

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

> ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ Α΄ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ ΣΠΥΡΟΣ

Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΥΤΟΤΑΞΙΝΗΣ (ΑΤΧ) ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΣΤΕΜΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

ΚΑΤΣΙΦΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

 $\mathsf{BIOXHMIKO\Sigma}-\mathsf{BIOTEXNO}{\Lambda}\mathsf{OFO}\mathsf{\Sigma},\,\mathsf{MSc}$

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

AOHNA 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

> ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ Α΄ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ ΣΠΥΡΟΣ

Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΥΤΟΤΑΞΙΝΗΣ (ΑΤΧ) ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΣΤΕΜΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

ΚΑΤΣΙΦΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

 $\mathsf{BIOXHMIKO\Sigma}-\mathsf{BIOTEXNOAOFO\Sigma},\,\mathsf{MSc}$

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

AOHNA 2019

Διδακτορική διατριβή της Κατσίφα Αγγελικής στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

<u>Θέμα</u>: Η διερεύνηση του ρόλου της αυτοταξίνης (ΑΤΧ) στην ενήλικη φυσιολογία και τη συστεμική φλεγμονή.

Ημερομηνία αίτησης υποψήφιου διδάκτορα για ορισμό Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 15/02/2012 Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 09/10/2012 Ημερομηνία καθορισμού θέματος της διδακτορικής διατριβής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 22/03/2013

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ορφανός Στυλιανός, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων) Κοτανίδου Αναστασία, Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Αϊδίνης Βασίλειος, Ερευνητής Α΄ ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 23/01/2019

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ορφανός Στυλιανός, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Κοτανίδου Αναστασία, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Δημοπούλου Ιωάννα-Μαρία, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Ρούτση Χριστίνα, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Βασιλειάδης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Ροβίνα Νικολέτα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ Αϊδίνης Βασίλειος, Ερευνητής Α' ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Βαθμός: Άριστα

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Πέτρος Σφηκάκης



ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

«ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ. ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑΝ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ. ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ. ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Ή ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ. ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ, ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ. ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ».

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Κατσίφα Αγγελική

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Ημερομηνία γέννησης: 24/10/1982
- E-mail: <u>agkatsifa@yahoo.com</u>, <u>agkatsifa@minagric.gr</u>

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΣΠΟΥΔΕΣ

- 10/2012- Σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών και
 Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», Ινστιτούτο Ανοσολογίας.
- 2007-2010 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην «Κλινική Βιοχημεία και Ανοσοχημεία – Μικροβιακή Βιοτεχνολογία», Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Βαθμός Άριστα).
- 2000-2005 Πτυχίο Τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Βαθμός 7.49).

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 07/2017- Σήμερα Εργαστήριο Ιολογίας, Τμήμα Μοριακής Διαγνωστικής, Αφθώδους
 Πυρετού, Ιολογικών, Ρικετσιακών κι Εξωτικών Νοσημάτων, Κτηνιατρικό Κέντρο
 Αθηνών, Αγία Παρασκευή, Αθήνα.
- 09/2011-12/2016 Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», Βάρη, Αθήνα.
- 01/2011-04/2011 Τμήμα Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Φαρμακευτική Σχολή, Πανεπιστήμιο Σεβίλλης, Σεβίλλη, Ισπανία (Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα "Leonardo da Vinci").
- 11/2007-12/2010 Εργαστήριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- 1/11/2006-28/02/2007 Μικροβιολογικό-Βιοχημικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Άργους, Άργος.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Papatheodorou DP, Tasioudi KE, Korou LM, Georgiou VL, Markantonatos G, Iliadou P, Kirtzalidou A, <u>Katsifa A</u>, Ztrivas S, Bechtsi G, Tzani M, Chondrokouki E, Mangana-Vougiouka O. 2018, "Efficacy of oral rabies vaccination in individual age groups of juvenile red foxes", Veterinary Microbiology, 2018; 226:59-63.

- Kaffe E, <u>Katsifa A</u>, Xylourgidis N, Ninou I, Zannikou M, Harokopos V, Foka P, Dimitriadis A, Evangelou K, Moulas A, Georgopoulou U, Gorgoulis V, Dalekos G, Aidinis V. 2017, "Hepatocyte ATX expression promotes liver fibrosis and cancer", Hepatology, 2017; 65(4).
- <u>Katsifa A</u>, Kaffe E, Nikolaidou-Katsaridou N, Economides AN, Newbigging S, McKerlie C, Aidinis V. 2015, "The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life", PLoS One, 2015 Nov 16; 10(11).
- Mouratis MA, Magkrioti C, Oikonomou N, <u>Katsifa A</u>, Prestwich GD, Kaffe E, Aidinis V. 2015, "Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury", PLoS One, 2015 Jul 21; 10(7):e0133619.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

 <u>Katsifa A</u>., Parapouli M., Argandona M., Reina-Bueno M., Afendra A.S., Vargas C., Drainas C., Nieto J.J., Koukkou A.I. "Differential osmoregulated expression of genes encoding cyclopropane fatty acid synthase in the moderately halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*" at the 3rd Hellenic Conference of the Hellenic Scientific Society Mikrobiokosmos, Thessaloniki 2010.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Κορού Λ.-Μ., Τασιούδη Κ., Παπαθεοδώρου Δ., Μαρκαντωνάτος Γ., Κιρτζαλίδου Αικ., Πανή Β., Κατσίφα Α., Χονδροκούκη Ε., Δηλέ Χ., Αλεξανδρόπουλος Θ., Τζανή
 Μ. Πρόσφατα επιζωοτιολογικά δεδομένα για τη Λύσσα – Πορεία εφαρμογής προγράμματος εμβολιασμών της άγριας πανίδας στην Ελλάδα την τελευταία διετία.
 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα, 2018.
- <u>Katsifa A</u>., Kaffe E., Nikolaidou-Katsaridou N., Economides A., Newbigging S., McKerlie C., Aidinis V. "The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life" at the 66th Hellenic Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece, 2015.
- Nieto J.J., <u>Katsifa A.</u>, Argandona M., Salvador M., Garcia-Valero R., Koukkou A.I., Vargas C. "Caracterización molecular de dos sintasas de ácidos grasos ciclopropánicos implicadas en la osmoadaptación de la bacteria halófila Chromohalobacter salexigens". Conference: IX Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremofilos (Redex 2013), Busquistar, Granada, Spain, 2013.
- Piubelli F., <u>Katsifa A</u>., Argandona M., Nieto J.J., Salvador M., Garcia-Valero R., Vargas C. Involvement of two putative cyclopropanic fatty acid synthases in the

osmoadaptation of the halophilic bacterium Chromohalobacter salexigens, Conference: 9th International Congress on Extremophiles, Sevilla, Spain, 2012.

- <u>Katsifa A.</u>, Parapouli M., Argandona M., Reina-Bueno M., Afendra A.S., Vargas C., Drainas C., Nieto J.J., Koukkou A.I. "Promoter activity studies of a *cfa* synthase gene in *Chromohalobacter salexigens*" at the 60th Hellenic Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens 2009 and at the 2nd Hellenic Conference of the Hellenic Scientific Society Mikrobiokosmos, Athens, Greece, 2009.
- <u>Katsifa A.</u>, Vardamidis G., Argandona M., Reina-Bueno M., Afendra A.S., Vargas C., Drainas C., Nieto J.J., Koukkou A.I. "Unravelling the osmoregulatory network in the extremophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*: from genome analysis to biochemical function" at the 1st Hellenic Conference of the Hellenic Scientific Society Mikrobiokosmos, Athens, Greece, 2008.

Αφιερώνω την παρούσα διατριβή στη μαμά μου, το σύντροφό μου Βασίλη, την κα Όλγα Μαγγανά Βουγιούκα και την κα Έλενα Δούκα για την πολύτιμη συμπαράστασή τους!

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών Αλέξανδρος Φλέμινγκ στο εργαστήριο του Δρ. Αϊδίνη Βασίλη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα τον κ. Αϊδίνη Βασίλη, Ευρευνητή Α', για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, την άψογη συνεργασία, την επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της πειραματικής πορείας, το γεγονός ότι ήταν πάντα διαθέσιμος και πρόθυμος να με βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαζόμουν, καθώς και για την ανοχή, την κατανόηση και τη συμπαράσταση εκ μέρους του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το διευθυντή της Α΄ κλινικής εντατικής θεραπείας κ. Ζακυνθινό Σπύρο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Ορφανό Στυλιανό, Καθηγητή και την κα Κοτανίδου Αναστασία, Καθηγήτρια και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τη βοήθεια και το χρόνο τους καθ' όλη την παρακολούθηση της συγκεκριμένης διατριβής, καθώς και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Δημοπούλου Ιωάννα-Μαρία, Καθηγήτρια, Ρούτση Χριστίνα, Καθηγήτρια, Βασιλειάδη Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή και Ροβίνα Νικολέτα, Επίκουρη Καθηγήτρια για το χρόνο που διέθεσαν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους με τους οποίους συνυπήρξαμε στο εργαστήριο για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα για την ομαδικότητα και τη συνεργασία, μα ιδιαίτερα τις Σεβαστού Ιωάννα, Μαγκριώτη Χριστιάνα, Ζαννίκου Μαρκέλλα, Νίνου Ιωάννα και κυρίως την Καφφέ Ελεάννα για τη στήριξή τους σε όλα τα επίπεδα. Η σκέψη μου είναι στη μνήμη του φίλου και συναδέλφου Διολέτη Βαγγέλη που έφυγε τόσο νωρίς και άδικα.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αγάπη και την υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Αγγελική

Περιεχόμενα

Περίληψη	16
Περίληψη στα αγγλικά	17
Συντομογραφίες	18
Γενικό μέρος	23
1. Εισαγωγή	24
Α΄ Μέρος. Ο ρόλος της ΑΤΧ στην ενήλικη φυσιολογία	24
1.1. ATX	24
1.1.1. Παραγωγή της ΑΤΧ	24
1.1.2. Βιολογικές δράσεις της ΑΤΧ- Καταλυτικές Ιδιότητες	24
1.1.3. Οικογένεια Ενζύμων ΝΡΡ	25
1.1.4. Δομή-Ισομορφές	26
1.1.5. Σχέση δομής - λειτουργίας της ΑΤΧ	28
1.1.5.1. Ρηχή αυλάκωση και βαθύς υδρόφοβος θύλακας	29
1.1.5.2. Ανοικτή σήραγγα (open tunnel)	30
1.1.5.3. Περιοχές σωματομεδίνης και πρόσδεση στις ιντεγκρίνες	30
1.1.6. Έκφραση της ΑΤΧ	31
1.1.6.1. Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου <i>Εηρρ</i> 2	32
1.1.7. Βιοχημικές ιδιότητες της ΑΤΧ	32
1.1.8. Ρόλος της ΑΤΧ σε φυσιολογικές διαδικασίες	33
1.1.9. Ρόλος της ΑΤΧ σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις	34
1.1.9.1. ΑΤΧ και Καρκίνος	34
1.1.9.2. ΑΤΧ και άλλες ασθένειες	34
1.2. LPΑ: το προϊόν της ΑΤΧ	35
1.2.1. Το LPA σε βιολογικά υγρά	35
1.2.2. Βιολογικές δράσεις του LPA	36
1.2.3. Παραγωγή και βιοδιαθεσιμότητα του LPA	37
1.2.3.1. Βιοσύνθεση του LPA	37
1.2.3.2. Βιοδιαθεσιμότητα του LPA	39
1.2.4. Τρόπος δράσης του LPA	40
1.2.5. Έλεγχος της ρύθμισης του LPA	40
1.2.6. Υποδοχείς του LPA	41
1.2.6.1. Δομή των υποδοχέων του LPA	41
1.2.6.2. Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του LPA	41
1.2.6.3. Ενεργοποίηση των υποδοχέων του LPA	42
1.2.6.4. Έκφραση των υποδοχέων του LPA	43

1.3. Άξονας σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA	44
1.3.1. Άξονας ΑΤΧ/LPA στην αναπαραγωγή και εμβρυική ανάπτυξη	45
1.3.2. Άξονας ΑΤΧ/LPA στην ανοσία	46
1.3.3. Άξονας ΑΤΧ/LPA σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις	47
1.3.3.1. Άξονας ΑΤΧ/LPA - Φλεγμονή λιπώδους ιστού και μεταβολικό σύνδρομο	48
1.3.3.2. Άξονας ΑΤΧ/LPA και νευρολογικές διαταραχές	48
1.3.3.3. Άξονας ΑΤΧ/LPA και αρθρίτιδα	49
1.3.3.4. Άξονας ΑΤΧ/LPA - πνευμονική ίνωση και άσθμα	49
1.3.3.5. Άξονας ΑΤΧ/LPA και ηπατικές ασθένειες	51
1.3.3.6. Το σημείο παραγωγής της ΑΤΧ στη σηματοδότηση της φλεγμονής	52
1.3.3.7. Άξονας ΑΤΧ/LPA στην εμφάνιση κι εξέλιξη του καρκίνου	52
1.3.3.7.1. Μηχανισμοί υπερέκφρασης της ΑΤΧ στον καρκίνο	54
1.3.3.7.2. Σηματοδότηση μέσω LPA στην εξέλιξη του καρκίνου	55
1.3.3.7.3. Ο ρόλος των LPPs στον καρκίνο	56
1.4. ΑΤΧ και υποδοχείς του LPA ως φαρμακευτικοί στόχοι	57
1.4.1. Αναστολείς της ΑΤΧ	57
1.4.2. Αναστολείς της σηματοδότησης του LPA	58
1.4.2.1. Αναστολείς της σηματοδότησης του LPA – Κλινικές δοκιμές	59
Β΄ Μέρος. Ο ρόλος της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή	60
1.5. Σήψη: Εισαγωγή – Επιδημιολογικά στοιχεία	60
1.5.1. Σήψη – Ορισμοί	60
1.5.2. Παθοφυσιολογία της σήψης	63
1.5.2.1. Έμφυτη – επίκτητη ανοσία	64
1.5.2.2. Έναρξη της φλεγμονής	65
1.5.2.3. Μοριακοί μηχανισμοί παθοφυσιολογίας της σήψης	67
1.5.2.4. Αναγνώριση των μικροβιακών συστατικών από τον ξενιστή	68
1.5.2.5. Αναγνώριση των μικροβιακών συστατικών μέσω φλεγμονοσώματος	70
1.5.2.5.1. Φλεγμονόσωμα	70
1.5.2.6. Ενίσχυση μεταγωγής σήματος	72
1.5.2.7. Διαταραχή στους μηχανισμούς πήξης και ινωδόλυσης	74
1.5.2.8. Αντιφλεγμονώδης απόκριση – ανοσοκαταστολή στη σήψη	75
1.5.2.9. Μηχανισμοί οργανικής ανεπάρκειας στη σήψη	77
1.5.2.10. Μηχανισμοί οργανικής βλάβης στη σήψη λόγω φλεγμονοσώματος	79
1.5.2.11. Δίκτυο φλεγμονώδους απόκρισης στη σήψη	80
1.5.2.12. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί στη σήψη	81
1.5.2.13. Διαγνωστική στόχευση	82
1.5.2.14. Θεραπευτική προσέγγιση	82

