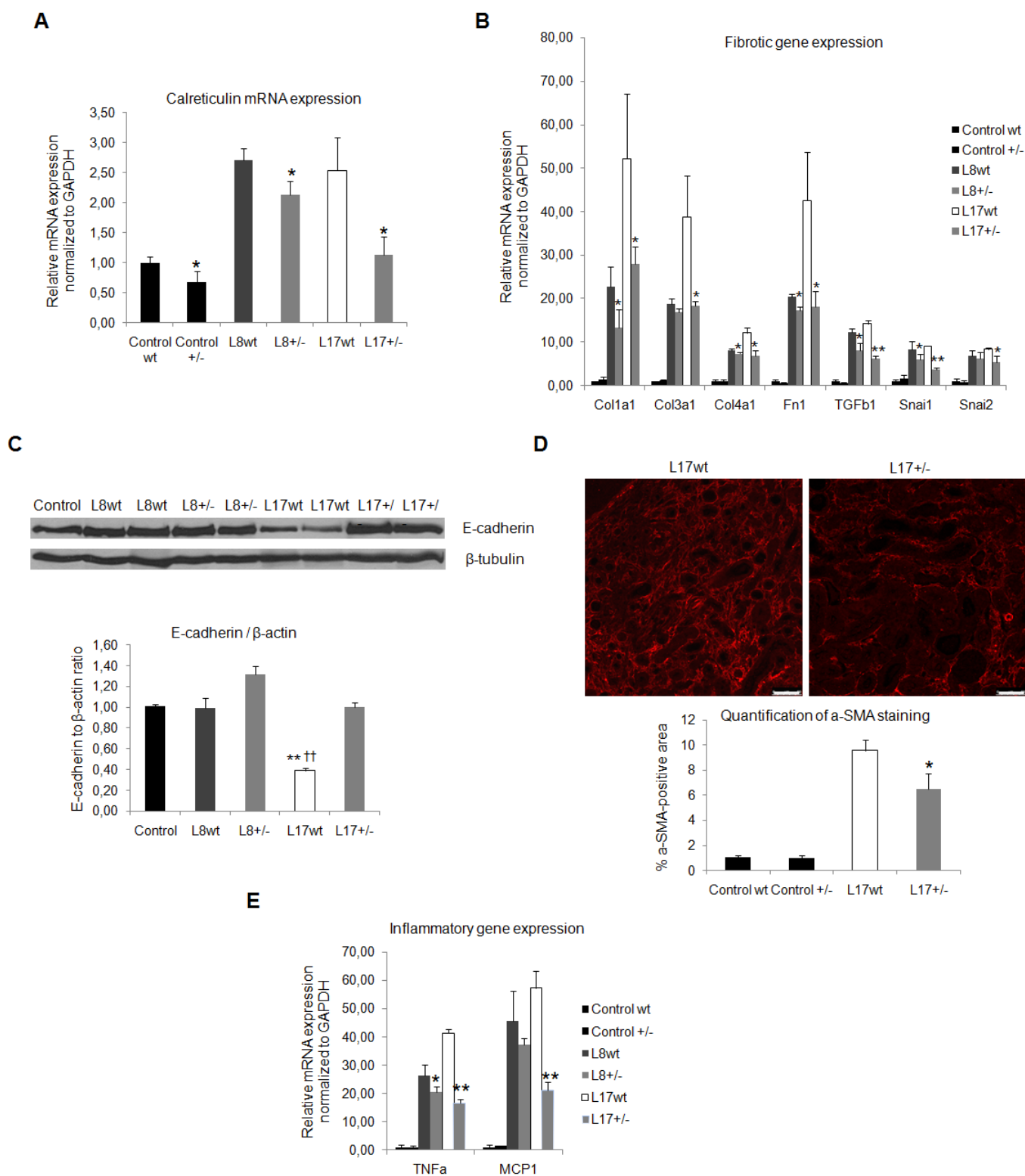


Εικόνα 7. Η μειωμένη έκφραση της calreticulin στα ετερόζυγα ποντίκια βελτιώνει τη σωληναριοδιάμεση ίνωση στο μοντέλο UUO. **(A)** Αντιπροσωπευτικό blot της έκφρασης της calreticulin (CRT) στους νεφρούς των ετερόζυγων (+/-) και των αντίστοιχων αγρίου τύπου ποντικών (wt). Τα ετερόζυγα ποντίκια παράγουν περίπου τη μισή ποσότητα calreticulin σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια. **(B)** Αντιπροσωπευτική εικόνα των απολινωμένων και ετερόπλευρων νεφρών από τα αγρίου τύπου και τα ετερόζυγα ποντίκια, 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Εμφανώς, τα ετερόζυγα ζώα παρουσιάζουν μικρότερη διάταση και καλύτερη διατήρηση του χρώματος των απολινωμένων νεφρών σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα, υποδεικνύοντας μια καθυστέρηση στην πρόοδο της ίνωσης. **(C)** Αντιπροσωπευτικές

εικόνες νεφρικών τομών χρωματισμένων με Sirius Red από αγρίου τύπου και ετερόζυγα ποντίκια, 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Η ποσοτικοποίηση της χρώσης έδειξε σημαντικά μειωμένη εναπόθεση κολλαγόνου στους νεφρούς των ετερόζυγων ποντικών και στα δύο χρονικά σημεία. $n=3$ ανά ομάδα. $**P<0.01$ προς το wt, $*P<0.05$ προς το L8wt, $††P<0.01$ προς το L17wt. Κλίμακα: 50 μm (C).

5.6 Τα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια έχουν αλλαγμένη έκφραση βασικών μορίων που ρυθμίζουν την πρόοδο της ίνωσης

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης γνωστών μορίων που προάγουν τη φλεγμονή και την ίνωση, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin, στα ετερόζυγα και τα αγρίου τύπου ζώα στο μοντέλο UUO. Η ποσοτική RT-PCR ανάλυση έδειξε πως η calreticulin αυξήθηκε με την πρόοδο της ίνωσης, αλλά η έκφρασή της ήταν σημαντικά μειωμένη στα ετερόζυγα ζώα σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Ωστόσο, υψηλότερη μείωση στην έκφραση της calreticulin παρατηρήθηκε στις 17 ημέρες από την απόφραξη, υποδεικνύοντας πως η έκφραση της calreticulin στα ετερόζυγα ποντίκια δεν ήταν αναλογικά μειωμένη σε όλα τα χρονικά σημεία (Εικόνα 8A). Σε συμφωνία με τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin, τα προ-ινωτικά γονίδια που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας *Coll1a1*, *Col3a1*, *Col4a1* και *Fnl* (το γονίδιο για την fibronectin), του προ-ινωτικού παράγοντα *TGF- β 1* και των μεταγραφικών παραγόντων *Snai1* και *Snai2*, είχαν εμφανώς μειωμένη έκφραση στα ετερόζυγα ποντίκια, αλλά σε μικρότερο βαθμό στις 8 ημέρες σε σχέση με τις 17 ημέρες από την απόφραξη (Εικόνα 8B). Επιπλέον, εξετάσαμε την έκφραση της E-cadherin ως δείκτη ακεραιότητας του επιθηλιακού ιστού; έδειξε σημαντική μείωση στα αγρίου τύπου ποντίκια στις 17 ημέρες από την απόφραξη, ενώ παρέμεινε σταθερή στα ετερόζυγα ποντίκια (Εικόνα 8C). Στη συνέχεια, μετρήσαμε την επιφάνεια των θετικών για α -SMA μυοϊνοβλαστών, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών *TNF α* και *MCPI*. Στις 17 ημέρες μετά την απόφραξη η έκφραση τόσο της α -SMA όσο και των προ-φλεγμονωδών γονιδίων ήταν σημαντικά μειωμένη στα ετερόζυγα ζώα, σε συμφωνία με το βαθμό μείωσης της calreticulin (Εικόνες 8D και 8E). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η calreticulin ρυθμίζει θετικά την ενεργοποίηση προ-φλεγμονωδών και προ-ινωτικών μονοπατιών, και η μείωση των επιπέδων της είναι ικανή να καταστείλει αποτελεσματικά την πρόοδο της ίνωσης.