1.6. Η χρήση πειραματικών μοντέλων ποντικών για τη διερεύνηση της σήψης	84
1.6.1. Πειραματικά μοντέλα για σήψη και σηπτικό σοκ σε ποντίκια	85
1.6.2. Περιορισμοί των πειραματικών μοντέλων σήψης σε ποντίκια	89
1.6.3. Ο ρόλος του LPC στη φλεγμονή	92
1.6.3.1. Ο ρόλος του LPC στη σήψη	93
Ειδικό μέρος	95
2. Σκοπός	96
3. Υλικά και Μέθοδοι	97
3.1. Χημικές ουσίες, αντιδραστήρια, εργαστηριακός εξοπλισμός	97
3.1.1. Χημικές ουσίες – Αντιδραστήρια	97
3.1.2. Πλαστικός - γυάλινος εργαστηριακός εξοπλισμός	97
3.1.3. Όργανα	97
3.2. Πειραματόζωα	98
3.2.1. Συνθήκες διαβίωσης και πειραματικού χειρισμού των ποντικών	98
3.2.2. Συνθήκες αναπαραγωγής των ποντικών	99
3.2.3. Σειρές ποντικών	99
3.2.4. Θανάτωση των ποντικών και λήψη των ιστών	100
3.3. Επεξεργασία των ιστών για (ανοσο)ιστολογική εξέταση	101
3.3.1. Δείγματα για μικροτόμο	101
3.3.2. Δείγματα για κρυοτόμο	101
3.4. Τεχνολογία ανασυνδυασμού Cre/LoxΡ γονιδιακής στόχευσης	101
3.5. Προετοιμασία του Tamoxifen	102
3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	102
3.7. Χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης	103
3.8. Χρώση β-γαλακτοσιδάσης (X-gal)	104
3.9. Απομόνωση DNA από βιοψία ουράς ποντικού	105
3.10. Καθαρισμός διαλύματος DNA με αιθανολική καταβύθιση	105
3.11. Παρασκευή διαλύματος φαινόλης για DNA	106
3.12. Απομόνωση RNA	106
3.12.1. Παρατηρήσεις όσον αφορά το χειρισμό του RNA	106
3.12.2. Απομόνωση RNA από ιστό με χρήση του Tri Reagent	107
3.12.3. Κατεργασία του RNA με DΝάση	108
3.13. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	109
3.14. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	110
3.15. Ηλεκτροφόρηση του DNA	113
3.16. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	
(RQ-PCR)	115

7
9
2
4
6
8
8
9
9
9
9
0
1
3
9
9
2
7
7
0
0
0
1
3
3

φλεγμονή	155
4.Β.2. ΑΤΧ και συστεμική φλεγμονή στον άνθρωπο	157
4.Β.2.1. Μεταβολή των επιπέδων της δραστικότητας της ΑΤΧ στην κυκλοφορία	
σηπτικών ασθενών	157
4.Β.2.2. Λιπιδωμική ανάλυση στην κυκλοφορία σηπτικών ασθενών	157
5. Συζήτηση	160
6. Αναφορές	172
Πρωτότυπες δημοσιεύσεις	204

Περίληψη

Η αυτοταξίνη (ATX, Enpp2) είναι μία εκκρινόμενη λυσοφωσφολιπάση D η οποία βρίσκεται σε διάφορα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του αίματος. Αποτελεί το κύριο ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC), ενός συστατικού των κυτταρικών μεμβρανών, σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA). Το LPA είναι ένα βιοδραστικό φωσφολιπίδιο, το οποίο ομοιάζει με τη λειτουργία των αυξητικών παραγόντων κι επάγει μια πληθώρα κυτταρικών αποκρίσεων σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους. Η μεταγωγή σήματος από το LPA διαμεσολαβείται από τουλάχιστον έξι υποδοχείς του LPA συζευγμένους με G πρωτεΐνες (GPCRs). Οι υποδοχείς του LPA (LPARs) έχουν ευρεία κατανομή, ενώ παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενη εξειδίκευση. Η έκφραση της ΑΤΧ και η παραγωγή του LPA είναι απαραίτητες στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθώς έχει δειχθεί ότι η καθολική γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ στο έμβρυο οδηγεί στο θάνατο του εμβρύου λόγω βλάβης στα αγγεία και στο νευρικό σωλήνα. Στην ενήλικη ζωή η ΑΤΧ παρουσιάζει ευρεία έκφραση σε όλους τους ιστούς, ενώ έχει βρεθεί αυξημένη σε αρκετές χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις αλλά και στον καρκίνο. Σε ζωικά μοντέλα ασθενειών, η υπό όρους στοχευμένη γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ καθυστέρησε την ανάπτυξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της πνευμονικής ίνωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο της ΑΤΧ στην παθογένεια των παραπάνω νόσων. Δεδομένης της εμπλοκής του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, η ΑΤΧ μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός φαρμακευτικός στόχος στη χρόνια φλεγμονή και τον καρκίνο. Για το λόγο αυτό μέχρι στιγμής έχει παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός αναστολέων της ΑΤΧ, ενώ ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου επιτρέπει το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία δείχθηκε ότι η επαγόμενη καθολική γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ στον ενήλικο ποντικό, καθώς και η ισχυρή φαρμακολογική αναστολή της, είναι καλά ανεκτές, χωρίς να επιφέρουν επιπτώσεις στον οργανισμό, αποτελώντας μία ένδειξη ότι η θεραπευτική στόχευση της ΑΤΧ δεν είναι τοξική για το ενήλικο ποντίκι. Συγκεκριμένα, η γενετική εξάλειψη της ΑΤΧ δεν είχε ως αποτέλεσμα κάποια επιβλαβή αλλαγή στους κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος ή στη φυσιολογική λειτουργία του ήπατος, του παγκρέατος ή των νεφρών. Επιπλέον, η παρατεταμένη χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων αναστολέων της ΑΤΧ δεν επέφερε απώλεια βάρους στα ποντίκια, ούτε ιστοπαθολογικές αλλαγές σε 13 κύρια όργανα. Όσον αφορά στην εμπλοκή της ΑΤΧ στην παθογένεση της συστεμικής φλεγμονής, αν και διαφάνηκε ένας επιβλαβής ρόλος της ΑΤΧ στην επαγόμενη από το LPS συστεμική φλεγμονή, δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή ενός βάσιμου συμπεράσματος, δεδομένης της πολυπλοκότητας της σήψης.

Abstract

Autotaxin (ATX, Enpp2) is a secreted lysophospholipase D widely present in biological fluids including blood. ATX is the major enzyme catalysing the production of lysophosphatidic acid (LPA) by hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC), a cell membrane component. LPA is a bioactive, growth factor-like lysophospholipid promoting a large variety of cellular responses in almost all cell types, mediated from at least six Gprotein coupled LPA receptors (LPARs) that exhibit overlapping specificities and widespread distribution. ATX expression and LPA production were shown to be necessary for embryonic development, as ubiquitous genetic deletion of ATX resulted to vascular and neuronal defects leading to lethality. In adult life, ATX is widely expressed and upregulated levels have been reported in various chronic inflammatory diseases and cancer. Conditional genetic deletion of ATX attenuated the development of rheumatoid arthritis, pulmonary fibrosis and hepatocellular carcinoma in mouse models, suggesting a primary role in disease pathogenesis. Taking into account the involvement of ATX/LPA signaling in various pathological conditions, ATX has emerged as a promising therapeutic target in chronic inflammatory diseases and cancer. As a result, a large number of ATX inhibitors have been developed. Moreover, the crystal structure of ATX was solved enabling rational drug design. Here it is reported that inducible, ubiquitous genetic deletion of ATX in adult mice, as well as its potent pharmacologic inhibition, are well tolerated, alleviating potential toxicity concerns of ATX therapeutic targeting. In more details, genetic ATX ablation appeared to have no major effects neither in the hematopoietic system nor in tissue homeostasis exhibiting no deleterious changes indicative of liver, kidney, or pancreatic function. High dosing of ATX inhibitor for a prolonged period resulted in no weight loss of mice or histopathological changes in 13 major organs examined. As it pertains to the involvement of ATX in the pathogenesis of systemic inflammation, despite a detrimental role of ATX in LPS-induced systemic inflammation, current results were relatively inconclusive, rendering a valid conclusion unsafe, reflecting the complexity of sepsis.

Συντομογραφίες

AC adenylyl cyclase, αδενυλική κυκλάση AGPAT 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase, ακυλτρανσφεράση της 3φωσφορικής ακυλγλυκερόλης Akt PKB protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B ALDH1 aldehyde dehydrogenase 1, αλδεϋδική αφυδρογονάση 1 ALI, acute lung injury, χρόνια πνευμονική βλάβη ALR AIM2-like receptor (absent in melanoma 2), υποδοχέας που ομοιάζει στην AIM2 πρωτεΐνη, η οποία αναγνωρίζει και προσδένεται στο δίκλωνο DNA aPC anticoagulant protein C, αντιπηκτική πρωτεΐνη C ASC apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain, πρωτείνη που σχετίζεται με την απόπτωση και περιέχει μία περιοχή CARD ATM serine/threonine protein kinase, κινάση σερίνης/θρεονίνης ATX autotaxin, αυτοταξίνη AUF1 AU-rich element RNA-binding protein 1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (HNRNPD), πρωτεΐνη που προσδένει το RNA BALF bronchoalveolar lavage fluid, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα BAT brown adipose tissue, καφέ λιπώδης ιστός BMP2 bone morphogenetic protein 2, μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 2 BrP-LPA α-bromomethylene phosphonate LPA, ανταγωνιστής της ATX και όλων των υποδοχέων του LPA CAFs cancer-associated fibroblasts, ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο cAMP cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη της κασπάσης CASP colon ascendens stent peritonitis, μοντέλο σήψης με πρόκληση περιτονίτιδας με ενδοαυλιακή πρόθεση CL cecal slurry, μοντέλο σήψης με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση περιεχομένων του τυφλού CLD cronic liver disease, χρόνιες ηπατοπάθειες CLP cecal ligation and puncture, μοντέλο σήψης με απολίνωση και νύξη του τυφλού COX-2 cyclooxygenase-2, κυκλοοξυγενάση 2 cPA cyclic phosphatidic acid (1-acyl-sn-glycerol-2,3-cyclic phosphate), κυκλικό φωσφατιδικό οξύ CRI cancer-related inflammation, φλεγμονή που σχετίζεται με τον καρκίνο DAG diacyl glycerol, διακυλογλυκερόλη

DAMPs danger associated molecular patterns, μοριακά μοτίβα βιομορίων του ξενιστή

DIC disseminated intravascular coagulation, διάσπαρτη ενδοαγγειακή πήξη ECM extracellular matrix, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία EDG endothelial differentiation gene, γονίδιο διαφοροποίησης ενδοθηλίου EGFR epidermal growth factor receptor, υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα ENPP2 ectonuclease pyrophosphatase phosphodiesterase, $\epsilon \xi \omega v o u \kappa \lambda \epsilon \dot{\alpha} \sigma$, πυροφωσφατάση, φωσφοδιεστεράση EPO erythropoietin, ερυθροποιητίνη ESI electrospray ionization, τεχνική ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό FAK focal adhesion kinase, κινάση τυροσίνης που εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση FcR fragment crystallization region receptor, υποδοχέας που προσδένει την Fc περιοχή των αντισωμάτων FGF fibroblast growth factor, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών G-CSF granulocyte colony-stimulating factor, παράγοντας επαγωγής αποικίας κοκκιοκυττάρων GM-CSF granulocyte macrophage colony-stimulating factor, παράγοντας επαγωγής αποικίας κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων GPCR G protein-coupled receptor, υποδοχέας που συζεύγνυται με G πρωτεΐνες HCC hepatocellular carcinoma, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα HEVs: high endothelial venules, μεγάλα ενδοθηλιακά φλεβίδια HIF1 α hypoxia-inducible factor 1 α , παράγοντας υποξίας 1^{α} HMGB1 high-mobility group box 1 HuR (human antigen R), πρωτεΐνη πρόσδεσης στο RNA IFN interferon, IVTEPØEPÓVN IL-1β interleukin-1β, ιντερλευκίνη 1β iNOS inducible nitric oxide synthase, επαγόμενη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου IP₃ inositol triphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη IPF idiopathic pulmonary fibrosis, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση IRAK IL-1 receptor associated kinase, κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα της IL-1 IRF3 interferon regulatory factor-3, ρυθμιστικός παράγοντας 3 της ιντερφερόνης JAK Janus kinase, κινάση JAK LBP LPS-binding protein, πρωτεΐνη που προσδένεται στο LPS LIPH PA-PLA1α, PA-ειδική φωσφολιπάση Α1α LIPI lipase member I PA-PLA₁ β , PA-ειδική φωσφολιπάση A₁ β LPA lysophosphatidic acid (1-acyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate), λυσοφωσφατιδικό LPAAT LPA acyltransferase, ακυλτρανσφεράση του LPA

LPAR LPA Receptor, υποδοχέας του LPA

LPC lysophosphatidylcholine, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη

LPE lysophosphatidylethanolamine, λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

LPS lysophospatidylserine, λυσοφωσφατιδυλοσερίνη

LPS lipopolysaccharide, λιποπολυσακχαρίτης

LPP lipid phosphate phosphatase, φωσφατάση των φωσφολιπιδίων

Lyso-PLD lysophospholipase D, $\lambda u \sigma o \phi \omega \sigma \phi o \lambda i \pi \dot{\alpha} \sigma \eta D$

MAG monoacyl-glycerol, μονοάκυλογλυκερόλη

MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1, πρωτεΐνη χημειοπροσέλκυσης μονοκυττάρων

M-CSF macrophage colony-stimulating factor, παράγοντας επαγωγής αποικίας μακροφάγων

MIF macrophage migration inhibitory factor, παράγοντας αναστολής μετανάστευσης μακροφάγων

MMP matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας

MyD-88 Myeloid differentiation factor 88, Μυελοειδής παράγοντας διαφοροποίησης 88

NAFLD nonalcoholic fatty liver disease, μη-αλκοολική λιπώδης ηπατική νόσος

NASH nonalcoholic steatohepatitis, μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα

NETs neutrophil extracellular traps, εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων

NFAT1 nuclear factor of activated T cells, πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων

NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας

NLR nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor, υποδοχέας που ομοιάζει με την περιοχή NOD

NLRP3 nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domaincontaining-3

Nrf-2 (Erythroid-derived 2)-like-2 nuclear factor 2, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NUC nuclease domain, περιοχή με δράση νουκλεάσης

PAF platelet-activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

PAI-1 plasminogen-activator inhibitor type-1, αναστολέας τύπου 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου

PAMPs pathogen associated molecular patterns, μοριακά μοτίβα συντηρημένα σε παθογόνα

PAR1 protease-activated receptor 1, υποδοχέας που ενεργοποιείται από πρωτεάση PC phosphatidylcholine, φωσφατιδυλοχολίνη

PDE phosphodiesterase domain, $\pi\epsilon pio\chi \eta \mu\epsilon \delta p \alpha \sigma \eta \phi \omega \sigma \phi o \delta \epsilon \sigma \epsilon \rho \alpha \sigma \eta c$ PE phosphatidylethanolamine, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη PI3K Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase ń phosphatidylinositol-3-kinase, κινάση της 3 φωσφατιδικής ινοσιτόλης PKC protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C PKR RNA-dependent protein kinase, RNA-εξαρτώμενη πρωτεΐνική κινάση PL phospholipid, φωσφολιπίδιο PLA phospholipase A, φωσφολιπάση A PLC phospholipase C, φωσφολιπάση C PPs Peyer's patches, λεμφοειδή θυλάκια στο έντερο, κυρίως στη νήστιδα και τον ειλεό PPARy peroxisome proliferator-activated receptor gamma, πυρηνικός υποδοχέας PRR pattern-recognition receptor, υποδοχέας που αναγνωρίζει PAMPs και DAMPs PS phosphatidylserine, φωσφατιδυλοσερίνη RAGE Receptor for advanced glycation end products, υποδοχέας ROCK Rho-associated kinase, κινάση της Rho ROS reactive oxygen species, ενεργές ρίζες οξυγόνου S1P sphingosine 1-phosphate, 1-φωσφορική σφιγγοσίνη SFs synovial fibroblasts, αρθρικοί ινοβλάστες SIRS systemic inflammatory response syndrome, σύνδρομο συστεμικής φλεγμονώδους απόκρισης SNPs single nucleotide polymorphisms, πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου SMB somatomedin B-like domain, περιοχή σωματομεδίνης B SP signal peptide, σηματοδοτικό πεπτίδιο SPC sphingosyl-phosphorylcholine, σφιγγοσυλ-φωσφορυλ-χολίνη SPF specific pathogen-free, εγκαταστάσεις ανατροφής πειραματοζώων απαλλαγμένες από παθογόνους παράγοντες STAT3 signal transducer and activator of transcription 3, μεταγραφικός παράγοντας T3SS Type III secretion system, εκκριτικό σύστημα τύπου III των Gram αρνητικών βακτηρίων TCR T-cell receptor, υποδοχέας στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων TGF-β transforming growth factor β, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TIR Toll/IL-1 receptor homology domain, περιοχή ομόλογη με τον υποδοχέα της IL-1 TIRAP TIR domain-containing adaptor protein, πρωτείνη προσαρμογέας του TIR TLR Toll-like receptor, υποδοχέας που ομοιάζει με την πρωτεΐνη Toll TNF tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων TRAF TNF receptor-associated factor-6, πρωτείνη που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF

TRAM TRIF-related adaptor molecule, μόριο προσαρμογέας που σχετίζεται με τον TRIF TRIF TIR receptor-inducing interferon-beta, μόριο προσαρμογέας που σχετίζεται με τον TIR κι επάγει την IFN-β

VEGF vascular endothelial growth factor, ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας των αγγείων

WAT white adipose tissue, $\lambda \epsilon \nu \kappa \delta \zeta \lambda i \pi \omega \delta \eta \zeta i \sigma \tau \delta \zeta$

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Α΄ Μέρος. Ο ρόλος της ΑΤΧ στην ενήλικη φυσιολογία

1.1. ATX

Η αυτοταξίνη (ATX, Enpp2) είναι ένα τύπου ΙΙ διαμεμβρανικό εξωένζυμο 125 kDa με πολλές δομικές περιοχές.

1.1.1. Παραγωγή της ΑΤΧ

Η ΑΤΧ παράγεται ως ένα προπρο-ένζυμο, το οποίο μετά από Ν-γλυκοσυλίωση και πρωτεολυτική ωρίμανση απελευθερώνεται από το κύτταρο στο εξωκυττάριο περιβάλλον με αποκοπή στο δωδέκατο αμινοξύ από τη διαμεμβρανική περιοχή του ενζύμου, ακολουθώντας την κλασική πορεία έκκρισης. Η ανθρώπινη ΑΤΧ κωδικοποιείται από το γονίδιο *Enpp2* Stracke, et al. ^{1,2-6}.

1.1.2. Βιολογικές δράσεις της ΑΤΧ- Καταλυτικές Ιδιότητες

Η αυτοταξίνη (ATX, Enpp2) είναι ένας αυτοκρινής παράγοντας που επάγει την κινητικότητα, με δράση φωσφοδιεστεράσης και πυροφωσφατάσης ¹. Επίσης, η ATX παρουσιάζει και δραστικότητα λυσοφωσφολιπάσης D, καταλύοντας την υδρόλυση της εξωκυτταρικής λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lysophosphatidylcholine: LPC), σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (lysophosphatidic acid: LPA) (Εικόνα 1.1) ^{7,8}. Διαγονιδιακά ποντίκια ετερόζυγα ως προς το γονίδιο της ATX, στα οποία η ATX έχει απενεργοποιηθεί γενετικά στο ένα αλλήλιο (*Enpp2*^{+/-}), παρουσίασαν τα μισά επίπεδα LPA στην κυκλοφορία ⁹⁻¹¹. Η υδρόλυση αυτή από τη λυσοφωσφολιπάση D παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1986 στο πλάσμα έπειτα από επώαση στους 37°C ¹². Η δραστικότητα λυσοφωσφολιπάσης D αποδόθηκε στην ATX και ταυτοποιήθηκε στην ίδια οικογένεια φωσφοδιεστερασών της ATX το 2002 σε ορό εμβρύου μόσχου και σε ανθρώπινο πλάσμα ^{13 14}.



Εικόνα 1.1: Το εξωκυτταρικό LPA παράγεται από τη LPC με τη δράση της ATX ¹⁵.

Η ΑΤΧ μπορεί να παράγει LPA χρησιμοποιώντας και υποστρώματα που δεν περιέχουν χολίνη, όπως τη λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (LPE) και τη λυσοφωσφατιδυλοσερίνη (LPS) ^{16,17}. Όλες οι γνωστές βιολογικές δράσεις της ATX αποδίδονται στην παραγωγή του LPA και στην επικείμενη ενεργοποίηση των υποδοχέων του.

Η ΑΤΧ δρα τοπικά και όχι συστεμικά, παρόλο που βρίσκεται στην κυκλοφορία διατηρώντας σταθερά τα επίπεδα του LPA. Η ΑΤΧ της κυκλοφορίας έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, μιας και «καθαρίζεται» άμεσα από τα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος, σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών ¹⁸. Πιθανές πηγές της ΑΤΧ του πλάσματος είναι τα λεμφικά μεγάλα ενδοθηλιακά φλεβίδια (HEVs) και ο λιπώδης ιστός, μιας και παράγουν κι εκκρίνουν υψηλά επίπεδα ΑΤΧ ^{19,20}.

Το LPC βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα (της τάξης των μΜ) στα βιολογικά υγρά ²¹ και συγκεκριμένα στο ανθρώπινο πλάσμα (200μΜ) ¹⁴, λειτουργώντας ως το φυσιολογικό υπόστρωμα για την ενδοκρινή και παρακρινή δράση της ATX. Το LPC στην κυκλοφορία είναι κυρίως προσδεδεμένο στην αλβουμίνη και στις λιποπρωτεΐνες ²². Η ATX δρα και αυτοκρινώς στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπου το καρκινικό κύτταρο εκκρίνει LPC και μέσω της ATX προάγεται ο πολλαπλασιασμός και η κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Η δραστικότητα της λυσοφωσφολιπάσης D δείχνει «προτίμηση» για τα λυσοφωσφολιπίδια ¹³. Τα λυσοφωσφολιπίδια είναι τα παράγωγα των φωσφολιπιδίων από τα οποία έχει αποκοπεί η μία ακυλ-ομάδα.

1.1.3. Οικογένεια Ενζύμων ΝΡΡ

Η ΑΤΧ ανήκει στην οικογένεια ενζύμων ENPP (ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase) που απαρτίζεται από επτά μέλη με δομικά παρόμοιες καταλυτικές περιοχές (Εικόνα 1.2). Τα μέλη της οικογένειας NPP καταλύουν την υδρόλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών σε διάφορα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένων των τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων, των φωσφολιπιδίων αλλά και των φωσφορικών εστέρων της χολίνης ²³⁻²⁶. Έχει βρεθεί ότι η ΑΤΧ υδρολύει ATP *in vitro*, αλλά τα νουκλεοτίδια δεν αποτελούν φυσιολογικά υποστρώματα για την ATX ²⁷.



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών της οικογένειας NPP των νουκλεοπυροφωσφατασών/ φωσφοδιεστερασών. Και τα επτά μέλη της οικογένειας διαθέτουν καταλυτική περιοχή. Οι NPP4-7 είναι πρωτεΐνες τύπου Ι μικρότερες σε μέγεθος, ενώ οι NPP1-3 είναι μεγαλύτερες και διαθέτουν περιοχές σωματομεδίνης τύπου Β (SMB) στο αμινοτελικό άκρο και περιοχή τύπου νουκλεάσης στο καρβοξυτελικό άκρο ²⁷.

1.1.4. Δομή-Ισομορφές

Η ΑΤΧ (ENPP2) παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα στη δομή με τις πρωτεΐνες ENPP1 και ENPP3 (Εικόνα 1.2). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3, οι πέντε ισομορφές της ΑΤΧ και η ENPP1 έχουν στο αμινοτελικό τους άκρο δύο περιοχές σωματομεδίνης τύπου B (SMB: somatomedin B) πλούσιες σε κυστεΐνη, μία κεντρική καταλυτική περιοχή με ιδιότητα φωσφοδιεστεράσης (PDE: phosphodiesterase) και μία περιοχή με ιδιότητα νουκλεάσης (NUC) στο καρβοξυτελικό τους άκρο, η οποία είναι καταλυτικά αδρανής. Η περιοχή NUC λειτουργεί σαν θέση πρόσδεσης δισθενών κατιόντων (Mg⁺², Mn⁺²), τα οποία φαίνεται ότι ρυθμίζουν την καταλυτική δράση του ενζύμου ²⁴. Επιπλέον, οι δισουλφιδικοί δεσμοί ΑΤΧ είναι απαραίτητοι για τη σωστή αναδίπλωση κι έκκριση της ΑΤΧ από το κύτταρο ²⁸.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3, στο αμινοτελικό άκρο υπάρχει μια υδρόφοβη αλληλουχία 19 αμινοξέων, η οποία θεωρείται ότι λειτουργεί σαν σηματοδοτικό πεπτίδιο (SP), μιας και η ΑΤΧ παράγεται στο κύτταρο αλλά εκκρίνεται από αυτό ²⁷. Η πρωτεολυτική ωρίμανση (αποκοπή) του SP και η γλυκοσυλίωση στα κατάλοιπα ασπαραγίνης σε 3 θέσεις (N53, N410, N524) είναι απαραίτητες διαδικασίες για την έκκριση και τη βέλτιστη ενζυμική δραστικότητα της ΑΤΧ ^{29,30}. Στην καταλυτική περιοχή της ΑΤΧ, το συντηρημένο κατάλοιπο θρεονίνης στην αμινοξική θέση 210 είναι απαραίτητο για την καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου ³¹.



Εικόνα 1.3: Α. Απεικόνιση των δομικών περιοχών των τεσσάρων κύριων ισομορφών της ΑΤΧ (α, β, γ, δ) και της ENPP1. SP: σηματοδοτικό πεπτίδιο, TM: διαμεμβρανική περιοχή, σκούρο μπλε: πολυβασική αλληλουχία αμινοξέων, πορτοκαλί: «θηλειά» ή περιοχή συνδέτη L2 (lasso loop) ¹⁶. B. Οι κύριες δομικές διαφορές των ισομορφών της ΑΤΧ είναι αποτέλεσμα μίας αποκοπής 4 αμινοξέων (VEPK) στο εξόνιο 19 και του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων 12 και 21 ³².

Οι 5 διαφορετικές ισομορφές της ATX (α έως ε) (Εικόνα 1.3) είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος των μεταγράφων της και είναι όλες καταλυτικά δραστικές. Οι ισομορφές α, β και γ διαφέρουν με βάση την παρουσία ή απουσία αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 12 και 21 ³¹. Η ATXβ (ATX-t), η οποία είχε αρχικά κλωνοποιηθεί από μία κυτταρική σειρά τερατοκαρκινώματος, είναι η κανονική ισομορφή, που είναι η επικρατέστερη, 863 αμινοξέων, στην οποία έχει αποδοθεί η δραστικότητα της λυσοφωσφολιπάσης D (Lyso-PLD) και είναι η υπεύθυνη για τη διατήρηση των επιπέδων LPA στην κυκλοφορία ³³. Η ATXδ είναι σχεδόν ίδια με την ATXβ, με μόνη διαφορά ότι από την ATXδ απουσιάζουν 12 ζ.β. στο 3' άκρο του εξονίου 19, που κωδικοποιούν 4 αμινοξέα στη «θηλειά» ή περιοχή συνδέτη L2 (lasso loop- Εικόνα 1.3 : πορτοκαλί χρώμα), η οποία συνδέει τις περιοχές PDE και NUC ³⁴.

Η ΑΤΧα (ΑΤΧ-m), η μεγαλύτερη ισομορφή, 915 αμινοξέων, είναι εκείνη που απομονώθηκε αρχικά από κύτταρα μελανώματος το 1992 ³⁵ και έχει μικρή έκφραση. Η πολυβασική αλληλουχία 52 αμινοξέων στην ΑΤΧα (και στην ΑΤΧε) (Εικόνα 1.3, μπλε χρώμα) που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 12, περιέχει μια ακολουθία με θέσεις κοπήςαναγνώρισης από τη φουρίνη ³⁶. Επιπλέον, η ΑΤΧα προσδένεται πολύ ισχυρά στην αρνητικά φορτισμένη ηπαρίνη (k_{d~}10⁻⁸M). Η ηπαρίνη είναι ένα μόριο που ομοιάζει δομικά με τη θειική ηπαρίνη (HS), η οποία απαντάται στις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης (HSPG) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη ή στην εξωκυττάρια ουσία. Μιας και μόνο η ΑΤΧα προσδένεται στις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης, είναι πιθανό η πολυβασική αλληλουχία των 52 αμινοξέων να λειτουργεί έτσι, ώστε να «φέρνει κοντά» την ΑΤΧ και άρα, η παραγωγή του LPA να γίνεται δίπλα στους υποδοχείς του LPA στην κυτταρική μεμβράνη ³⁶. Η ΑΤΧγ (PD-Ia) βρίσκεται κυρίως στον εγκέφαλο, εκφράζεται στα ολιγοδενδροκύτταρα και φέρει προσθήκη μίας αλληλουχίας 25 αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 21 ³⁷⁻³⁹.

Παρόλες τις δομικές τους ομοιότητες, οι τρεις ΕΝΡΡ πρωτεΐνες διαφέρουν φυσιολογικά και καταλυτικά. Η ΑΤΧ δρα ως λυσοφωσφολιπάση D, η ΕΝΡΡ1 ως μεμβρανική πυροφωσφατάση νουκλεοτιδίων¹, ενώ η ΕΝΡΡ3 υδρολύει νουκλεοτιδικά σάκχαρα, δηλαδή την ενεργοποιημένη μορφή των μονοσακχαριτών. Η αποκοπή των 6 αμινοξέων στην καταλυτική περιοχή της ΕΝΡΡ1 (Εικόνα 1.3), ενδεχομένως οδηγεί στην πρόσδεση των νουκλεοτιδίων, ενώ η έλλειψη των 18 αμινοξέων από την ΑΤΧ στην καταλυτική της περιοχή PDE, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του θύλακα (pocket) και της ανοικτής σήραγγας (open tunnel), όπου προσδένονται τα λιπίδια (Εικόνα 1.5). Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και η ΑΤΧ μπορεί να υδρολύει νουκλεοτίδια *in vitro*, εντούτοις δείχνει «προτίμηση» για την LPC ως υπόστρωμα, πρώτον γιατί παρουσιάζει περίπου δεκαπλάσια ικανότητα πρόσδεσης για την LPC από ότι για τα νουκλεοτίδια και, δεύτερον, διότι η εξωκυττάρια συγκέντρωση νουκλεοτιδίων είναι φυσιολογικά πολύ χαμηλή ¹⁶.

Η ανθρώπινη Lyso-PLD του πλάσματος είναι η διαλυτή μορφή της ATX-t ή PD-la αλλά όχι της ATX-m. Η δραστικότητα της Lyso-PLD ενισχύεται με τα ιόντα Co⁺² και αναστέλλεται από το ATP. Η lyso-PLD υδρολύει LPC με ακυλ-, αλκυλ- και αλκενυλ-ομάδες, ενώ δε δρα στην *sn*-γλυκερο-3-φωσφορική χολίνη, υποδεικνύοντας ότι απαραίτητη για τη δράση της είναι η υδρόφοβη αλληλεπίδραση των αμινοξέων στο ενεργό της κέντρο με τα τμήματα των λιπαρών οξέων των υποστρωμάτων LPC. Το MB της διαλυτής ATX-m ήταν 125 kDa και η διαφορά της από την ATX-t είναι ότι αποκόπτεται σε διαφορετικό σημείο πριν την έκκρισή της ⁴⁰.

1.1.5. Σχέση δομής - λειτουργίας της ΑΤΧ

Η μελέτη της δομής της ΑΤΧ αποκάλυψε το πώς οι διαφορετικές της περιοχές οργανώνονται κι αλληλεπιδρούν, καθιστώντας την μία μοναδική λυσοφωσφολιπάση D.

¹ Οι πυροφωσφατάσες νουκλεοτιδίων ή νουκλεοτιδάσες είναι φωσφατάσες που αποφωσφορυλιώνουν τα νουκλεοτίδια σε νουκλεοσίδια και ορθοφωσφορικά.

Όπως φαίνεται στην κρυσταλλική δομή της ΑΤΧβ (Εικόνα 1.4), η κεντρική καταλυτική περιοχή PDE αλληλεπιδρά με τις 2 περιοχές SMB από τη μία πλευρά και με την περιοχή NUC από την άλλη. Η αλληλεπίδραση αυτή ενισχύεται με Ν-συνδεδεμένη γλυκάνη ανάμεσα στις 2 περιοχές και με μια διατμηματική δισουλφιδική γέφυρα, ενώ η «θηλειά» (lasso loop) τυλίγεται γύρω από την περιοχή NUC. Όλες αυτές οι διαμορφώσεις βοηθούν στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του καταλυτικού κέντρου της ATX ^{41,42}.