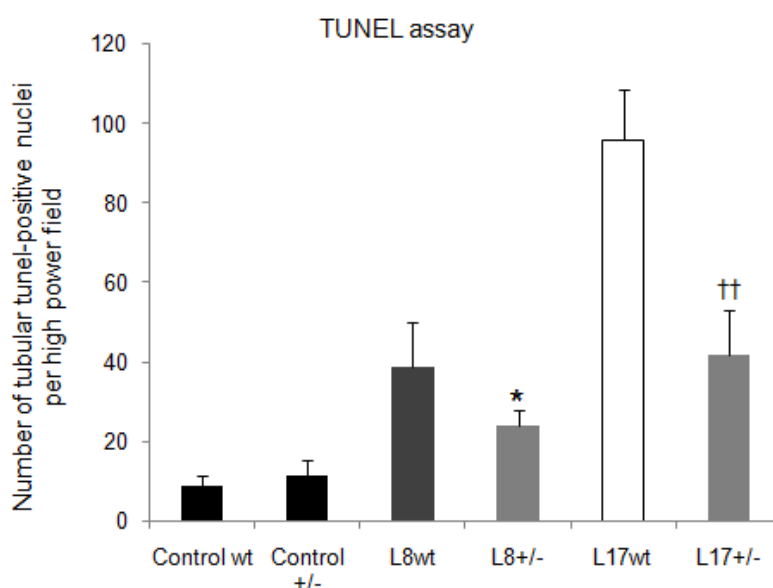


Εικόνα 8. Η μειωμένη έκφραση της calreticulin στα ετερόζυγα ποντίκια αλλάζει το ινωτικό προφίλ της σωληναριοδιάμεσης ίνωσης στο μοντέλο UUO. **(Α)** Σχετική ποσότητα mRNA (καθορισμένη με ποσοτική ανάλυση RT-PCR) του γονιδίου της calreticulin σε control και ινωτικούς νεφρούς 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη, στα ετερόζυγα για την calreticulin και τα αντίστοιχα αγρίου τύπου ποντίκια. Η έκφραση της *calreticulin* είναι

μειωμένη στα ετερόζυγα σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, αλλά ο βαθμός της μείωσης διαφέρει ανάμεσα στους control νεφρούς και τους νεφρούς μετά από 8 ή 17 ημέρες ουρητηρικής απόφραξης. **(B)** Σχετική ποσότητα mRNA βασικών προ-ινωτικών γονιδίων (*Coll1a1*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Fn1*, *TGFb1*, *Snai1* και *Snai2*) στα ετερόζυγα και τα αγρίου τύπου ποντίκια μετά από 8 ή 17 ημέρες ουρητηρικής απόφραξης. Τα μετάγραφα αυτά δείχνουν μια μικρή καταστολή στις 8 ημέρες και μια εμφανώς μεγαλύτερη καταστολή στις 17 ημέρες από την απόφραξη στα ετερόζυγα ποντίκια, η οποία είναι σύμφωνη με το πρότυπο έκφρασης της *calreticulin* στα αντίστοιχα χρονικά σημεία. **(C)** Αντιπροσωπευτικό blot της έκφρασης της E-cadherin στα ετερόζυγα και τα αγρίου τύπου ποντίκια, 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Η E-cadherin είναι σημαντικά μειωμένη στις 17 ημέρες του UUO στα αγρίου τύπου αλλά όχι στα ετερόζυγα ζώα, υποδεικνύοντας καλύτερη διατήρηση της επιθηλιακής δομής στα ετερόζυγα ζώα. **(D)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες νεφρικών τομών χρωματισμένων με α-SMA, από αγρίου τύπου και ετερόζυγα ποντίκια στις 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Η ποσοτικοποίηση της χρώσης σε μη επικαλυπτόμενες εικόνες του συνολικού φλοιού έδειξε σημαντική μείωση της θετικής για α-SMA περιοχής στα ετερόζυγα ποντίκια. **(E)** Σχετική ποσότητα mRNA των προ-φλεγμονωδών γονιδίων *TNFa* και *MCPI* στα ετερόζυγα και τα αγρίου τύπου ποντίκια, 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Οι προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές καταστέλλονται στα ετερόζυγα ποντίκια μετά την ουρητηρική απόφραξη σε βαθμό σύμφωνο με το επίπεδο έκφρασης της *calreticulin*. $n=3$ ανά ομάδα. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ προς τα control wt, L8wt or L17wt **(A, B, D και E)** και ** $P<0.01$ προς το control, †† $P<0.01$ προς το L17+/- **(C)**. Κλίμακα: 50 μm **(D)**.

5.7 Στα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια τα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα προστατεύονται από την απόπτωση κατά την πρόοδο της ίνωσης

Δεδομένου ότι η απόπτωση παίζει βασικό ρόλο στην απώλεια των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων κατά την ανάπτυξη της ίνωσης, εξετάσαμε εάν η μείωση της *calreticulin* επηρεάζει την απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων στο μοντέλο UUO. Η χρώση νεφρικών τομών με τη μέθοδο TUNEL έδειξε πως τα ετερόζυγα ποντίκια έχουν σημαντικά μειωμένη απόπτωση σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, τόσο στις 8 όσο και στις 17 ημέρες μετά την απόφραξη (Εικόνα 9). Επιπλέον, ο βαθμός μείωσης της απόπτωσης των σωληναριακών κυττάρων είναι συγκρίσιμος με τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της *calreticulin* στα ετερόζυγα ζώα μετά την ουρητηρική απόφραξη (Εικόνα 8A).



Εικόνα 9. Τα μειωμένα επίπεδα της calreticulin στα ετερόζυγα ποντίκια προστατεύουν από την απώλεια σωληναριακών κυττάρων κατά τη σωληναριοδιάμεση ίνωση στο μοντέλο UUO. Αριθμός θετικών για TUNEL σωληναριακών κυττάρων ανά πεδίο, στα αγρίου τύπου και τα ετερόζυγα ποντίκια 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Η απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων είναι σημαντικά μειωμένη στα ετερόζυγα ποντίκια και στα δύο χρονικά σημεία. $n=3$ ανά ομάδα. * $P<0.05$ προς το L8wt, †† $P<0.01$ προς το L17wt.