Εικόνα 1.4: Α. Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της ΑΤΧβ, Β. Έμφαση στο βαθύ υδρόφοβο θύλακα όπου προσδένονται τα λιπίδια, τη ρηχή υδρόφιλη αυλάκωση, την ανοικτή σήραγγα και το ενεργό κέντρο της καταλυτικής PDE περιοχής της ATX. Μπλε: υδρόφιλη, πορτοκαλί: υδρόφοβη περιοχή ¹⁶.

1.1.5.1. Ρηχή αυλάκωση και βαθύς υδρόφοβος θύλακας

Ο προσδιορισμός της δομής της ΑΤΧ και της ΕΝΡΡ ^{43,44} έδειξε ότι οι καταλυτικές περιοχές της ΑΤΧ, της ΕΝΡΡ1 και της *Xa*NPP (NPP από το βακτήριο *Xanthomonas axonopodis*) είναι σχεδόν πανομοιότυπες, εμφανίζοντας τη νουκλεόφιλη θρεονίνη (Thr) πολύ κοντά σε δύο ιόντα ψευδαργύρου (Zn), μαζί με τα διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης (His) και ασπαραγινικού οξέος (Asp). Στην καταλυτική περιοχή των 3 παραπάνω αμινοξέων σχηματίζεται μία ρηχή αυλάκωση (groove), η οποία διευκολύνει την εγγύτητα των διαφορετικών υποστρωμάτων και συγκεκριμένα, την πρόσδεση τόσο των νουκλεοτιδίων, όσο και του τμήματος της γλυκερόλης των λυσοφωσφολιπιδίων ⁴². Το χαρακτηριστικό όμως που καθιστά μοναδική την ΑΤΧ έναντι των υπόλοιπων ΕΝΡΡs είναι ο βαθύς (15 Å) υδρόφοβος θύλακας (pocket), με όγκο περίπου 800 Å, ο οποίος βρίσκεται κάτω από τη ρηχή αυλάκωση ακριβώς μέσα στον υδρόφοβο πυρήνα της καταλυτικής της περιοχής. Ο θύλακας είναι αποτέλεσμα ενός πολύ σημαντικού εξελικτικού γεγονότος που συνέβη μόνο στην ΑΤΧ, της εξάλειψης των 18 αμινοξέων στην PDE περιοχή της ⁴².

Ο βαθύς υδρόφοβος θύλακας της ΑΤΧ μπορεί να δεχθεί τα λυσοφωσφολιπίδια, παρουσιάζοντας μια σχετική πλαστικότητα στη δομή του. Από την άλλη μεριά, οι ακυλαλυσίδες των φωσφολιπιδίων μπορεί να αλλάξουν τη διαμόρφωσή τους, προκειμένου να προσδεθούν καλύτερα στο θύλακα της καταλυτικής περιοχής της ΑΤΧ. Η διαφορά της ΑΤΧ από τις υπόλοιπες φωσφολιπάσες, οι οποίες δρουν ενδοεπιφανειακά (π.χ. PLA2), έγκειται στο ότι το ενεργό κέντρο και ο πολύ βαθύς θύλακας της ATX είναι πάντοτε προσβάσιμα σε διαλύτες και λιπιδιακά υποστρώματα. Αυτό επιτρέπει στην ελεύθερη LPC την πρόσδεση στο θύλακα της ATX και, με έναν μηχανισμό που ονομάζεται «αποσταθεροποίηση του υποστρώματος», όπου η χολίνη της LPC έρχεται πολύ κοντά με τα ιόντα ψευδαργύρου, μειώνεται η ενέργεια ενεργοποίησης και η ATX προχωρά την καταλυτική της δράση. Αντιθέτως, το ενεργό κέντρο των υπολοίπων φωσφολιπασών είναι «κλειστό», από κάποιο αυτο-ανασταλτικό μηχανισμό του ίδιου του ενζύμου και «ανοίγει» μόνο όταν το ένζυμο αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας στο λιπιδιακό υπόστρωμα να προσδεθεί ^{41,42,45,46}.

1.1.5.2. Ανοικτή σήραγγα (open tunnel)

Ένα άλλο μοναδικό χαρακτηριστικό της καταλυτικής περιοχής της ΑΤΧ είναι η ανοικτή «σήραγγα» (open tunnel), η οποία σχηματίζει μια Τ-σύνδεση με τη ρηχή αυλάκωση (Εικόνα 1.5). Τα τοιχώματα της ανοικτής «σήραγγας» σχηματίζονται από τη μία πλευρά από την καταλυτική PDE περιοχή και από την άλλη από την περιοχή SMB1. Το ένα τοίχωμα είναι υδρόφοβο, ενώ το άλλο υδρόφιλο. Έχει προταθεί ότι η ανοικτή «σήραγγα» λειτουργεί ως κανάλι εξόδου για το νεοσχηματιζόμενο LPA κι επειδή είναι σχετικά μεγάλη η απόσταση που πρέπει να διανύσει το LPA από τον υδρόφοβο θύλακα έως την ανοικτή «σήραγγα» για να εξέλθει από την ATX, κάποιες δομικές αναδιαμορφώσεις πρέπει να συμβαίνουν ¹⁶.

1.1.5.3. Περιοχές σωματομεδίνης και πρόσδεση στις ιντεγκρίνες

Οι περιοχές σωματομεδίνης (SMB) είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών. Οι δύο περιοχές SMB της ATX αλληλεπιδρούν με την καταλυτική της PDE περιοχή, παρουσιάζουν δομική ομοιότητα, ωστόσο έχουν διαφορετικές δια- κι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή SMB1 συμμετέχει στο σχηματισμό της ανοικτής «σήραγγας», ενώ η SMB2 αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η ATX προσδένεται σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια κι άλλα κύπαρα μέσω πρόσδεσης της SMB2 περιοχής της στις β1 και β3 ιντεγκρίνες. Η πρόσδεση της ATX στις ιντεγκρίνες είναι ένας μηχανισμός που επιτρέπει την παραγωγή του LPA στην κυπαρική μεμβράνη ^{41,47,48}. Η περιοχή SMB2 της ATX περιέχει στην αλληλουχία της το μοτίβο πρόσδεσης στις ιντεγκρίνες RGD (αργινίνη, γλυκίνη, ασπαραγινικό οξύ). Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι το μοτίβο αυτό δεν είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση ATX-ιντεγκρινών ⁴¹.

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα προκύπτει ότι η ΑΤΧ, με την πρόσδεσή της στις ιντεγκρίνες μέσω της SMB2 περιοχής στο αμινοτελικό της άκρο ή με την πρόσδεση συγκεκριμένα της α ισομορφής της στις μεμβρανικές πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης μέσω της πολυβασικής αλληλουχίας της PDE περιοχής της, αποκτά τέτοιο εντοπισμό κοντά στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε η παραγωγή του LPA να περιορίζεται τοπικά δίπλα στους υποδοχείς του LPA (Εικόνα 1.6)¹⁶.



Εικόνα 1.6: Απεικόνιση της δομής, του υποκυτταρικού-εξωκυτταρικού εντοπισμού και των αλληλεπιδράσεων των ENPP1, ENPP3, ΑΤΧα και ΑΤΧβ¹⁶.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ΑΤΧ προσδένεται στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα μέσω ιντεγκρινών, γεγονός που οδηγεί στην αυξημένη κινητικότητα των λεμφοκυττάρων, λόγω του τοπικά αυξημένου LPA ^{20,49,50}. Αν και ακόμη δεν είναι γνωστό το σημείο πρόσδεσης της ΑΤΧ στις ιντεγκρίνες, έχει προσδιοριστεί και ένα ακόμη μοτίβο πρόσδεσης στις ιντεγκρίνες (LDV), το οποίο βρίσκεται στην καταλυτική περιοχή PDE της ATΧ. Το συμπέρασμα είναι ότι η ΑΤΧ διαθέτει διαφορετικές περιοχές στις οποίες είναι δυνατό να προσδεθούν οι ιντεγκρίνες, διευκολύνοντας έτσι τον εντοπισμό της στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ⁴⁷. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ιντεγκρίνες εκτός από την κυτταρική προσκόλληση παίζουν ρόλο και στη μεταγωγή σήματος από το εξωκυττάριο στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, σε συνδυασμό με κάποια ευρήματα για μη καταλυτική αλλά σηματοδοτική δράση της ΑΤΧ, που εξαρτάται από την πρόσδεση στις ιντεγκρίνες ¹⁶.

1.1.6. Έκφραση της ΑΤΧ

Η ΑΤΧ εκφράζεται ευρέως σε διάφορους ιστούς, παρουσιάζοντας τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικές συνθήκες σε λιπώδη ιστό, εγκέφαλο, νωτιαίο μυελό, ωοθήκες, όρχεις, πνεύμονα, έντερο, νεφρούς, λεμφαδένες και κυρίως στα μεγάλα ενδοθηλιακά φλεβίδια στα λεμφοειδή όργανα (πχ. Peyer patches, HEVs: high endothelial venules), τα οποία ελέγχουν την είσοδο των λεμφοκυττάρων ^{16,20,49,51}. Η ΑΤΧ βρίσκεται καταλυτικά δραστική σε πολλά βιολογικά υγρά όπως ορός, πλάσμα (0.4-1.3 mg/ml) ⁵², βρογχοκυψελιδικό έκκριμα (BALF), υγρό σε φλύκταινες, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, περιτοναϊκό υγρό, αρθρικό υγρό, ούρα ⁵³. Επιπλέον, η ΑΤΧ εκκρίνεται φυσιολογικά από το

βρογχικό επιθήλιο ⁵⁴, τα HEVs ²⁰, το χοριοειδές πλέγμα ³, τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα ⁵⁵, καθώς και από τα εξωσώματα ⁵⁶.

1.1.6.1. Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου Enpp2

Το γονίδιο της ATX (*ENPP2*) οργανώνεται σε 27 εξόνια κι εδράζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 8 (8q24). Η συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή σχετίζεται με συχνές γενετικές τροποποιήσεις σε ασθενείς με καρκίνους, κυρίως πολλαπλασιασμούς ³², καθώς και με τη ρύθμιση της έκφρασης του πρωτοογκογονιδίου *MYC*, το οποίο επίσης εδράζεται στην ίδια γενετική περιοχή ⁵⁷. Επιπλέον, έχουν βρεθεί απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο *Enpp2* ή γύρω από αυτό ⁵⁸, περιοχές προαγωγών του *Enpp2* με υπερμεθυλίωση σε επιθετικό καρκίνο μαστού ⁵⁹, ενώ έχει προταθεί και η επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης του *Enpp2* μέσω αναστολής της αποακετυλίωσης των ιστονών ⁶⁰. Το γονίδιο της ATX (*Enpp2*) στο ποντίκι εδράζεται στο χρωμόσωμα 15 ³⁷.

Η μεταγραφή του γονιδίου *ENPP2/Enpp2* ρυθμίζεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και ανάλογα με την παθο-φυσιολογική κατάσταση (Hoxa13, Hoxd13, NFAT-1, v-Jun, c-Jun, STAT3, AP-1, NFκB)⁶¹⁻⁶⁷. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, η σταθερότητα του *Enpp2* mRNA ελέγχεται από τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA HuR και AUF1⁶⁸. Η έκφραση του *Enpp2* επάγεται από τους FGF, EGF, BMP2, Wnt-1 και αναστέλλεται από τον TGFβ και την ιντερλευκίνη IL-4 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο^{31,69}. Επίσης, έχει προταθεί ότι και άλλοι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες επάγουν την έκφραση του γονιδίου της ATX ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, όπως οι TNF, IL-1β, IL-6, LPS, ολιγονουκλεοτίδια CpG, LPC ^{29,70-73}.

1.1.7. Βιοχημικές ιδιότητες της ΑΤΧ

Η ΑΤΧ εκτός από τα λυσοφωσφολιπίδια, τα οποία αποτελούν το κύριο υπόστρωμά της φυσιολογικά, δρα και σε γλυκερολυσοφωσφολιπίδια, παράγοντας LPA. Επίσης, η ΑΤΧ *in vitro* μπορεί να δράσει και σε σφιγγοσυλ-φωσφορυλ-χολίνη (SPC) μετατρέποντάς την σε 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P), έναν λιπιδιακό μεσολαβητή ²⁷ ανάλογο του LPA. Η ΑΤΧ σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιεί νερό ως δότη ηλεκτρονίων, ενώ απουσία νερού, όπως για παράδειγμα σε αιθέρα, χρησιμοποιεί ως δότη την υδροξυλομάδα στη θέση *sn*-2 των λυσοφωσφολιπιδίων, παράγοντας κυκλικό PA (cPA) ⁷⁴. Παρουσία μεθανόλης, χρησιμοποιεί ως δότη τη μεθανόλη παράγοντας λυσοφωσφατιδυλ-μεθανόλη εμφανίζουν βιοδραστική ικανότητα παρόμοια με των λιπιδίων και ενεργοποιούν τους υποδοχείς του LPA, αλλά ασθενώς ⁷⁶.

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της ΑΤΧ είναι ότι η δραστικότητά της ως λυσοφωσφολιπάση D εξαρτάται από το λιπαρό οξύ της LPC και «προτιμάει» τα περισσότερο ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινολεϊκό και το αραχιδονικό οξύ ²⁷ ή/ και LPC με μικρή αλυσίδα λιπαρού οξέος (14:0> 16:0> 18:3> 18:1> 18:0) ⁴⁶, ενώ η δραστικότητά της εξαρτάται από δισθενή κατιόντα όπως Co²⁺ και Mn^{2+ 16,53}. Η δραστικότητα της ATX αναστέλλεται από το προϊόν της, το LPA και από το παρόμοιο λυσοφωσφολιπίδιο, S1P. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι μεγαλύτερη είναι η αναστολή της ATX από τα LPA με μακριά αλυσίδα λιπαρού οξέος (18:1, 16:0) σε σχέση με εκείνα με μικρότερη αλυσίδα, γεγονός που υποδεικνύει την πιο εύκολη πρόσβαση της άκυλ-αλυσίδας στον υδρόφοβο «θύλακα» του ενζύμου ^{5,31,77}. Η κινητική ανάλυση της ATX υπέδειξε την αργή απελευθέρωση του LPA από την ATX ⁷⁸, πιθανώς λόγω του υψηλού συντελεστή συγγένειας του ενζύμου ⁵.

1.1.8. Ρόλος της ΑΤΧ σε φυσιολογικές διαδικασίες

Η ΑΤΧ ασκεί τις φυσιολογικές - βιολογικές της δράσεις μέσω της παραγωγής βιοδραστικού LPA. Η ΑΤΧ είναι απαραίτητη για την εμβρυική ανάπτυξη, μιας και τα ομόζυγα ποντίκια που δεν κωδικοποιούν το γονίδιο της ΑΤΧ (Enpp2^{-/-}) δε γεννιούνται και τα έμβρυα πεθαίνουν την εμβρυική μέρα 9.5-10.5 λόγω ανικανότητας σχηματισμού των αιμοφόρων αγγείων του λεκιθικού σάκου, εμφανίζοντας νευρολογικά προβλήματα ^{9-11,79}. Η ΑΤΧ είναι πιθανό να διαδραματίζει ρόλο στην ανάπτυξη με μη καταλυτική δράση, ιδιαίτερα στο νευρικό σύστημα ⁸⁰. Επίσης, η ΑΤΧ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λιπογένεση και η έκφρασή της αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων σε λιποκύτταρα ⁸¹.

Η ΑΤΧ εμπλέκεται στην ασβεστοποίηση της μήτρας των χόνδρων των αρθρώσεων, στην προγεννητική και μεταγεννητική ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και στο σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων ¹⁴. Ένας επιπλέον ρόλος της ΑΤΧ είναι ότι προωθεί την είσοδο των λεμφοκυττάρων της κυκλοφορίας στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα (λεμφαδένες, Peyer patches), αλλά και σε μη-λεμφογενείς ιστούς με φλεγμονή. Η αυξημένη παραγωγή της ΑΤΧ στα ενδοθηλιακά κύτταρα των HEVs έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων μέσω ιντεγκρινών στην επιφάνειά τους με την ΑΤΧ. Η συνακόλουθη τοπική παραγωγή του LPA επάγει τη χημειοκίνηση των Τ κυττάρων κι επιφέρει μορφολογικές αλλαγές στα λεμφοκύτταρα προωθώντας την προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα των HEVs (Εικόνα 1.7) ^{20,27}.



Εικόνα 1.7: *Ιn vivo* ρόλοι του άξονα ΑΤΧ/LPA σε φυσιολογικές διαδικασίες και παθολογικές καταστάσεις ²⁷.

1.1.9. Ρόλος της ΑΤΧ σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις

1.1.9.1. ΑΤΧ και Καρκίνος

Η ΑΤΧ εμπλέκεται στη μετάσταση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 1.7) ^{82,83}. Η αλληλεπίδραση της ΑΤΧ με την ιντεγκρίνη ανβ3 στα καρκινικά κύτταρα, ελέγχει τη μετάσταση του καρκίνου από το μαστό στα οστά ⁸⁴. Αυξημένη έκφραση της ΑΤΧ έχει βρεθεί σε κακοήθεις καρκινικούς ιστούς όπως του μαστού ⁸⁵, των νεφρών ⁸⁶, στο λέμφωμα Hodgkin ⁸⁷, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ⁸⁸, το γλοιοβλάστωμα ⁸⁹. Πρόσφατη μελέτη στο εργαστήριό μας έδειξε αυξημένη δραστικότητα ΑΤΧ στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ⁹⁰.

Η ΑΤΧ επάγει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω του υποδοχέα LPA₁ όπως έχει βρεθεί σε νευρικά κύτταρα μετασχηματισμένα με cDNA του LPA₁⁹¹, κύτταρα Swiss3T3⁹², καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου ⁹³ και παγκρέατος ⁹⁴. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν LPC στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα για την ATX, με αποτέλεσμα την παραγωγή LPA, το οποίο με τη σειρά του επάγει την κυτταρική κινητικότητα ¹³.

1.1.9.2. ΑΤΧ και άλλες ασθένειες

Η ΑΤΧ διαδραματίζει ρόλο στο νευροπαθητικό πόνο και στην απομυελίνωση μέσω του υποδοχέα LPA₁ (Εικόνα 1.7) ⁹⁵⁻⁹⁷. Τραυματισμός στο περιφερικό νευρικό σύστημα μπορεί να οδηγήσει σε νευροπαθητικό πόνο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από πόνο που προκαλείται από μη επιβλαβή ερεθίσματα και υπεραλγησία ⁴⁶. Η συγκέντρωση και η δραστικότητα της ΑΤΧ έχουν βρεθεί αυξημένες σε ασθενείς με χρόνιες ηπατικές ασθένειες. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα ΑΤΧ έχουν βρεθεί σε έγκυες γυναίκες που γέννησαν πρόωρα, σε

περιτοναϊκό υγρό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, δερματικές κύστεις και βλεννώδες κυσταδένωμα ⁹⁸, στο μετωπιαίο φλοιό ασθενών με Αλτσχάιμερ ⁹⁹ και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση ¹⁰⁰.

1.2. LPA: το προϊόν της ΑΤΧ

Το LPA (άκυλο-*sn*-3-φωσφορική γλυκερόλη) (LM ID: LMGP10050000) είναι το πιο απλό φωσφολιπίδιο το οποίο αποτελείται από μια φωσφορική ομάδα, μία γλυκερόλη και ένα λιπαρό οξύ ^{27,101}. Το LPA είναι το πιο απλό βιοδραστικό φωσφολιπίδιο και συγκεκριμένα λυσοφωσφολιπίδιο, με μοριακό βάρος 430-480 Da, το οποίο -όπως και το κυριότερο πρόδρομο μόριό του, το LPC- απαρτίζεται από διάφορα «μοριακά είδη» που διαφέρουν στο μήκος και το βαθμό κορεσμού των αλυσίδων των λιπαρών τους οξέων, τα οποία είναι εστεροποιημένα στη θέση *sn*-1 (ή πιο σπάνια στη θέση *sn*-2) της «ραχοκοκαλιάς» της γλυκερόλης (16:0, 18:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4) ^{102,103}. Επιπλέον, υπάρχουν και 1-αλκυλ ή 1-αλκένυλ-LPA τα οποία συνδέονται με αιθερικό δεσμό στη «ραχοκοκαλιά» της γλυκερόλης, αλλά είναι πολύ πιο σπάνια (Εικόνα 1.8) ¹⁶.



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση ειδών LPA με διαφορετικό μήκος αλυσίδας λιπαρού οξέος και βαθμού κορεσμού ¹⁰⁴.

1.2.1. Το LPA σε βιολογικά υγρά

Το LPA όντας υδατοδιαλυτό, έχει ανιχνευθεί εξωκυτταρικά σε σημαντικές ποσότητες της τάξης των μΜ στον ορό (>5 μΜ) ^{76,105} και σε μικρότερες συγκεντρώσεις ~0,7 μΜ στο πλάσμα και <1 μΜ στα υπόλοιπα βιολογικά υγρά ¹⁰⁴, όπως σάλιο ¹⁰⁶, σπερματικό υγρό ¹⁰⁷, θυλακικό υγρό ¹⁰⁸, ασκιτικό υγρό ¹⁰⁹ και σε αίμα από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών ¹¹⁰ αλλά και σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ^{46,111}. Τα επίπεδα του LPA στον ορό είναι πολύ μεγαλύτερα συγκριτικά με το πλάσμα εξαιτίας της απελευθέρωσης του LPC από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια κατά την πήξη του αίματος ¹⁰⁹. Τα πιο άφθονα είδη του LPA στον LPA στον Δ. [12,113].

1.2.2. Βιολογικές δράσεις του LPA

Το LPA εκτός από πρόδρομο μόριο στη *de novo* βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων, ομοιάζει με τη λειτουργία των αυξητικών παραγόντων κι επάγει μια πληθώρα κυτταρικών αποκρίσεων σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους ^{53,69}, ²⁷. Το LPA δρα *in vivo* ως λιπιδιακός μεσολαβητής τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου ^{114,115}, στο νευροπαθητικό πόνο ¹¹⁶, στην εμφύτευση του εμβρύου ¹¹⁷, στην ανάπτυξη της τρίχας ¹¹⁸ και στο σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων ^{9,10}.

Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες αποκρίσεις της σηματοδότησης μέσω LPA είναι η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων (Εικόνα 1.9)^{16,31}.



Εικόνα 1.9: Αποτέλεσμα της σηματοδότησης μέσω του LPA είναι μια σειρά κυτταρικών αποκρίσεων που περιλαμβάνουν την κινητικότητα, την επιβίωση, την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη σύσπαση των κυττάρων ¹¹⁹.

Πιο συγκεκριμένα, το LPA επάγει neurite retraction, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, την επούλωση τραυμάτων μέσω της διαδικασίας επαναεπιθηλιοποίησης ¹²⁰, τη σύσπαση των λείων μυικών ινών, τη χημειοταξία, το σχηματισμό actin stress ³¹, την αγγειοδραστικότητα, αλλαγές στη διαφοροποίηση, την αναστολή της απόπτωσης, την αναδιοργάνωση του κυπαροσκελετού, την κυτταρική προσκόλληση και την ενεργοποίηση καναλιών ιόντων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι το LPA επιτάχυνε την εμβρυική νευρογένεση, τη μεταγεννητική ωρίμανση της μυελίνης και συνέβαλε στον πολλαπλασιασμό πρωτογενών οστεοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυπάρων των αγγείων ¹⁴. Η δράση του LPA στη διαπερατότητα των αγγείων εξαρτάται από τον τύπο και το περιεχόμενο των ενδοθηλιακών κυπάρων των αγγείων, τα οποία καθορίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι που θα ακολουθηθεί, ήτοι ενεργοποίηση της RhoA, η οποία επάγει τη διαπερατότητα του ενδοθηλιακού φραγμού ³¹. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και ανασταλτικές δράσεις του LPA, όπως η αναστολή της ενεργοποίησης των CD8 Τ λεμφοκυττάρων σε μελάνωμα ^{121,122}.
Αναφορικά με το ρόλο του LPA στην επούλωση τραυμάτων, έχει βρεθεί ότι το LPA επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των μεσεγχυματικών κι επιθηλιακών κυττάρων, την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, τη συσσώρευση της φιμπρονεκτίνης και τη σύσπαση των μυοϊνοβλαστών ³¹. Όσον αφορά τη χημειοταξία, έχει βρεθεί ότι το LPA με πιο μακριά και ακόρεστη αλυσίδα λιπαρού οξέος επάγει κατά προτίμηση τη χημειοταξία των δενδριτικών κυττάρων *in vitro*, πιθανώς λόγω διαφορετικής πρόσδεσης του LPA στους υποδοχείς του LPA ¹²³.

1.2.3. Παραγωγή και βιοδιαθεσιμότητα του LPA

1.2.3.1. Βιοσύνθεση του LPA

Το LPA προέρχεται από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια (PC, PE, PS). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.10, το ένζυμο φωσφολιπάση A (PLA) απομακρύνει μία αλυσίδα λιπαρού οξέος από τα φωσφολιπίδια, μετατρέποντάς τα σε λυσοφωσφολιπίδια (LPC, LPE, LPS). Έπειτα, η ATX απομακρύνει την πολική ομάδα από τα λυσοφωσφολιπίδια παράγοντας LPA. Το LPC προέρχεται είτε από τη μεμβράνη, είτε από την κυκλοφορία προσδεδεμένο στην αλβουμίνη. Το LPA μπορεί να παραχθεί ενδοκυτταρικά από τη δράση της cPLA₂ (cytosolic PLA₂) με την ταυτόχρονη απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Εναλλακτικά, τα φωσφολιπίδια με τη δράση της φωσφολιπάσης D (PLD), μπορούν να μετατραπούν σε PA, το οποίο με τη σειρά του όταν χάσει τη μία αλυσίδα λιπαρού οξέος από τη sPLA₂ (secreted PLA₂) μετατρέπεται σε LPA ^{104,124,125}.



Εικόνα 1.10: Παραγωγή και μεταβολισμός του LPA ¹⁰⁴.

Πιο συγκεκριμένα, το LPA παράγεται ενδοκυτταρικά κι εξωκυτταρικά. Από βιοχημικής σκοπιάς, το LPA μπορεί να συντεθεί μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών, καθένα από τα οποία αποτελείται από δύο στάδια (Εικόνα 1.11). Στο πρώτο βιοσυνθετικό μονοπάτι, το οποίο κυρίως εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική παραγωγή του LPA, το PA αρχικά παράγεται είτε από κάποιο φωσφολιπίδιο (PL) με τη δράση του ενζύμου φωσφολιπάση D, είτε από τη διακυλογλυκερόλη (DAG) με τη δράση της κινάσης της διακυλογλυκερόλης. Στη συνέχεια το PA μετατρέπεται σε LPA με τη δράση του ενζύμου φωσφολιπάση A₁ (PA-PLA₁α και β: LIPH και LIPI αντίστοιχα στον άνθρωπο), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.11A ¹²⁶. Ορισμένα κορεσμένα είδη LPA μπορεί να παραχθούν από το μεμβρανικό PA με τις PLA₁ και PLA₂ σε φλεγμονώδη κύτταρα, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα ¹²⁷. Στο δεύτερο βιοσυνθετικό μονοπάτι, το οποίο κυρίως εμπλέκεται στην εξωκυττάρια παραγωγή του LPA σε βιολογικά υγρά, ιδίως σε ορό και πλάσμα, τα φωσφολιπίδια αρχικά μετατρέπονται σε λυσοφωσφολιπίδια (LPL) με τη δράση του ενζύμου φωσφολιπάση A (PLA₁, PLA₂). Στη συνέχεια, τα LPL με τη δράση της ATX (Lyso-PLD) μετατρέπονται σε LPA (Εικόνα Γ. Α-Β).



Εικόνα 1.11: Α. Απεικόνιση των μονοπατιών σύνθεσης του LPA. Β. Εξωκυτταρική παραγωγή του LPA μέσω της ATX και της PA-PLA₁²⁷.

Το LPA εκτός από την ATX, μπορεί να παραχθεί εξωκυτταρικά και μέσω ενός λιγότερου κοινού μονοπατιού, που περιλαμβάνει την υδρόλυση του φωσφατιδικού οξέος (PA) στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από τη δράση της μεμβρανικής φωσφολιπάσης A1 (PA-PLA₁ ή LIPH, LPDLR) (Εικόνα 1.11B) ^{17,128}. Το παραγόμενο ακόρεστο 2-ακυλ-LPA δείχνει «προτίμηση» στον υποδοχέα LPA₆. Έχει βρεθεί ότι στα ποντίκια το σηματοδοτικό μονοπάτι PA-PLA₁-LPA₆ ρυθμίζει την ανάπτυξη των τριχοθυλακίων (Εικόνα 1.12) ^{128,129} και ότι στη διαδικασία αυτή η ATX είναι περιττή ¹³⁰. Μετάλλαξη στο LIPH/mPA-PLA1α γονίδιο είναι υπεύθυνη για την κληρονομική διαταραχή "wooly hair" ^{131,132}.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.11Α, το LPA μπορεί να παραχθεί εξωκυτταρικά και μέσω της φωσφορυλίωσης της μονοάκυλ-γλυκερόλης με τη δράση της κινάσης της μονοάκυλ-γλυκερόλης με τη δράση της κινάσης της μονοάκυλ-γλυκερόλης ¹³³, ενώ ένα ακόμη μονοπάτι ενδοκυτταρικής βιοσύνθεσης του LPA είναι μέσω ακυλ-τρανσφερασών, όπως η Ο-ακυλ-τρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (AGPAT) η οποία παράγει LPA από 3-φωσφορική γλυκερόλη ²⁷.



Εικόνα 1.12: Ο άξονας PA-PLA₁α-LPA-LPA₆ στην ανάπτυξη του τριχοθυλακίου. Η PA-PLA₁α στα επιθηλιακά κύτταρα παράγει το 2-άκυλ-LPA, το οποίο μέσω του LPA₆ ενεργοποιεί το TACE/ADAM17 το οποίο απελευθερώνει τον TGFα ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τον EGFR για το σχηματισμό της τρίχας ⁴⁶.

1.2.3.2. Βιοδιαθεσιμότητα του LPA

Όλα τα είδη του LPA παράγονται από την ATX με ταυτόχρονη απελευθέρωση χολίνης από το αντίστοιχο υπόστρωμα LPC. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη είναι μακράν το πιο άφθονο λυσοφωσφολιπίδιο στο πλάσμα και τον ορό, σε συγκεντρώσεις 100-200 μΜ, όπου βρίσκεται προσδεδεμένη κυρίως στην αλβουμίνη ή σπανιότερα σε λιποπρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες ^{134,135}. Σε υδατικά διαλύματα, τα λυσοφωσφολιπίδια όπως η LPC και η LPE μπορούν να υπάρχουν ως ελεύθερα μονομερή, σχηματίζοντας μικύλλια σε χαμηλές μικρομοριακές συγκεντρώσεις (της τάξης λίγων μΜ), ενώ προσδένονται ασθενώς στην αλβουμίνη (Kd~ 2–5 μΜ). Έτσι, τα ελεύθερα μονομερή LPC βρίσκονται σε μία δυναμική ισορροπία με τα μεγάλα προσδεδεμένα στο φορέα (αλβουμίνη) συσσωματώματα LPC και πιθανώς λειτουργούν ως το φυσιολογικό υπόστρωμα για την ATX, μιας και ελάχιστα μικρομόρια LPC είναι αρκετά για το ένζυμο προκειμένου να γίνει η επαγωγή του σήματος ¹⁶.