5.8 Τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν την έκφραση μορίων που δρουν ανοδικά ή καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β1

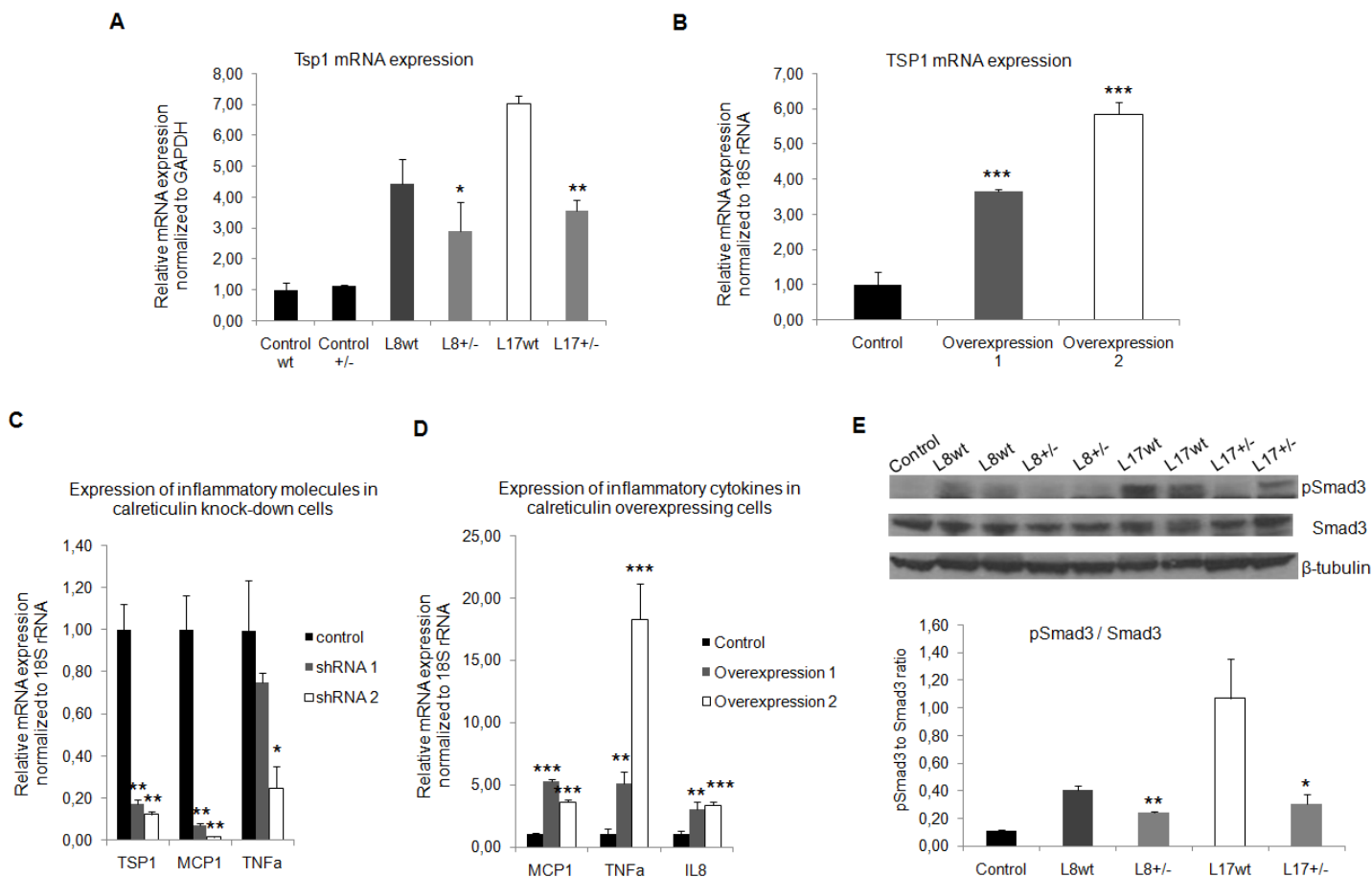
Αφού η μερική έλλειψη της calreticulin στα ετερόζυγα ποντίκια κατέστειλε την έκφραση του *TGF-β1*, ενός βασικού μεσολαβητή προ-ινωτικών διεργασιών, διερευνήσαμε εάν η calreticulin είναι δυνατό να ρυθμίζει την παραγωγή ή την ενεργοποίηση του TGF-β1.

Η thrombospondin 1 (TSP1) είναι μια σύνθετη πρωτεΐνη του εξωκυττάρου στρώματος που ρυθμίζει την ενεργοποίηση του TGF-β1 και έχει δειχθεί πως παίζει ρόλο στην επούλωση των τραυμάτων και την ίνωση (78, 79). Στις μελέτες μας, η *TSP1* αυξήθηκε με την πρόοδο της ίνωσης; ωστόσο η έκφρασή της ήταν σημαντικά μειωμένη στα ετερόζυγα για την calreticulin ζώα σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα και στα δύο χρονικά σημεία που εξετάστηκαν

(Εικόνα 10Α). Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν την έκφραση της *TSP1* στα κύτταρα με την υπερέκφραση ή υποέκφραση της calreticulin. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10B, η υπερέκφραση της calreticulin επάγει μια ανάλογη αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της *TSP1*. Αντίστοιχα, η έλλειψη της calreticulin καταστέλλει την έκφραση της *TSP1* σε σημαντικό βαθμό (Εικόνα 10C). Συλλογικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν άμεσα την έκφραση της *TSP1*, και πιθανόν ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του παράγοντα TGF-β1 μέσω της *TSP1*.

Ακόμα, διερευνήσαμε την επίδραση των επιπέδων της calreticulin στην έκφραση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, δεδομένου ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής του TGF-β1 κατά την ίνωση (16). Οι τρεις κυτοκίνες που εξετάστηκαν (*MCPI*, *TNFα*, *IL8*) βρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin (Εικόνα 10D). Επιπλέον, οι *MCPI* και *TNFα* ήταν σημαντικά μειωμένες στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin (Εικόνα 10C). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την καταστολή των επιπέδων των *MCPI* και *TNFα* στα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια κατά την ανάπτυξη της ίνωσης (Εικόνα 8E), και συσχετίζει την calreticulin με τη ρύθμιση της φλεγμονής και κατά συνέπεια την παραγωγή του TGF-β1.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, η έκφραση της φωσφορυλιωμένης Smad3 πρωτεΐνης, ενός κεντρικού μεσολαβητή της σηματοδότησης μέσω του TGF-β1, ήταν σημαντικά μειωμένη στα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια και στα δύο χρονικά σημεία που εξετάστηκαν, δείχνοντας εμφανώς μια μικρότερη ενεργοποίηση του μονοπατιού του TGF-β1 (Εικόνα 10E).



Εικόνα 10. Τα επίπεδα έκφρασης της calreticulin επηρεάζουν μόρια που βρίσκονται ανοδικά ή καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β1. **(Α)** Σχετική ποσότητα mRNA της thrombospondin 1 (*TSP1*) στους νεφρούς από αγρίου τύπου και ετερόζυγα ποντίκια, 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Τα επίπεδα της *TSP1* αυξάνουν με την πρόοδο της ίνωσης, αλλά παρατηρείται σημαντική καταστολή της έκφρασής της στα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια και στα δύο χρονικά σημεία. $n=3$ ανά ομάδα. * $P<0.05$ προς το L8wt, ** $P<0.01$ προς το L17wt. **(Β)** Σχετική ποσότητα mRNA της *TSP1* στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα επάγει σημαντική αύξηση των επιπέδων της *TSP1*. **(C)** Σχετική ποσότητα mRNA φλεγμονωδών μορίων στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin. Τα επίπεδα των *TSP1*, *MCP1* και *TNFa* μειώνονται σημαντικά λόγω της υποέκφρασης της calreticulin. **(D)** Σχετική ποσότητα mRNA των φλεγμονωδών κυτοκινών *MCP1*, *TNFa* και *IL8* στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Οι τρεις κυτοκίνες αυξάνονται εμφανώς στα κύτταρα με την υπερέκφραση, συσχετίζοντας έτσι την υπερέκφραση της calreticulin με τη μεσολάβηση μιας προ-φλεγμονώδους κατάστασης που μπορεί να διεγείρεται από τα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ προς το control. Οι σχετικές ποσότητες mRNA καθορίστηκαν με ποσοτική ανάλυση RT-PCR. **(E)** Αντιπροσωπευτικό blot της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Smad3 στα αγρίου τύπου και τα ετερόζυγα ποντίκια, 8 και 17 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη. Η pSmad3 είναι σημαντικά μειωμένη στους νεφρούς των ετερόζυγων ζώων και στα δύο χρονικά σημεία μετά την ουρητηρική απόφραξη, υποδεικνύοντας μια σημαντική εξασθένιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β1. * $P<0.05$ προς το L17wt, ** $P<0.01$ προς το L8wt.