Σε κυτταρικό επίπεδο, το παραγόμενο LPA αποικοδομείται ταχύτατα από μεμβρανικές φωσφατάσες φωσφορικών λιπιδίων (LPPs) ¹³⁶, με αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση του LPA σε βιολογικά αδρανή μονοάκυλο-γλυκερόλη (Εικ.1.10, 1.13) στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία με εξαίρεση την 2αραχιδονογλυκερόλη δεν επηρεάζει τη μεταγωγή σήματος ^{137,138}. Η εξωκυτταρική-δράση των LPPs συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων του LPA στο άμεσο κυτταρικό μικροπεριβάλλον ¹³⁹. Πέρα από τη δράση των LPPs, η ελάττωση της σηματοδότησης μέσω LPA γίνεται σε επίπεδο υποδοχέων, με την απευαισθητοποίηση κι εσωτερίκευση των υποδοχέων του LPA ³¹.

Όσον αφορά στην κυκλοφορία, έχει βρεθεί ότι το LPA που χορηγείται ενδοφλέβια, «καθαρίζεται» άμεσα μέσω της ηπατικής πρόσληψης, πιθανώς στα ημιτονοειδή ενθοθηλιακά κύτταρα του ήπατος ¹⁴⁰. Πιο αναλυτικά, το LPA έχει χρόνο ημίσειας ζωής μόλις 3 λεπτά στην κυκλοφορία ¹⁴¹, για αυτό η δράση του είναι αυτοκρινής και παρακρινής όταν προσδένεται στην αλβουμίνη ¹⁴².



Εικόνα 1.13: Αποφωσφορυλίωση του LPA με τη δράση των φωσφατασών των φωσφολιπιδίων LPP1-3 σε ανόργανο φωσφορικό και μονοακυλογλυκερόλη (MAG) ^{15,139}.

Πέρα από τη δράση των LPPs, στη βιοδιαθεσιμότητα του LPA σημαντικός είναι ο ρόλος των ακυλοτρανσφερασών του LPA (LPAAT), οι οποίες καταλύουν την προσθήκη μίας άκυλ-αλυσίδας στο LPA, μετατρέποντάς το σε PA στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 1.10)¹⁴³.

Ένας άλλος παράγοντας που ρυθμίζει τη βιοδιαθεσιμότητα του LPA είναι οι πρωτεΐνες που προσδένουν το LPA. Για παράδειγμα, παρουσία αλβουμίνης, το LPA ενεργοποιεί τους υποδοχείς LPA₁ και LPA₂, αλλά όχι τον LPA₃¹⁰⁷. Επίσης, παίζει ρόλο και η ισχυρή πρόσδεση του LPA στην gelsolin του πλάσματος ^{144,145}. Κατά συνέπεια, τα τοπικά επίπεδα του συμπλόκου υποδοχέων του LPA-βιολογικά δραστικού LPA ρυθμίζονται από μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση της ATX, των ελεύθερων υποστρωμάτων λυσοφωσφολιπιδίων, των φωσφατασών λιπιδίων και των πρωτεϊνών που προσδένονται στο LPA ¹⁶, υποδεικνύοντας την αυστηρή ρύθμιση στην οποία υπόκειται ο μεταβολισμός του LPA ¹²³.

1.2.4. Τρόπος δράσης του LPA

Το LPA δρα μέσω υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs), ενεργοποιώντας διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια ¹⁴⁶ ή και πιθανώς μέσω του πυρηνικού υποδοχέα PPARγ ¹⁴⁷, του υποδοχέα RAGE (receptor for advanced glycation end products) ^{148,149} και των ορφανών υποδοχέων P2Y10 ¹⁵⁰ και GPR87 ¹⁵¹. Επίσης, το LPA είναι δυνατόν να ενεργοποιήσει και τον υποδοχέα S1P₁ σε παθολογικές συνθήκες ⁷⁶.

1.2.5. Έλεγχος της ρύθμισης του LPA

Οι διαφορετικές βιολογικές δράσεις του LPA ελέγχονται από την κατανομή των υποδοχέων του LPA και την απευαισθητοποίησή τους, καθώς και τα επίπεδα του τοπικού LPA, όπως αυτά καθορίζονται από το ισοζύγιο των ενζύμων εκείνων που παράγουν και εκείνων που αποικοδομούν το LPA ¹⁴. Επίσης, το βιολογικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης του LPA εξαρτάται από την έκφραση των υποδοχέων του LPA στους ιστούς ¹⁶.

1.2.6. Υποδοχείς του LPA

Το LPA δρα μέσω έξι υποδοχέων (LPAR1-6 ή LPA₁₋₆), οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση και ταυτόχρονα αλληλεπικαλυπτόμενη ή διακριτή δραστικότητα, μιας και οι προσδέτες (ligands) μπορούν να προσδένονται σε πολλούς υποδοχείς ^{17,146}. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς του LPA για τον άνθρωπο είναι τα *LPAR1- LPAR6* ενώ για το ποντίκι τα *Lpar1-Lpar6* ¹⁵². Όλοι οι υποδοχείς LPA έχουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές με μοριακό βάρος 39-42 kDa ¹⁵³.

1.2.6.1. Δομή των υποδοχέων του LPA

Οι υποδοχείς LPA₁₋₃ (LPA₁/EDG2, LPA₂/EDG4, LPA₃/EDG7) κωδικοποιούνται από την οικογένεια γονιδίων *EDG* (endothelial differentiation gene) ¹⁵⁴⁻¹⁵⁸, στην οποία οικογένεια ανήκουν 5 υποδοχείς GPCRs (S1P₁₋₅) για το λιπιδιακό διαμεσολαβητή S1P (sphingosine 1-phosphate) ¹⁵⁹. Οι υποδοχείς LPA₄₋₆ (LPA₄/P2Y9/GPR23, LPA₅/GPR94, LPA₆/P2Y5) ανήκουν στην οικογένεια των πουρινεργικών υποδοχέων (P2Y) GPCRs, της οποίας τα μέλη προσδένονται περισσότερο σε νουκλεοτίδια παρά σε λυσοφωσφολιπίδια ^{118,160-163}.

1.2.6.2. Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του LPA

Η σηματοδότηση του LPA ακολουθείται από ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και D (PLC και PLD, αντίστοιχα), κινητοποίηση ασβεστίου, αναστολή ή επαγωγή της αδενυλικής κυκλάσης (AC), επαγωγή των ΜΑΡ κινασών και μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζονται από παράγοντες απόκρισης ορού κ.ά. (Εικόνα 1.14) ¹³. Το G_{α12/13}-διαμεσολαβούμενο Rho/ROCK και Rho/SRF μονοπάτι εμπλέκεται στην κυτταρική κινητικότητα, κυτταρική εισβολή και σε αλλαγές στον κυτταροσκελετό. Το G_{αα/11} ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC) η οποία επάγει την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃), με αποτέλεσμα την κινητοποίηση του Ca²⁺ και τη διακυλογλυκερόλη (DAG), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται στην αγγειοδιαστολή, την κυτταρική ανάπτυξη και την ανοσολογική συσσώρευση. Η επαγωγή του Gas-διαμεσολαβούμενου μονοπατιού με την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και τη συνακόλουθη παραγωγή του cAMP, αποτρέπει την κυτταρική μετανάστευση. Τέλος, η ενεργοποίηση του G_{αί/ο} επάγει μορφολογικές αλλαγές μέσω των Ras/MAPK κινασών ή αναστολή της AC ή μέσω της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) και της Rac προκαλεί κυτταρική μετανάστευση ή επάγει τους μηχανισμούς κυτταρικής επιβίωσης μέσω PI3K/Akt (Εικόνα εε) ¹⁶⁴.



Εικόνα 1.14: Μεταγωγή σήματος μέσω των 6 υποδοχέων του LPA ¹⁰⁴.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.14, κάθε υποδοχέας του LPA συζεύγνυται με διαφορετικές G-πρωτεΐνες (G_i, G_q, G_s, G_{12/13}). Οι υποδοχείς LPA₁ και LPA₂ κυρίως συζεύγνυνται με G_i πρωτεΐνες, μειώνοντας τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) με ταυτόχρονη ενεργοποίηση των πρωτεΐνών Ras, Rac, ERK και Akt ²⁷. Οι υποδοχείς LPA₁ και LPA₂ συζεύγνυνται και με τις πρωτεΐνες G_{12/13} ενεργοποιώντας μικρές GTPάσες (Rho), με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την κυτταρική μετανάστευση ^{165,166}. Η σύζευξη των υποδοχέων LPA₂ και LPA₃ με τις πρωτεΐνες G_q επιφέρει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C με τη συνακόλουθη κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ¹⁵⁶. Η σύνδεση του LPA₃ με τις πρωτεΐνες G_{i/o} ενεργοποιεί τις MAPK και μπλοκάρει την αδενυλική κυκλάση ¹⁶⁷. Ο υποδοχέας LPA₄ διαμεσολαβεί στην αύξηση των επιπέδων του cAMP και στην κινητοποίηση του ασβεστίου ¹⁶⁸, ενώ η σύζευξη του υποδοχέα LPA₅ με τις πρωτεΐνες G_{12/13} διαμεσολαβεί στο σχηματισμό των stress fiber ¹⁶¹. Τέλος, ο υποδοχέας LPA₆ συζεύγνυται με τις πρωτεΐνες G_{12/13} ^{169,170}.

1.2.6.3. Ενεργοποίηση των υποδοχέων του LPA

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων του LPA εξαρτάται από το είδος του λιπαρού οξέος του LPA. Και οι έξι υποδοχείς του LPA μπορούν να ενεργοποιηθούν από το 1-ακυλ-LPA (Εικόνα 1.8a) αλλά με διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης. Γενικά, τα LPA με ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως τα ολεϊκά οξέα, τα λινολεϊκά οξέα ή τα αραχιδονικά οξέα προσδένονται πιο ισχυρά στους υποδοχείς του LPA (χαμηλές τιμές EC₅₀) επάγοντας τις βιολογικές τους δράσεις, συγκριτικά με τα LPA με κορεσμένο λιπαρό οξύ. Επίσης, τα LPA με πιο «μακριά» αλυσίδα λιπαρού οξέος είναι πιο «δραστικά» συγκριτικά με εκείνα που διαθέτουν άκυλαλυσίδα με λιγότερα άτομα άνθρακα ^{27,171,172}. Ο υποδοχέας PPARγ ενεργοποιείται μόνο από ακόρεστα LPA ⁷⁶.

Οι υποδοχείς LPA₃ και LPA₆ παρουσιάζουν μια μοναδική εξειδίκευση για τον προσδέτη τους. Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποιούνται ισχυρά από LPA με ακόρεστη αλυσίδα λιπαρού οξέος και μάλιστα αποκρίνονται καλύτερα στο LPA που διαθέτει ακόρεστη ακυλομάδα στη θέση *sn*-2 της «ραχοκοκαλιάς» της γλυκερόλης (Εικόνα 1.8b), παρά σε LPA με κορεσμένη ή ακόρεστη ακυλ-ομάδα στη θέση *sn*-1 ^{16,27,169}. Ο υποδοχέας LPA₅ δείχνει «προτίμηση» για το 1-αλκυλ-LPA (Εικόνα 1.8d), του οποίου το λιπαρό οξύ είναι συνδεδεμένο με αιθερικό δεσμό ^{121,172}, ενώ ο υποδοχέας LPA₄ ενεργοποιείται ισχυρά από το 1-ολεοϊλ-LPA ¹⁶⁰.

1.2.6.4. Έκφραση των υποδοχέων του LPA

Οι βιολογικές δράσεις του LPA σχετίζονται με την ευρεία κατανομή και διαφορετική έκφραση των υποδοχέων του LPA στα διάφορα όργανα και κύτταρα. Ο υποδοχέας LPA₁ παρουσιάζει μεγάλη έκφραση στα κύτταρα του νευρικού συστήματος ^{115,166,173}, ο LPA₂ στα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος (θύμο αδένα και σπλήνα), στα λευκά αιμοσφαίρια και όρχεις στους ανθρώπους, σε νεφρούς, μήτρα και όρχεις στα ποντίκια ^{166,174}, ο LPA₃ σε καρδιά, πνεύμονα, πάγκρεας, προστάτη και κυρίως σε όρχεις, μήτρα και ωοθήκες στον άνθρωπο ¹⁵⁶, ενώ οι υποδοχείς LPA₄–LPA₆ παρουσιάζουν ευρεία έκφραση αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, ο LPA₄ εκφράζεται στις ωοθήκες, ο LPA₅ σε λεπτό έντερο, καρδιά, σπλήνα, εμβρυικά βλαστοκύτταρα, πνεύμονα και εγκέφαλο ^{27,175}.

Σε παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες παρατηρείται αλλαγή της έκφρασης των υποδοχέων του LPA. Για παράδειγμα, η έκφραση του LPA₂ αυξάνεται στον καρκίνο του θυρεοειδούς, του παχέος εντέρου, του μαστού και του στομάχου ¹⁷⁶. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η πολυπλοκότητα της σηματοδότησης μέσω των διαφορετικών υποδοχέων του LPA για την ίδια νόσο. Για παράδειγμα, η «ένταση» μιας ασθένειας μπορεί να μειώνεται με τη σηματοδότηση μέσω του ενός υποδοχέων του LPA και να αυξάνεται με τη μεταγωγή του σήματος μέσω των υπολοίπων υποδοχέων του LPA, υποδεικνύοντας τη σημασία της διαφοροποίησης-αλλαγών στην «αφθονία» των υποδοχέων του LPA στην εκάστοτε χρονική στιγμή ¹⁵.

Η δημιουργία knockout ποντικών που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα LPA₁ (LPA₁-⁻⁻) έδειξε πρόβλημα στην ανάπτυξη του εγκεφάλου: μείωση του αριθμού των νευρικών κυττάρων του κρανιακού νευρικού συστήματος κι ελάττωση του αριθμού των κυττάρων Schwann στο ισχιακό νεύρο, με αποτέλεσμα την κατά το ήμισυ θνησιμότητα των νεογνών ποντικών και την αργή ανάπτυξή τους ¹¹⁴. Σχετικά πρόσφατα δείχθηκε ότι τα LPA₁-/- ποντίκια παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού του κυψελιδικού διαφράγματος κατά την ανάπτυξη ¹⁷⁷. Επίσης, ο υποδοχέας LPA₁ είναι υπεύθυνος για το νευροπαθητικό πόνο μιας και η γενετική απαλοιφή του στα ποντίκια, τα καθιστά ανθεκτικά στην απομυελίνωση του νωτιαίου μυελού ^{116,178}. Μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας LPA₁ ευθύνεται για την κυτταρική μετανάστευση σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, ενώ εμπλέκεται στην πνευμονική ¹⁷⁹ και νεφρική ίνωση ¹⁸⁰. Γενετική και φαρμακολογική απαλοιφή του υποδοχέα LPA₁ περιορίζει σημαντικά την ίνωση σε νεφρούς, πνεύμονα, αρτηρίες και δέρμα ¹⁸¹. Ο υποδοχέας LPA₁ εκφράζεται κυρίως κατά την εμβρυική μέρα 9.5 στο ποντίκι¹⁰.

Η δημιουργία knockout ποντικών που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα LPA₂ (LPA₂-^{/-}), έδειξε την αντιαποπτωτική και προστατευτική δράση του LPA₂ έναντι της επαγόμενης εντερικής βλάβης είτε από ακτινοβολία με ακτίνες X ή από αντικαρκινικά φάρμακα ¹⁸². Επιπλέον, τα LPA₂-^{/-} ποντίκια εμφάνισαν μειωμένη καρκινογένεση του παχέος εντέρου μειώνοντας προφλεγμονώδεις παράγοντες (MCP-1, MIF) ¹⁸³.

Ο υποδοχέας LPA₃ εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας κατά έναν προγεστερονο-εξαρτώμενο τρόπο και παίζει ρόλο στην αρχική εμφύτευση του εμβρύου ¹⁸⁴. Η εξάλειψη του γονιδίου του υποδοχέα LPA₃ σε θηλυκά ποντίκια οδήγησε σε ελαττωματική εμφύτευση του εμβρύου λόγω μειωμένης έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και συνεπακόλουθη μείωση των επιπέδων των προσταγλανδινών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εμβρυική εμφύτευση ¹¹⁷. Ο υποδοχέας LPA₃ φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην αναπαραγωγική λειτουργία του αρσενικού ποντικού ¹⁸⁵. Τα LPA₄^{-/-} ποντίκια ζουν κανονικά χωρίς να παρουσιάζουν κάποιο ελάττωμα, ωστόσο παρουσιάζουν 30% θνησιμότητα πιθανώς λόγω αγγειακού προβλήματος κατά την εμβρυογένεση ¹⁸⁶. Ο υποδοχέας LPA₆

1.3. Άξονας σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA

Ο άξονας μεταγωγής σήματος ΑΤΧ/LPA είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του αγγειακού και νευρικού συστήματος ^{11,79}, καθώς και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των αγγείων ^{137,187,188}. Το LPA εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η επούλωση των πληγών, η ανάπλαση των ιστών, η συσσώρευση αιμοπεταλίων ¹⁸⁹, η προσέλκυση λεμφοκυττάρων ^{20,49,50,190}, η ρύθμιση της φυσιολογίας και της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων ¹³⁷, η αθηροσκλήρυνση ¹⁹¹, η ρύθμιση της φυσιολογίας και της φυσιολογίας και διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων ¹⁹², η πνευμονική ίνωση

^{54,179}, ο νευροπαθητικός πόνος ¹¹⁶, το καρδιαγγειακό ¹⁹³, ο χολοστατικός κνησμός ¹⁹⁴, η σπερματογένεση ¹⁸⁵, η ανάπτυξη των τριχών και η εξέλιξη του όγκου (Πίνακας 1.1) ^{84,195-} ¹⁹⁷.

Enzymes	Receptors
PA-PLA ₁ α	LPA ₆
ATX, LPP3	LPA1.4.6
unidentified	LPA ₁
ATX	LPA ₁
unidentified	LPA ₃
ATX, LPP1	LPA ₁₋₃
	Enzymes PA-PLA ₁ α ATX, LPP3 unidentified ATX unidentified ATX, LPP1

Πίνακας 1.1: Παθοφυσιολογικές δράσεις του άξονα ATX/LPA ¹⁹⁸.

1.3.1. Άξονας ΑΤΧ/LPA στην αναπαραγωγή και εμβρυική ανάπτυξη

Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της σηματοδότησης του άξονα ATX/LPA στην αναπαραγωγή. Ο υποδοχέας LPA₃ παίζει ρόλο στην αρχική εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα μέσω της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και τη συνεπακόλουθη παραγωγή προσταγλανδινών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εμβρυική εμφύτευση. Επίσης, ο LPA₃ ρυθμίζει τη σύσπαση του μυομητρίου και επάγει αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στην περιοχή της μήτρας (Εικόνα 1.15)



Εικόνα 1.15: Ο άξονας σηματοδότησης LPA/ LPA₃ στην εμφύτευση του εμβρύου ⁴⁶.

Ο πολλαπλασιασμός των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου ποντικού σε καλλιέργεια εξαρτάται από τη σηματοδότηση του LPA, διαδικασία στην οποία συμμετέχουν το ίδιο διάφοροι υποδοχείς του LPA (LPA₁, LPA₃)²⁰⁰. Επιπλέον, βρέθηκε σε ζωικά μοντέλα η εμπλοκή της μεταγωγής σήματος μέσω LPA στην ανάπτυξη θυλακίων των ωοθηκών²⁰¹.

Κατά τη διάρκεια μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης παρατηρείται αύξηση της μεταγραφής της ΑΤΧ στον πλακούντα ²⁰². Διαταραχή στην παραγωγή της ΑΤΧ στον πλακούντα συνδέεται με την προ-εκλαμψία, κατάσταση επικίνδυνη για τη μητέρα και το έμβρυο ²⁰³. Η σοβαρότητα της προ-εκλαμψίας, η οποία συνδέεται με την αρτηριακή πίεση

και τα επίπεδα ουρικού οξέος της μητέρας βρέθηκε ότι συσχετίζεται και με τα επίπεδα της ΑΤΧ στον ορό της μητέρας ²⁰⁴. Κατά συνέπεια, η στόχευση του άξονα ΑΤΧ/LPA μπορεί να βοηθήσει στην επίλυση προβλημάτων από επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη ^{15,205,206}.

Αναφορικά με την εμβρυική ανάπτυξη, δείχθηκε ότι η εμβρυική θνησιμότητα των knockout ως προς την ATX ποντικών στην εμβρυική μέρα 9,5 οφείλεται στην έλλειψη της καταλυτικής δραστικότητας της ATX, μιας και μία σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 210 που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή από θρεονίνη σε αλανίνη επιφέρει το θάνατο του εμβρύου ²⁰⁷. Η προσθήκη LPA σε καλλιέργεια *ex vivo*, τουλάχιστον εν μέρει βελτίωσε τις βλάβες στο νευρικό σύστημα ¹¹. Η μεταγωγή σήματος μέσω ATX/LPA και η συμβολή στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αποτελεί έναν εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό ¹⁹². Αξίζει να αναφερθεί ότι έμβρυα ποντικών knockout ως προς την πρωτεΐνη G_{a13} παρουσίασαν παρόμοια αγγειακά προβλήματα με τα ATX^{-/-} έμβρυα, γεγονός που υποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο της πρωτεΐνης G_{a13} στη μεταγωγή του σήματος μέσω του άξονα ATX/LPA στο αγγειακό σύστημα ^{208,209}.

Επιπρόσθετα, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της ΑΤΧ σε έμβρυα ποντικού οδήγησε στο θάνατο των εμβρύων στις 9.5-11.5 εμβρυικές ημέρες, παρουσιάζοντας καθυστερημένη ανάπτυξη και προβλήματα στο νευρικό κι αγγειακό σύστημα. Επίσης, προβλήματα στο αγγειακό σύστημα εμφανίστηκαν και σε νεογνά ποντικών έπειτα από επαγόμενη υπερέκφραση της ΑΤΧ²¹⁰. Εμβρυική θνησιμότητα παρουσιάστηκε και σε knockout ποντίκια για την LPP3 εμφανίζοντας παρόμοια αγγειακά προβλήματα ^{211,212}. Κατά συνέπεια, η ακριβής ρύθμιση των επιπέδων του LPA κρίνεται απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη ¹⁵.

1.3.2. Άξονας ΑΤΧ/LPA στην ανοσία

Η αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται από τη συνεχή ροή των λεμφοκυττάρων μέσα από τα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα. Τα λεμφοκύτταρα της κυκλοφορίας μέσα από μία διαδικασία που ονομάζεται lymphocyte rolling, αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των HEVs στους λεμφαδένες και στα Peyer's patches (PPs) του εντέρου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των HEVs εκφράζουν χημειοκίνες (πχ CCL21, CXCL13) και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, στα οποία προσδένονται τα λεμφοκύτταρα και διαπερνούν τα HEVs. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι προσωρινή, αναστρέψιμη κι επιφέρει μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα ⁵¹.

Ο άξονας σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ΑΤΧ μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα προσκόλλησης για τα λεμφοκύτταρα, υποβοηθώντας τη διαπέρασή τους από το ενδοθήλιο ⁴⁹⁻⁵¹. Η αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζεται από την τοπική ΑΤΧ των HEVs και όχι από την ΑΤΧ της κυκλοφορίας ⁵¹. Αναφορικά με την έμφυτη ανοσία, το LPA προάγει την εξαγγείωση των λεμφοκυττάρων, διατηρώντας την ανοσολογική ομοιόσταση με τη μετατροπή των CD11b+ μονοκυττάρων σε F4/80 μακροφάγα, στα ποντίκια αλλά και στον άνθρωπο ²¹³.

Η ΑΤΧ επάγεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έπειτα από ενεργοποίηση του υποδοχέα TLR (Toll-like Receptor) από LPS (λιποπολυσακχαρίτη), μέσω της ιντερφερόνης τύπου Ι ενεργοποιώντας τα μονοπάτια σηματοδότησης των JAK/STAT και PI3K-Akt⁷³. Η ΑΤΧ εκφράζεται στα στρωματικά κύτταρα των λεμφαδένων προωθώντας τη μετακίνηση των Τ λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες κυρίως μέσω του υποδοχέα LPA₂ ^{214,215}. Τα ανθρώπινα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά που προέρχονται από τα μονοκύτταρα εκφράζουν κυρίως τους υποδοχείς LPA₁ και LPA₂. Το LPA επάγει την έκκριση της IL-13 από τα ενεργοποιημένα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα ΚD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά που περιφερικού αίματος και σπλήνα ¹²³. Το LPA επάγει τη μετατροπή των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε naïve βλαστοκύτταρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού LPA₁-STAT3 ²¹⁶.

Μελέτες σε ποντίκια και zebrafish έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω ATX-LPA₁ συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων μέσω της εισόδου στη φάση S και με ρύθμιση της διάταξης της φιμπρονεκτίνης, οδηγεί στο σχηματισμό του χόνδρου ²¹⁷. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η σηματοδότηση μέσω του C18:1-LPA παίζει ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών που μεσολαβούν στη βελτίωση της ουλίτιδας, ενώ σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής προωθεί την περιοδοντίτιδα ^{218,219}.

Στην οξεία φλεγμονή, η ΑΤΧ αυξάνεται κατά την επιδιόρθωση του ιστού. Τα υψηλά επίπεδα LPA μειώνουν τη μεταγραφή της ΑΤΧ μέσω της σηματοδότησης LPA₁-PI3K. Η καταστολή αυτή αντισταθμίζεται από την επαγωγή της σύνθεσης της ΑΤΧ μέσω των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNFa και IL-1β. Η ΑΤΧ εξαλείφεται γρήγορα από την κυκλοφορία από τα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος και έτσι, μετά την επιδιόρθωση της βλάβης, τα επίπεδα της ΑΤΧ και του LPA επανέρχονται στα φυσιολογικά τους όρια ⁷⁷.

1.3.3. Άξονας ΑΤΧ/LPA σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις

Η ρύθμιση της έκφρασης της ΑΤΧ από τις διάφορες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξηγεί τα υψηλά επίπεδα της ΑΤΧ αλλά και του LPA στη χρόνια φλεγμονή. Χαρακτηριστικό της χρόνιας φλεγμονής αποτελεί η συνεχιζόμενη υψηλή παραγωγή του LPA και η σηματοδότηση μέσω του LPA, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της ασθένειας. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση *in vivo* μοντέλων πειραματοζώων στο εργαστήριό μας, με γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ σε συγκεκριμένους ιστούς συνέβαλε στη μελέτη της παθολογίας της αρθρίτιδας ²²⁰, της πνευμονικής ίνωσης ⁵⁴ και ηπατικών νόσων ⁷⁰.

1.3.3.1. Άξονας ΑΤΧ/LPA - Φλεγμονή λιπώδους ιστού και μεταβολικό σύνδρομο

Έχει προταθεί ότι ο άξονας ATX/LPA εμπλέκεται στην παχυσαρκία, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Στα ποντίκια περίπου το 40% της ATX παράγεται στο λιπώδη ιστό, ποσοστό που αυξάνεται με την αυξημένη κατανάλωση διατροφικού λίπους ²²¹, λόγω της αυξημένης μάζας του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία. Η έκφραση της ATX αυξάνεται στη φλεγμονή του λιπώδους ιστού ⁷⁷. Αυξημένα επίπεδα ATX έχουν βρεθεί στον ορό και στο σπλαχνικό λίπος ασθενών με διαβήτη τύπου 2 σε σχέση με μη διαβητικούς ασθενείς. Η ATX παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το ποσοστό λίπους στο σώμα και την αυξημένη αναλογία λεπτίνης/ αδιπονεκτίνης. Η λεπτίνη αυξάνει τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, σε αντίθεση με την αδιπονεκτίνη ²²²⁻²²⁵. Η αναλογία λεπτίνης/ αδιπονεκτίνης συσχετίζεται με το μεταβολικό σύνδρομο, ενώ η αυξημένη ATX στον ορό ηλικιωμένων παχύσαρκων ανθρώπων αποτέλεσε ένδειξη αντίστασης στην ινσουλίνη ^{226,227}.

Κλινικές και *in vivo* μελέτες δείχνουν την εμπλοκή του άξονα ATX/LPA στην παχυσαρκία. Ωστόσο, έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο δείκτη μάζας σώματος (BMI) και τα επίπεδα της ATX στον ορό και στο λιπώδη ιστό μη διαβητικών ατόμων. Αντίθετα, τα επίπεδα ATX/LPA ήταν αυξημένα στους διαβητικούς ασθενείς ²²⁸, γεγονός που ενδεχομένως εξηγείται από το ότι σε φυσιολογικές καταστάσεις η έκφραση της ATX αναστέλλεται από το προϊόν της, το LPA, ενώ σε μία προ-φλεγμονώδη κατάσταση όπως ο διαβήτης, η επιπρόσθετη από τις κυτταροκίνες επαγωγή της παραγωγής της ATX αλλάζει την προαναφερθείσα αναστολή ⁷⁷. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η οικογένεια κυτταροκινών IL-6 επάγει την έκφραση της ATX στα λιποκύτταρα μέσω του μονοπατιού gp130-JAK-STAT3 και ότι η αναστολή του gp130 βελτίωσε την αντίσταση στην ινσουλίνη ²²⁹.

1.3.3.2. Άξονας ΑΤΧ/LPA και νευρολογικές διαταραχές

Το LPA έχει συνεργιστική δράση με τις λιποκίνες (λεπτίνη, resistin, TNFa, IL-1β, IL-6) που απελευθερώνονται από το λευκό λιπώδη ιστό ως προς την προώθηση της φλεγμονής και την παραγωγή δραστικών ελευθέρων ριζών, οι οποίες διαταράσσουν τη διαπερατότητα του αιματεγκεφαλικού φραγμού, οδηγώντας σε ατροφία του ιππόκαμπου και άνοια ²³⁰. Επίσης, αυξημένα επίπεδα της ATX συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ήπιων γνωστικών δυσλειτουργιών, καθώς και με Αλτσχάιμερ ²³¹. Αυξημένα επίπεδα ATX και LPA έχουν αναφερθεί στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση. Η φαρμακολογική αναστολή της ATX περιόρισε την εξέλιξη της πειραματικής εγκεφαλομυελίτιδας ²⁹.

1.3.3.3. Άξονας ΑΤΧ/LPA και αρθρίτιδα

Στην αρθρίτιδα, οι αρθρικοί ινοβλάστες (SFs) ενεργοποιούνται εκκρίνοντας φλεγμονώδεις παράγοντες. Μελέτη στο εργαστήριό μας έδειξε ότι οι ενεργοποιημένοι αρθρικοί ινοβλάστες από ασθενείς με αρθρίτιδα αλλά και από πειραματικά ζωικά μοντέλα αρθρίτιδας, παράγουν σημαντικές ποσότητες ATX. Η έκφραση της ATX επάγεται από τον TNF, ενώ το LPA επάγει την ενεργοποίηση των αρθρικών ινοβλαστών σε συνέργεια με τον TNF. Επίσης, η γενετική απαλοιφή και η φαρμακολογική αναστολή της ATX από τα μεσεγχυματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των αρθρικών ινοβλαστών, έδειξε εξασθένηση της αρθρίτιδας, υποδεικνύοντας την εμπλοκή του άξονα ATX/LPA στην παθογένεια της αρθρίτιδας αλλά και τη χρόνια φλεγμονή ^{220,232-234}.

Νεότερες μελέτες συσχετίζουν τα επίπεδα της ATX στο πλάσμα και το αρθρικό υγρό ασθενών με τη σοβαρότητα της οστεοαρθρίτιδας ²³⁵. Τα υψηλά επίπεδα ATX και σηματοδότησης μέσω του LPA εμπλέκονται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, προωθώντας την υπερπλασία στην άρθρωση και την προοδευτική καταστροφή του χόνδρου ²³⁴. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ποντίκια που ακολουθούσαν διατροφή υψηλή σε λιπαρά, εμφάνιζαν πιο γρήγορα οστεοαρθρίτιδα λόγω χειρουργικής επέμβασης ή γήρατος, με τη λεπτίνη να επάγει αλλαγές στο χόνδρο, με αποτέλεσμα αύξηση της ATX και εκφυλισμό του χόνδρου από τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνασών της θεμέλιας ουσίας (MMP-13) ²³⁶.