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νεφρική ίνωση αποτελεί τον κοινό ανατομικό παρονομαστή που χαρακτηρίζει την εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου ποικίλης αιτιολογίας (80). Μόνο η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών και των μακρομορίων που εμπλέκονται στην πρόοδο της ίνωσης θα επιτρέψουν την ανάπτυξη ειδικών στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Στη μελέτη αυτή, δείξαμε τη συμμετοχή της πρωτεΐνης calreticulin στην ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης *in vitro* και *in vivo*. Οι *in vitro* μελέτες μας με τα νεφρικά επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα έδειξαν πως η υπερέκφραση της calreticulin ήταν αιτιολογικός παράγοντας για την απόκτηση ενός αλλαγμένου, κυρίως προ-ινωτικού κυτταρικού φαινοτύπου. Στη συνέχεια, επιβεβαιώσαμε πως κριτικές αλλαγές που παρατηρήσαμε *in vitro*, όπως το κυτταρικό στρες και η απόπτωση, εμφανίζονταν επίσης *in vivo* στα επιθηλιακά κύτταρα των σωληναρίων, στο μοντέλο UUO. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, υποθέσαμε πως η μείωση των επιπέδων της calreticulin πιθανόν να έχει προστατευτική δράση ενάντια στην ίνωση. Πράγματι, δείξαμε πως η μείωση της έκφρασης της calreticulin σε ετερόζυγα διαγονιδιακά ζώα ανέστειλε εντυπωσιακά την πρόοδο της σωληναριοδιάμεσης ίνωσης.

Με ποιον τρόπο η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα επηρεάζει την πρόοδο της νεφρικής ίνωσης; Η υπερέκφραση της calreticulin στα καλλιεργούμενα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα προκάλεσε τη μείωση διαφοροποιημένων επιθηλιακών δεικτών, όπως η E-cadherin, και την απόκτηση ενός πιο μεσεγχυματικού φαινοτύπου, πιθανότατα μέσω της αύξησης των βασικών ρυθμιστών του EMT *Snai1* και *Snai2* (όπως φαίνεται στην εικόνα 4) (5, 75, 76). Το γεγονός ότι η χαμηλή υπερέκφραση της calreticulin οδήγησε σε μια μεγαλύτερη μείωση της E-cadherin συμφωνεί με την υψηλότερη αύξηση των επιπέδων του *Snai1* και την ισχυρότερη ενεργοποίηση του μονοπατιού της β-catenin στον κλώνο 1 (δεδομένα που δεν παρουσιάστηκαν). Τα αποτελέσματα αυτά πιθανόν υποδεικνύουν ότι λεπτές διαφορές στην έκφραση της calreticulin μπορεί να είναι ικανές να επηρεάζουν δυσανάλογα συγκεκριμένα μονοπάτια σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας. Ωστόσο, στην περίπτωση ενός σύνθετου ιστού όπου εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες ή κύτταρα, οι επιδράσεις αυτές ίσως εξισορροπούνται. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, μια προγενέστερη μελέτη

στην κυτταρική σειρά MDCK εξέτασε το ρόλο της calreticulin στην επαγωγή του EMT (81). Το φαινόμενο του EMT έχει προταθεί παλιότερα πως έχει θεμελιώδη συνεισφορά στην ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης (5, 8). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν αμφισβητήσει αυτή την ιδέα και έχουν καταστήσει το ρόλο του EMT αρκετά αντιφατικό (13, 14). Είναι ενδιαφέρον πως η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα δεν οδήγησε σε επαγωγή ούτε της α -SMA, του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου δείκτη για ενεργοποιημένους ινοβλάστες/μυοϊνοβλάστες, ούτε του *Colla1*, του κύριου τύπου κολλαγόνου που παράγεται από τους ινοβλάστες. Από την άλλη πλευρά, πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών συσχέτισαν αναλογικά την ποσότητα της calreticulin με την έκφραση και εναπόθεση του κολλαγόνου I (70). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα ευρήματά μας, υποδεικνύουν ότι η calreticulin μπορεί να ρυθμίζει ορισμένες κυτταρικές λειτουργίες διαφορετικά, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα αύξησε την παραγωγή άλλων συστατικών την εξωκυττάριας ουσίας, όπως η fibronectin και το κολλαγόνο IV, τα οποία δεν είναι ειδικά για τους ινοβλάστες. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της calreticulin πυροδοτεί την πλαστικότητα των επιθηλιακών κυττάρων, η οποία πιθανόν διευκολύνει τα κύτταρα να προσαρμοστούν στο ινωτικό περιβάλλον, αλλά δεν επαρκεί για την πλήρη μεσεγχυματική διαφοροποίηση, η οποία μπορεί να προωθηθεί *in vitro* από άλλους παράγοντες όπως ο TGF- β 1. Το γεγονός ότι η υποέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα κατέστειλε τόσο την κυτταρική απόκριση στον TGF- β 1 όσο και την έκφραση του *Colla1* δείχνει ότι η calreticulin εμπλέκεται σε ινωτικά μονοπάτια και η μείωσή της είναι ικανή να καταστείλει την έκφραση ινωτικών δεικτών. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η μείωση της calreticulin σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών κατέστειλε την επαγωγή μορίων της εξωκυττάριας ουσίας από τον TGF- β 1 (82).

Αυτή η αλλαγή στον κυτταρικό φαινότυπο συνοδεύτηκε από την απόκτηση ατρακτοειδούς μορφολογίας και την αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων με την υπερέκφραση. Προηγούμενες μελέτες σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο της calreticulin στην κινητικότητα και την κυτταρική προσκόλληση (66-69, 83). Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της calreticulin σε ινοβλάστες αύξησε την αποτελεσματικότητα προσκόλλησης των κυττάρων στη fibronectin και μείωσε την κυτταρική κινητικότητα (66). Από την άλλη πλευρά, η εξωγενής *in vitro* επώαση με

calreticulin αύξησε τον πολλαπλασιασμό και τη μετακίνηση τόσο επιθηλιακών κυττάρων όσο και ινοβλαστών (83). Ο μειωμένος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin στη μελέτη μας μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η ενδογενής calreticulin πιθανόν εκτελεί διαφορετικές λειτουργίες από την calreticulin που προστίθεται εξωγενώς στα κύτταρα. Επιπλέον, είναι πιθανό η επιρροή της calreticulin στην κινητικότητα να διαφέρει ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Η επαγωγή της *Tsp1* στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, η οποία έχει δειχθεί πως προάγει την αποσυναρμολόγηση των εστιακών επαφών με το υπόστρωμα και την κυτταρική μετανάστευση (78, 69), μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων με την υπερέκφραση.

Το στρες που προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και η απόπτωση θεωρούνται όλο και περισσότερο ως βασικοί παράγοντες στην πρόοδο της νεφρικής ίνωσης (39, 77). Η calreticulin, εκτός των άλλων κυτταρικών λειτουργιών της, εξυπηρετεί και σαν πρωτεΐνη απόκρισης στο κυτταρικό στρες, επαγόμενη από διάφορα ερεθίσματα (57, 84). Επιπλέον, άλλες μελέτες σε ποικιλία κυτταρικών σειρών έχουν αποδώσει αντικρουόμενους ρόλους στην calreticulin στη ρύθμιση της απόπτωσης (58-61, 85-87). Για παράδειγμα, ορισμένες μελέτες έχουν συσχετίσει αναλογικά την ποσότητα της calreticulin με την αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση (58-61), ενώ άλλες έχουν συνδέσει θετικά την έκφραση της calreticulin με προστασία από την απόπτωση που επάγεται από διάφορα ερεθίσματα, όπως το οξείδιο του αζώτου, η υποξία και η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} (85-87). Είναι πιθανό η επίδραση της calreticulin στη βιωσιμότητα και την απόπτωση να διαφέρει ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται, το επίπεδο έκφρασης της calreticulin ή το είδος και τη διάρκεια του αποπτωτικού ερεθίσματος. Στη δική μας μελέτη, η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα αύξησε το ενδοκυτταρικό στρες και την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση. Εκτός από τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν για την πρωτεΐνη GRP78, προκαταρκτικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2a, ένα κριτικό σημείο στα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από το στρες (40, 72), είναι αυξημένη στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υποέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα οδήγησε επίσης σε σημαντική αύξηση της έκφρασης της GRP78. Αυτό συνάδει με την αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών στρες συμπεριλαμβανομένης της GRP78, που παρατηρήθηκε σε ινοβλάστες από τους

οποίους λείπει η calreticulin (calreticulin $-/-$ MEFs) (88). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η έλλειψη της calreticulin επάγει μια κυτταρική απόκριση στρες με σκοπό να αντιμετωπίσει τη συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και να διευκολύνει τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Από την άλλη πλευρά, πρωτεΐνες του στρες έχουν δείξει να ρυθμίζουν ινωτικές διαδικασίες (89). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα οδήγησε σε μια απόκριση στρες συνοδευόμενη από ινωτικές αλλαγές και απόπτωση, μεταβολές που δεν παρατηρήθηκαν στα κύτταρα με υποέκφραση της calreticulin, παρά την αυξημένη έκφραση της GRP78. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη αυξημένου στρες και απόπτωσης στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin *in vivo* στο μοντέλο UUO, όπου παρατηρήθηκε υψηλός βαθμός συνεντοπισμού. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν την ιδέα ότι η calreticulin πιθανόν συνεισφέρει στην πρόοδο της νεφρικής ίνωσης μέσω της επαγωγής κυτταρικού στρες και απόπτωσης.

Αφού η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα προκάλεσε φαινοτυπικές αλλαγές που μπορούν να θεωρηθούν κριτικές κατά την εξέλιξη της ίνωσης, θα μπορούσε η μείωση της έκφρασής της να έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη της ίνωσης; Δεδομένου ότι η απάλειψη του γονιδίου της calreticulin προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα (71), η χρήση ετερόζυγων διαγονιδιακών ποντικών με περίπου 50% μειωμένη έκφραση calreticulin ήταν ένα ιδανικό εργαλείο για την άμεση διερεύνηση του ρόλου της calreticulin στην ίνωση. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την επαγωγή της calreticulin κατά την ίνωση στο μοντέλο UUO όπως αναμενόταν, η έκφρασή της στα ετερόζυγα ποντίκια δεν μειώθηκε αναλογικά, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη μείωση στις 17 ημέρες από την απόφραξη. Είναι πιθανό η ανάγκη για υψηλότερη έκφραση της calreticulin να οδήγησε σε αυξημένη επαγωγή από το μοναδικό αλληλόμορφο στα ετερόζυγα ζώα στα αρχικά στάδια της ίνωσης, η οποία δεν μπορούσε να διατηρηθεί μέχρι τα πιο εξελιγμένα στάδια της ασθένειας. Επιπλέον, η μειωμένη έκφραση της calreticulin στα ετερόζυγα ζώα δεν περιορίζεται στα σωληνάκια, όπου η calreticulin υπερεκφράζεται ειδικά στο μοντέλο UUO (53). Για το λόγο αυτό, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η μειωμένη έκφραση της calreticulin σε άλλους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών και των κυττάρων του ανοσοποιητικού, επηρεάζει την πρόοδο της ίνωσης. Η λειτουργία της calreticulin σε αυτούς τους

κυτταρικούς τύπους έχει εξετασθεί εκτεταμένα από άλλες μελέτες και συζητείται.

Σε συμφωνία με την υπόθεσή μας, η μερική έλλειψη της calreticulin βελτίωσε την εικόνα των απολινωμένων νεφρών, όπως φάνηκε από τη μικρότερη διάταση και την καλύτερη διατήρηση του χρώματος σε σχέση με τους αντίστοιχους νεφρούς των αγρίου τύπου ζώων. Αυτή η καθυστέρηση της ινωτικής διαδικασίας επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και ποσοτικοποιήθηκε μέσω της χρώσης με Sirius Red, η οποία έδειξε ότι οι ινωτικοί νεφροί των ετερόζυγων ποντικών είχαν σημαντικά μειωμένη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας και στα δύο χρονικά σημεία που εξετάστηκαν, δηλαδή ξεκινώντας στις 8 ημέρες και προχωρώντας σε μια πιο δραματική μείωση στις 17 ημέρες μετά την απόφραξη. Επιπλέον, η επιφάνεια των θετικών για α -SMA μυοϊνοβλαστών και η έκφραση όλων των μορίων της εξωκυττάριας ουσίας που εξετάστηκαν ήταν μειωμένη στα ετερόζυγα ζώα, σε μεγαλύτερο βαθμό στις 17 ημέρες από την απόφραξη, όντας σε συμφωνία με τη μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα έκφρασης της calreticulin. Εκτός από τη μειωμένη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας, τα ετερόζυγα ποντίκια παρουσίασαν καλύτερη διατήρηση της δομής των σωληναρίων, δεδομένης της διατήρησης της έκφρασης της E-cadherin και της μείωσης της απόπτωσης. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι μεταγραφικοί ρυθμιστές του EMT και της ίωσης, *Snai1* και *Snai2*, μειώθηκαν στα ετερόζυγα ζώα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τα ευρήματά μας στα καλλιεργούμενα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα και υποδηλώνουν πως η calreticulin επηρεάζει προ-ινωτικά μονοπάτια, τουλάχιστον εν μέρει, επάγοντας κύριους μεταγραφικούς ρυθμιστές της ίωσης, όπως οι *Snai1* και *Snai2*.

Ένας κεντρικός μεσολαβητής σε αυτά τα μονοπάτια είναι ο προ-ινωτικός παράγοντας TGF- β 1, η έκφραση του οποίου ήταν μειωμένη στα ετερόζυγα ποντίκια. Ο TGF- β 1 μεσολαβεί πολλαπλές παθολογικές διεργασίες κατά την πρόοδο της χρόνιας νεφρικής νόσου, συμπεριλαμβανομένων της ενεργοποίησης των ινοβλαστών, της παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας, της απόπτωσης, καθώς και φλεγμονωδών διεργασιών, και η διακοπή της σηματοδότησής του έχει δειχθεί πως εμποδίζει την ανάπτυξη της χρόνιας νεφρικής βλάβης (90, 91). Η κύρια πηγή παραγωγής TGF- β 1 κατά την ίωση είναι τα διεισδύοντα φλεγμονώδη κύτταρα (16). Η φλεγμονή ελαττώθηκε εμφανώς στα ετερόζυγα ποντίκια, όπως έδειξε η μείωση των φλεγμονωδών κυτοκινών (*MCPI*, *TNF α*) και τα μικρότερα περι-αγγειακά διηθήματα λεμφοκυττάρων που παρατηρήθηκαν (δεδομένα που δεν παρουσιάστηκαν). Στα καλλιεργούμενα σωληναριακά

κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, διάφορες φλεγμονώδεις κυτοκίνες αυξήθηκαν (*MCPI1*, *TNF α* , *IL8*), υποδηλώνοντας πως η επαγωγή της calreticulin στα επιθηλιακά κύτταρα κατά την ίνωση μπορεί να εμπλέκεται στην καθιέρωση της φλεγμονώδους κατάστασης που χαρακτηρίζει το ινωτικό νεφρό, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή του TGF- β 1. Μια πλειάδα ανοσολογικών λειτουργιών έχει ήδη αποδοθεί στην calreticulin: η έκφραση της calreticulin στην κυτταρική επιφάνεια προάγει τη φαγοκυττάρωση των νεκρών κυττάρων, υποβοηθά την ωρίμανση κυττάρων του ανοσοποιητικού και αυξάνει την εισροή λεμφοκυττάρων στους καρκινικούς όγκους (63-65, 92). Επιπλέον, η calreticulin πιθανόν να ρυθμίζει την ενεργοποίηση του παράγοντα TGF- β 1 επηρεάζοντας άμεσα την έκφραση της *TSP1*, ενός ενδογενούς ενεργοποιητή του TGF- β 1, όπως φάνηκε από την επαγωγή της *TSP1* στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin και την καταστολή της στα κύτταρα με υποέκφραση της calreticulin. Εκτός αυτού, η calreticulin έχει δειχθεί πως αλληλεπιδρά στην κυτταρική επιφάνεια με την *TSP1* και πυροδοτεί γεγονότα που σχετίζονται με την επούλωση τραύματος, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής μετανάστευσης και της εναπόθεσης εξωκυττάριας ουσίας, τα οποία μπορεί επίσης να αποτελούν ένα μηχανισμό με τον οποίο η calreticulin επηρεάζει την ίνωση (69, 78, 92). Η έκφραση της *TSP1* μειώθηκε σημαντικά στα ετερόζυγα για την calreticulin ποντίκια, τόσο σε νεώτερα όσο και σε μετέπειτα χρονικά σημεία, υποστηρίζοντας ότι η ενεργοποίηση του TGF- β 1 ήταν πιθανόν ελαττωμένη. Η μειωμένη ενεργοποίηση του TGF- β 1 αποδείχτηκε με τη σημαντική μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Smad3 στα ετερόζυγα ποντίκια, και στα δύο χρονικά σημεία που εξετάστηκαν. Συνεπώς, προτείνουμε ότι η έλλειψη της calreticulin καθυστερεί την πρόοδο της ίνωσης καταστέλλοντας τόσο την έκφραση όσο και την ενεργοποίηση του TGF- β 1, αλλά και εμποδίζοντας τις κυτταρικές αποκρίσεις στον TGF- β 1, όπως φάνηκε στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα είναι κρίσιμος ρυθμιστής πολλαπλών χαρακτηριστικών της σωληναριοδιάμεσης ίνωσης. Η μείωση των επιπέδων της calreticulin σε ετερόζυγα διαγονιδιακά ποντίκια κατέστειλε αποτελεσματικά την πρόοδο της ίνωσης επηρεάζοντας τις φλεγμονώδεις διεργασίες, την παραγωγή ή/και ενεργοποίηση του παράγοντα TGF- β 1, τη μεταγραφική ρύθμιση διάφορων ινωτικών μεσολαβητών και την απόπτωση. Η ικανότητα της calreticulin να επηρεάζει τόσες πολλές πτυχές της ίνωσης υποδεικνύει πως η μείωση των επιπέδων της calreticulin μπορεί να

αντιπροσωπεύει μία καινούρια, στοχευμένη και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση ενάντια στην ίνωση και τη χρόνια νεφρική νόσο. Οι ινωτικοί μηχανισμοί σε διαφορετικά όργανα μπορεί να χαρακτηρίζονται από κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια ή μονοπάτια που διαφέρουν με ιστο-ειδικό τρόπο. Για παράδειγμα, σε ένα ζωικό μοντέλο πνευμονικής ίνωσης επαγόμενης από μπλεομυκίνη, η calreticulin βρέθηκε επίσης να υπερεκφράζεται κατά την πρόοδο της ίνωσης (53). Επομένως, είναι πιθανό σε όργανα εκτός του νεφρού οι ινωτικές διαδικασίες να μπορούν να στοχευτούν με τη μείωση των επιπέδων της calreticulin.

Μελοντικές κατευθύνσεις

Σκοπεύουμε να συνεχίσουμε τη μελέτη του ρόλου της calreticulin στη νεφρική ίνωση, προς τις ακόλουθες κατευθύνσεις:

1. Κατανόηση του μηχανισμού υπερέκφρασης της calreticulin και των εμπλεκόμενων μεταγραφικών παραγόντων ή microRNAs.
2. Ανίχνευση της calreticulin σε νεφρικές βιοψίες και σε δείγματα ούρων από ασθενείς με ειδικές νεφρικές παθήσεις.
3. Ειδική στόχευση της calreticulin ή/και των παραγόντων που εμπλέκονται στην υπερέκφρασή της με στόχο ειδικές θεραπευτικές παρεμβάσεις σε ινωτικές διαδικασίες.

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Kidney>.
2. Bard J, Vize PD, Woolf AS, The kidney: from normal development to congenital disease. Boston, Academic Press. 2003, p. 154, ISBN 0-12-722441-6.
3. Sime PJ, O'Reilly KM, Fibrosis of the lung and other tissues: New concepts in pathogenesis and treatment. *Clin. Immunol.* 2001, 99: 308–319.
4. Wunn TA, Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* 2007, 117: 524–529.
5. Kalluri R, Neilson EG, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2003, 112: 1776–1784.
6. Zavadil J, Böttinger EP, TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005, 24: 5764-5774.
7. Liu Y, Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15: 1-12.
8. Iwano M, *et al*, Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2002, 110: 341-350.
9. Chai Q, *et al*, Localisation and phenotypical characterisation of collagen-producing cells in TGF- β 1-induced renal interstitial fibrosis. *Histochem. Cell Biol.* 2003, 119: 267-280.

10. Le Hir M, *et al*, Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochem. Cell Biol.* 2005, 123: 335-346.
11. Strutz F, *et al*, Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.* 1995, 130: 393-405.
12. Okada H, *et al*, Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am. J. Physiol.* 1997, 273: F563-F574.
13. Grgic I, *et al*, The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012, 27: 183-193.
14. Lin SL, *et al*, Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* 2008, 173: 1617-1627.
15. Lebleu VS, *et al*, Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 2013, 19: 1047-1053.
16. Grande MT, *et al*, Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm (Lond).* 2010, 22: 7-19.
17. Baugé C, *et al*, NFkappaB mediates IL-1beta-induced down-regulation of TbetaRII through the modulation of Sp3 expression. *J Cell Mol Med.* 2008, 12: 1754-1766.
18. Miyajima A, *et al*, Novel nuclear factor kappa B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. *J Urol.* 2003, 169: 1559-1563.
19. Harris RC, Martinez-Maldonado M, Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrolyte Metab.* 1995, 21: 328-335.
20. Satoh M, *et al*, Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2001, 12: 317-325.

21. Esteban V, *et al*, Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2004, 15: 1514-1529.
22. Yamagishi H, *et al*, Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy. *J Immunol*. 2001, 166: 609-616.
23. Tan X, *et al*, Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2008, 19: 1741-1752.
24. Lange-Sperandio B, *et al*, Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int*. 2002, 61: 516-524.
25. Ophascharoensuk V, *et al*, Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int*. 1999, 56: 571-580.
26. Wahl SM, *et al*, Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987, 84: 5788-5792.
27. Kitamura M, Sütö TS, TGF-beta and glomerulonephritis: anti-inflammatory versus pro-sclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant*. 1997, 12: 669-679.
28. Giannopoulou M, *et al*, Hepatocyte growth factor exerts its anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor-kappaB signaling. *Am J Pathol*. 2008, 173: 30-41.
29. Moustakas A, *et al*, Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunology Letters* 2002, 82: 85-91.
30. Siegel PM, Massague J, Cytostatic and Apoptotic Actions of TGF- β in Homeostasis and Cancer. *Nature Rev. Cancer* 2003, 3: 807-820.

31. Derynck R, Zhang YE, Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 2003, 425: 577-584.
32. Böttinger EP, Bitzer M, TGF- β Signaling in Renal Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13: 2600–2610.
33. Pardali K, *et al*, Role of Smad Proteins and Transcription Factor Sp1 in p21^{Waf1/Cip1} Regulation by Transforming Growth Factor- β . *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 29244-29256.
34. Feng X, *et al*, Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15^{Ink4B} transcription in response to TGF- β . *EMBO J.* 2000, 19: 5178-5193.
35. Adhikary S, Eilers M, Transcriptional Regulation and Transformation by Myc Proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6: 635-645.
36. Seoane J, *et al*, TGF β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15^{INK4b}. *Nature Cell Biol.* 2001, 3: 400-408.
37. Seoane J, *et al*, Myc suppression of the p21^{Cip1} Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 2002, 419: 729-734.
38. Feng X, *et al*, Direct Interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to Inhibit TGF- β -Mediated Induction of the CDK Inhibitor p15^{Ink4B}. *Mol. Cell* 2002, 9: 133-143.
39. Inagi R, Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* 2009, 112: e1-9.
40. Bánhegyi G, *et al*, Endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2007, 1113: 58-71.
41. Klahr S, Morrissey J, Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2003, 41: S3-7.

42. Izbicki G, *et al*, Time-course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 2002, 83: 111-119.
43. Milner DJ, *et al*, Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J. Cell Biol.* 1996, 134: 1255-1270.
44. Mavroidis M, Capetanaki Y, Extensive induction of important mediators of fibrosis and dystrophic calcification in desmin-deficient cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* 2002, 160: 943–952.
45. Bascands J, Schanstra JP, Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* 2005, 68: 925-937.
46. Couser WG, Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2012, 23: 381-399.
47. Luft FC, *et al*, Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension.* 1999, 33: 212-218.
48. Hoorn EJ, *et al*, Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology* 2005, 10: 283–290.
49. Merchant ML, Klein, JB, Proteomics and diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* 2007, 27: 627-636.
50. O’Riordan E, *et al*, Technology insight: Renal proteomics-at the crossroads between promise and problems. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2006, 2: 445-458.
51. Charonis A, *et al*, Is the time ripe for kidney tissue proteomics? *Proteomics Clin Appl.* 2011, 5: 215-221.
52. Klein J, *et al*, Renal fibrosis: insight from proteomics in animal models and human disease. *Proteomics.* 2011, 11: 805-815.

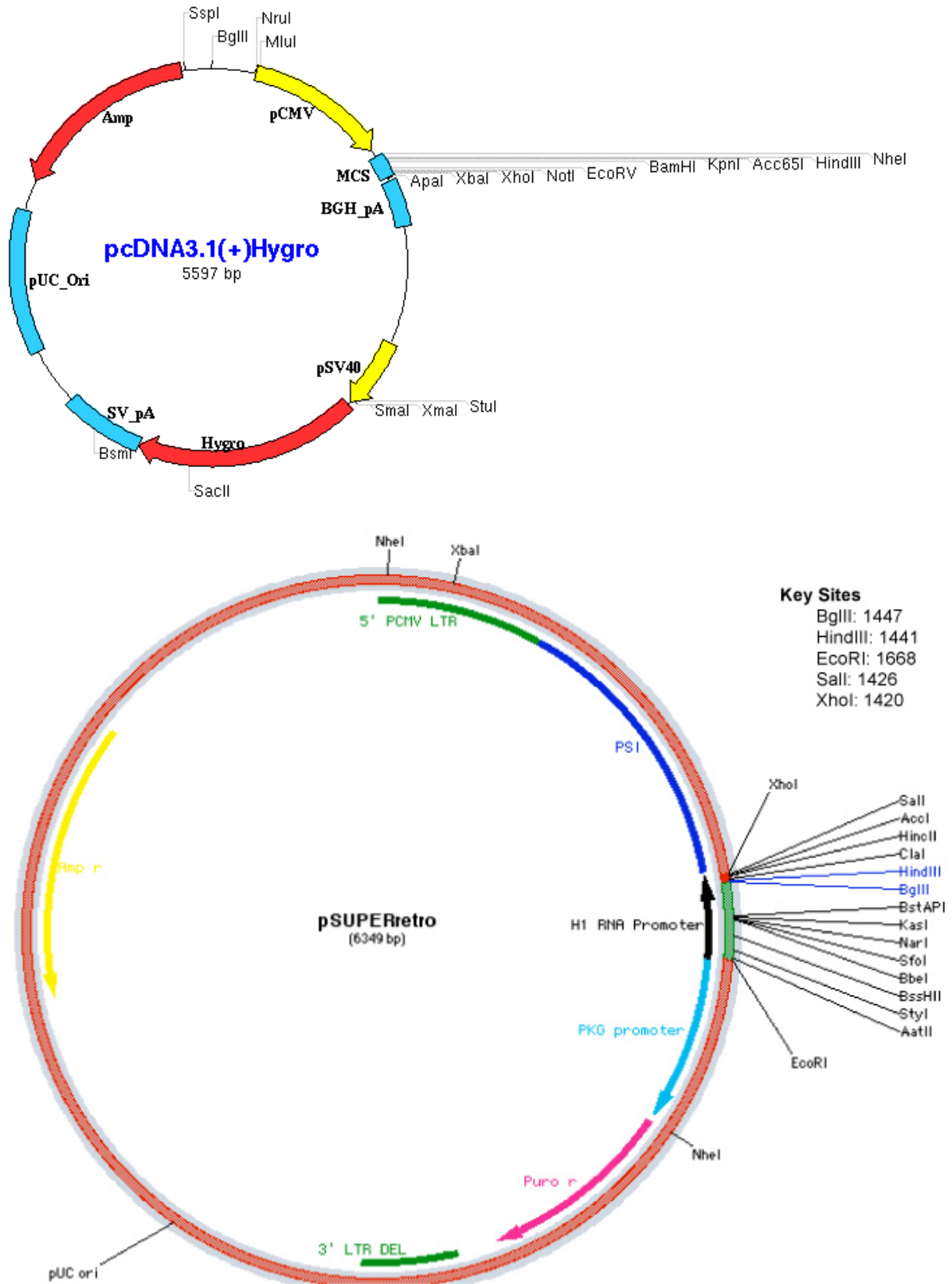
53. Kypreou KP, *et al*, Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 2008, 8: 2407-2419.
54. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P, The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *TRENDS in Cell Biology* 2001, 11: 122-129.
55. Lynch JM, *et al*, Assembling Pieces of the Cardiac Puzzle; Calreticulin and Calcium-Dependent Pathways in Cardiac Development, Health, and Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2006, 16: 65-69.
56. Qiu Y, Michalak M, Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009, 41: 531-538.
57. Waser M, *et al*, Regulation of Calreticulin Gene Expression by Calcium. *J. Cell Biol.* 1997, 138: 547-557.
58. Nakamura K, *et al*, Changes in Endoplasmic Reticulum Luminal Environment Affect Cell Sensitivity to Apoptosis. *J. Cell Biol.* 2000, 150: 731-740.
59. Ihara Y, *et al*, Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006, 290: C208-C221.
60. Mesaeli N, Phillipson C, Impaired p53 Expression, Function and Nuclear Localization in Calreticulin-deficient Cells. *Mol. Biol. Cell* 2004, 15: 1862-1870.
61. Waterhouse NJ, Pinkoski MJ, Calreticulin: Raising awareness of apoptosis. *Apoptosis* 2007, 12: 631-634.
62. Porcellini S, *et al*, Regulation of peripheral T cell activation by calreticulin. *J. Exper. Med.* 2006, 203: 461-471.

63. Raghavan M, *et al*, Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol.* 2013, 34: 13-21.
64. Pawaria S, Binder RJ, CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun.* 2011, 2: 521.
65. Wang HT, *et al*, Calreticulin promotes tumor lymphocyte infiltration and enhances the antitumor effects of immunotherapy by up-regulating the endothelial expression of adhesion molecules. *Int J Cancer.* 2012, 130: 2892-2902.
66. Opas M, *et al*, Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J Cell Biol.* 1996, 135: 1913-1923.
67. Coppolino MG, *et al*, Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 1997, 386: 843-847.
68. Papp S, *et al*, Kinase-dependent adhesion to fibronectin: regulation by calreticulin. *Exp Cell Res.* 2008, 314: 1313-1326.
69. Goicoechea S, *et al*, Thrombospondin Mediates Focal Adhesion Disassembly through Interactions with Cell Surface Calreticulin. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 36358-36368.
70. Van Duyn Graham L, *et al*, Intracellular calreticulin regulates multiple steps in fibrillar collagen expression, trafficking, and processing into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 2010, 285: 7067-7078.
71. Mesaeli N, *et al*, Calreticulin is essential for cardiac development. *J. Cell Biol.* 1999, 144: 857-868.
72. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC, Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 2656-2664.

73. Boor P, Ostendorf T, Floege J, Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat. Rev. Nephrol.* 2010, 6: 643-656.
74. Sivakumar P, Das AM, Fibrosis, chronic inflammation and new pathways for drug discovery. *Inflamm. Res.* 2008, 57: 410-418.
75. Boutet A, *et al*, Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* 2006, 25: 5603-5613.
76. Medici D, Hay ED, Olsen BR, Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol. Biol. Cell* 2008, 19: 4875-4887.
77. Docherty NG, *et al*, Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006, 290: F4-F13.
78. Sweetwyne MT, Murphy-Ullrich JE, Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF- β -dependent and independent mechanisms. *Matrix Biol.* 2012, 31: 178-186.
79. Bige N, *et al*, Thrombospondin-1 plays a profibrotic and pro-inflammatory role during ureteric obstruction. *Kidney Int.* 2012, 81: 1226-1238.
80. Nath KA, Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* 1992, 20: 1-17.
81. Hayashida Y, *et al*, Calreticulin represses E-cadherin gene expression in Madin-Darby canine kidney cells via Slug. *J. Biol. Chem.* 2006, 281: 32469-32484.
82. Zimmerman KA, *et al*, Calreticulin Regulates Transforming Growth Factor- β -stimulated Extracellular Matrix Production. *J. Biol. Chem.* 2013, 288: 14584-14598.

83. Nanney LB, *et al*, Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am. J. Pathol.* 2008, 173: 610-630.
84. Yamazaki T, *et al*, Suppressive effects of FR167653, an inhibitor of p38 mitogen-activated kinase, on calreticulin mRNA expression induced by endoplasmic reticulum stresses. *Eur. J. Pharmacol.* 2004, 484: 147-156.
85. Jia L, *et al*, Novel anti-oxidative role of calreticulin in protecting A549 human type II alveolar epithelial cells against hypoxic injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008, 294: C47-55.
86. Oyadomari S, *et al*, Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98: 10845-10850.
87. Zhu N, Wang Z, Calreticulin expression is associated with androgen regulation of the sensitivity to calcium ionophore-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1999, 59: 1896-1902.
88. Knee R, *et al*, Compromised calnexin function in calreticulin-deficient cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 304: 661-666.
89. Baek HA, *et al*, Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2012, 46: 731-739.
90. López-Hernández FJ, López-Novoa JM, Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res.* 2012, 347: 141-154.
91. Sato M, *et al*, Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* 2003, 112: 1486-1494.
92. Gold LI, *et al*, Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* 2010, 24: 665-683.

8 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



9 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Αποτέλεσμα των μελετών της παρούσας διατριβής είναι 3 εργασίες δημοσιευμένες ή υπό δημοσίευση και 1 εργασία υπό ετοιμασία.

Οι 3 εργασίες δημοσιευμένες ή υπό δημοσίευση είναι οι εξής:

1. Klein J, Kavvadas P, **Prakoura N**, Karagianni F, Schanstra JP, Bascands JL, Charonis A. Renal fibrosis: insight from proteomics in animal models and human disease. *Proteomics*. 2011, 11: 805-815. Review.
2. Karagianni F, **Prakoura N**, Kaltsa G, Politis P, Arvaniti E, Kaltezioti V, Psarras S, Pagakis S, Katsimboulas M, Abed A, Chatziantoniou C, Charonis A. Transgelin Up-Regulation in Obstructive Nephropathy. *PLoS One*. 2013, 8: e66887.
3. **Prakoura N**, Politis PK, Ihara Y, Michalak M, Charonis AS. Epithelial calreticulin up-regulation promotes pro-fibrotic responses and tubulointerstitial fibrosis development. *Am J Pathol*. In press.

Η εργασία υπό προετοιμασία αφορά στην πρωτεωμική μελέτη των νεφρικών σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin, στην ανάδειξη της οικογένειας των πρωτεϊνών 14-3-3 ως σημαντικοί στόχοι που επάγονται όταν υπερεκφράζεται η calreticulin και στην ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών σε βιοψικό υλικών ασθενών με νεφροπάθειες διαφόρων κατηγοριών.