1.3.3.4. Άξονας ΑΤΧ/LPΑ - πνευμονική ίνωση και άσθμα

Μελέτες σε ζωικά μοντέλα αλλά και σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση έδειξαν αύξηση των επιπέδων του LPA στον κυψελιδικό χώρο. Επίσης, βρέθηκε ότι η μετανάστευση των ινοβλαστών σε ένα ζωικό μοντέλο πνευμονικής ίνωσης που δημιουργείται από την έγχυση μπλεομυκίνης εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα LPA₁. Η γενετική απαλοιφή και η φαρμακολογική αναστολή του υποδοχέα LPA₁ είχαν ως αποτέλεσμα εξασθένηση της εξέλιξης της πνευμονικής ίνωσης ^{179,237}.

Μελέτη στο εργαστήριό μας έδειξε αυξημένα επίπεδα ΑΤΧ σε ινωτικούς πνεύμονες ασθενών και ποντικών, καθώς και ότι η γενετική εξάλειψη της ΑΤΧ από τα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου και τα μακροφάγα επέφερε εξασθένηση της σοβαρότητας της νόσου, υποδεικνύοντας την εμπλοκή της ΑΤΧ στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης, αλλά και επιβεβαιώνοντας την προέλευση της ΑΤΧ από τον πνεύμονα ⁵⁴. Σε μία άλλη μελέτη δείχθηκε ότι η αυξημένη ΑΤΧ στο βρογχοκυψελιδικό έκκριμα ποντικών ως αποτέλεσμα της μπλεομυκίνης είχε προέλευση από το πλάσμα και εισήλθε στον κυψελιδικό χώρο μέσω της αγγειακής διαρροής ²³⁸. Ωστόσο, είναι πιθανό η ΑΤΧ να προσδένεται μέσω ιντεγκρινών

στην επιφάνεια των κυττάρων του πνεύμονα, με αποτέλεσμα να διαφεύγει της εκκαθάρισης κατά την τοπική δράση της ^{29,239}.

Επιπρόσθετα, στο εργαστήριό μας δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε μοντέλο πνευμονικής ίνωσης σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν ή υποεκφράζουν ΑΤΧ και άρα έχουν αυξημένα ή μειωμένα, αντίστοιχα, επίπεδα ΑΤΧ στην κυκλοφορία ⁵⁴. Παρόλα αυτά, η συστεμική φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ μείωσε τα επίπεδα του LPA και επέφερε εξασθένηση της πνευμονικής ίνωσης ^{240,241}. Παρόμοια θετικά αποτελέσματα ως προς τον περιορισμό της ανάπτυξης της πνευμονική ίνωσης είχε η χορήγηση αναστολέα του υποδοχέα LPA₁, αλλά και η καθολική γενετική απαλοιφή του LPA₁ ή του LPA₂ ^{242,243}. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μοντέλο πνευμονικής ίνωσης, το LPA μέσω του LPA₁ ή του LPA₂ επάγει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων ²⁴⁴, τα οποία βρέθηκε ότι εκφράζουν TNF, ο οποίος είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης (Εικόνα 1.16) ²⁴⁵.



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού ΑΤΧ/LPA στην πνευμονική ίνωση ²⁹.

Μία πιο πρόσφατη έρευνα συνέδεσε την αυξημένη παραγωγή της ΑΤΧ με την έκφραση της β-κατενίνης και την κοινή τους ρύθμιση από το μεταγραφικό παράγοντα NFAT1 (nuclear factor of activated T cells). Η γενετική ή φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ ή του LPA₁ περιόρισε την ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης μέσω μείωσης της έκφρασης της ενεργής β-κατενίνης και της αποφωσφορυλίωσης του παράγοντα NFAT1 ²⁴⁶.

Μελέτη στο εργαστήριό μας έδειξε ότι η ΑΤΧ και το LPA από μόνα τους δεν είναι ικανά να επάγουν πνευμονική βλάβη *per se*. Συγκεκριμένα, η διατήρηση της ομοιόστασης στον πνεύμονα δεν απαιτεί μεγάλα επίπεδα LPA. Από την άλλη, η υπερέκφραση της ΑΤΧ από το βρογχικό επιθήλιο ή από το ήπαρ δεν επιφέρει κάποια επίπτωση στον πνεύμονα ²⁴⁷.

Πέρα από την πνευμονική ίνωση, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της ΑΤΧ έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια του άσθματος, στο οποίο πρωτίστως εμπλέκεται ο υποδοχέας LPA₂. Αλλεργική πρόκληση ασθενών με άσθμα επέφερε αύξηση των επιπέδων ATX και LPA στο BALF ²⁴⁸. Τελευταία, ελέγχονται τα πολυακόρεστα C22:5-LPA και C22:6-LPA ως πιθανοί βιοδείκτες για τη σοβαρότητα της φλεγμονής των αεραγωγών λόγω αλλεργίας στο άσθμα ^{249,250}.

1.3.3.5. Άξονας ΑΤΧ/LPA και ηπατικές ασθένειες

Η προβληματική σηματοδότηση μέσω LPA εμπλέκεται σε μία πληθώρα ηπατικών ασθενειών. Σε μία από αυτές, τη χολική ατρησία, η σοβαρότητα της νόσου συσχετίζεται με την ηπατική ακαμψία, τα αυξημένα επίπεδα της ATX στον ορό και τη μειωμένη μεθυλίωση του προαγωγέα της ATX ²⁵¹. Η ίνωση στο ήπαρ χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση της ATX από τα ηπατοκύτταρα και αυξημένη έκφραση του υποδοχέα LPA₁ από τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα ^{252,253}. Επιπλέον, μελέτη στο εργαστήριό μας έδειξε αυξημένα επίπεδα ATX και του υποδοχέα LPA₆ σε ασθενείς με χρόνιες ηπατοπάθειες ανεξαρτήτου πηγής προέλευσης (ηπατική, αλκοολική ή λιπώδης)⁷⁰. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα ATX στον ορό μπορούν να χρησιμοποιούν ως πιθανός βιοδείκτης για τη μη-αλκοολική λιπώδη ηπατική νόσο (NAFLD) σε παχύσαρκες μη διαβητικές γυναίκες ²⁵⁴, αλλά και ως διαγνωστικός δείκτης για την ηπατική ίνωση ²⁵³.

Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την ΑΤΧ με το χολοστατικό κνησμό και την ηπατική βλάβη. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα ΑΤΧ έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με πρωτοπαθή χολική χολαγγειίτιδα, πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα και κίρρωση και μάλιστα, η αυξημένη ΑΤΧ συνδέεται αντίστροφα με το προσδόκιμο ζωής στους ασθενείς αυτούς, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα για ανάγκη μεταμόσχευσης ήπατος ²⁵⁵.

Η χρόνια ιογενής ηπατίτιδα η οποία εξελίσσεται σε κίρρωση είναι υπεύθυνη για το 70% των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, τα οποία αντιστοιχούν στο 90% των καρκίνων του ήπατος. Τα επίπεδα της ΑΤΧ στον ορό αποτελούν σημαντικό δείκτη πρόγνωσης της ίνωσης σε ασθενείς με χρόνιες ηπατίτιδες Β και C, καθώς και τον πιο αξιόπιστο δείκτη για τον προσδιορισμό των σταδίων της ίνωσης. Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης, η λοίμωξη από ηπατίτιδα C σταθεροποιεί παράγοντες επαγόμενους από υποξία, οι οποίοι οδηγούν στην αύξηση της έκφρασης της ΑΤΧ από τα ηπατοκύτταρα. Ο κύκλος αυτός ενισχύεται περαιτέρω από τη σηματοδότηση του LPA μέσω της PI3K, η οποία σταθεροποιεί τον HIF- 1α ²⁵⁶. Κατά συνέπεια, η ΑΤΧ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός και φαμακευτικός στόχος στην προσπάθεια αναστολής της εξέλιξης της ιογενούς ηπατίτιδας σε καρκίνο ²⁵⁷.

1.3.3.6. Το σημείο παραγωγής της ΑΤΧ στη σηματοδότηση της φλεγμονής

Ένα από τα ζητήματα που έχουν τεθεί σχετικά με την κατανόηση του παθοφυσιολογικού ρόλου της ATX είναι εάν η ρύθμιση της σηματοδότησης του LPA γίνεται από την ATX που παράγεται τοπικά ή από την ολική ATX της κυκλοφορίας. Μελέτες έδειξαν ότι η ATX προσδένεται τοπικά στις ιντεγκρίνες στην κυτταρική επιφάνεια ⁴¹, με αποτέλεσμα το LPA να δρα στους γειτονικούς υποδοχείς του LPA ⁴². Το γεγονός ότι η παραγωγή της ATX σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (λιποκύτταρα, ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα, παρέγχυμα πνεύμονα) εμπλέκεται στην εμφάνιση παθολογίας σε διάφορα όργανα, ενισχύει την άποψη ότι η τοπική παραγωγή της ATX είναι υπεύθυνη για τη μεταγωγή σήματος στη φλεγμονή και άρα, την επιδιόρθωση του ιστού τοπικά στο σημείο του τραύματος. Ωστόσο, η ATX είναι δραστική και όταν δεν είναι προσδεδεμένη στις ιντεγκρίνες ²⁵⁸, γεγονός που ενδεχομένως εξηγεί τα αυξημένα επίπεδα LPA στην κυκλοφορία σε διάφορες ασθένειες ¹⁵.

1.3.3.7. Άξονας ΑΤΧ/LPΑ στην εμφάνιση κι εξέλιξη του καρκίνου

Ο άξονας μεταγωγής σήματος ΑΤΧ/LPA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της χρόνιας φλεγμονής ως προς τη δημιουργία μικροπεριβάλλοντος του όγκου, το οποίο προωθεί την καρκινική ανάπτυξη, την αντίσταση στο ανοσοποιητικό, τη μετάσταση και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Τα δύο χαρακτηριστικά που μπορούν να αποδοθούν πρακτικά σε όλους τους καρκίνους είναι η γενωμική αστάθεια και μετάλλαξη από τη μία και η φλεγμονή που οδηγεί στον όγκο από την άλλη ^{15,259}.

Έχει βρεθεί ότι όλες οι νεοπλασματικές βλάβες αλλά και οι μη νεοπλασματικοί όγκοι περιέχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (λευκά αιμοσφαίρια, μακροφάγα) και προφλεγμονώδεις ιντερλευκίνες ²⁶⁰. Το ανοσοποιητικό τουλάχιστον στην αρχή, προσπαθεί να καταστρέψει τα προ-κακοήθη και καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, εάν η φλεγμονή παραμείνει και το τραύμα δε θεραπευθεί, η σηματοδότηση της φλεγμονής χρησιμοποιείται από τα νεοπλασματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ο καρκίνος. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.17, η χρόνια φλεγμονή που τελικά οδηγεί σε καρκίνο αποτελεί το εξωγενές μονοπάτι. Στη χρόνια φλεγμονή, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου και άλλα μόρια οδηγούν σε γενετικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που αποτελεί το ενδογενές μονοπάτι.



Εικόνα 1.17: Σχηματική αναπαράσταση της έναρξης του καρκίνου και του ρόλου του άξονα ATX/LPA ¹⁵.

Τα δύο μονοπάτια σε συνδυασμό, οδηγούν στην αύξηση των προφλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων NF-κB (nuclear factor-κB), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) και HIF1α (hypoxia-inducible factor 1α) στα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 1.18), επάγοντας την κυτταρική επιβίωση και την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών από τα νεοπλασματικά κύτταρα, με περαιτέρω αποτέλεσμα την εξάπλωση στα κύτταρα, παραγωγή περισσότερων γειτονικά στρωματικά тŋv φλενμονωδών διαμεσολαβητών, την ενεργοποίηση και προσέλκυση των λεμφοκυττάρων. Η αυξημένη μεταγωγή σήματος περιλαμβάνει την αύξηση των επιπέδων της ΑΤΧ και του LPA και την ταυτόχρονη μείωση της δραστικότητας των φωσφατασών των φωσφολιπιδίων (LPPs). Ο παραπάνω φαύλος κύκλος έχει ως συνέπεια την έναρξη κι εξέλιξη του καρκίνου και παρομοιάζεται ως «τραύμα χωρίς επούλωση» ^{15,261,119}.

Η σηματοδότηση του άξονα ΑΤΧ/LPA όχι μόνο επάγει τον πολλαπλασιασμό, την επιθετικότητα και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων ^{83,262}, αλλά επιπλέον με τη φλεγμονώδη ρύθμιση που διατηρεί (Εικόνα 1.18), συμβάλλει στη διαφοροποίηση των CAFs, στη διείσδυση λευκοκυττάρων, στην αγγειογένεση και στη συντήρηση των βλαστοκυττάρων, διαδικασίες απαραίτητες για το μικροπεριβάλλον του όγκου (Εικόνα 1.19) ¹⁰⁴.

Στη χρόνια φλεγμονή, η αύξηση της παραγωγής της ΑΤΧ στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και στα παρακείμενα στρωματικά κύτταρα, συνήθως συνοδεύεται από υπερέκφραση των υποδοχέων του LPA, ιδίως των υποδοχέων LPA₁₋₃ και μείωση της δραστικότητας των φωσφατασών των φωσφολιπιδίων LPP1/3. Η συνεχής μεταγωγή σήματος μέσω LPA αυξάνει την αγγειογένεση και την περαιτέρω ανάπτυξη του καρκίνου (Εικόνα 1.19). Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αποτελούν την κύρια πηγή LPA στο μικροπεριβάλλον του όγκου ²⁶³⁻²⁶⁵.



Εικόνα 1.18: Ο άξονας ΑΤΧ/LPA επάγει τη φλεγμονή που οδηγεί στο σχηματισμό και την εξέλιξη του όγκου. Το LPA μέσω των υποδοχέων του και τη σύζευξη με τις εκάστοτε G πρωτεΐνες δρα μέσω διαφορετικών σηματοδοτικων μονοπατιών, ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες (NFκB, HIF-1α, ATF) με αποτέλεσμα τη διαρκή παραγωγή φλεγμονωδών διαμεσολαβητών (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα)¹⁰⁴.

1.3.3.7.1. Μηχανισμοί υπερέκφρασης της ΑΤΧ στον καρκίνο

Στους καρκίνους στους οποίους αυξάνεται η παραγωγή της ATX, οι γενετικές αλλαγές αφορούν στην αύξηση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου που κωδικοποιεί την ATX ³². Σε άλλες περιπτώσεις, η ATX υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα ως απάντηση στις βλάβες στο δίκλωνο DNA μετά από οξειδωτικό στρες, γεγονός που εξαρτάται από την ενεργοποίηση του NLRP3 (Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) φλεγμονοσώματος και τη μετάλλαξη στην ATM κινάση σερίνης/θρεονίνης. Το φλεγμονόσωμα είναι ολιγομερές ενός συμπλόκου πρωτεϊνών, υπεύθυνο για την έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης, το οποίο επάγει την έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β και IL-8 ²⁶⁶. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο της ρύθμισης της ATX, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη που προσδένει το RNA HuR (human antigen R) σταθεροποιεί το mRNA της ATX σε κύτταρα μελανώματος και έτσι, αυξάνει την

παραγωγή της ΑΤΧ ⁶⁸. Οι δύο παραπάνω μηχανισμοί ενδεχομένως εξηγούν την αυξημένη αυτοκρινή παραγωγή της ΑΤΧ σε καρκίνους ¹⁵.



Εικόνα 1.19: ΑΤΧ/LPA σηματοδότηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η ΑΤΧ απελευθερώνεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου από τα παρακείμενα του όγκου κύτταρα (λιποκύτταρα, Β λεμφοκύτταρα), αλλά και από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα και τα καρκινικά βλαστοκύτταρα. Το παραγόμενο LPA επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και βλαστοκυττάρων, τη διαφοροποίηση των CAFs, την αγγειογένεση και αναστέλλει την κυτταροτοξική απόκριση των CD8 Τ λεμφοκυττάρων ¹⁰⁴.

Επιπρόσθετα, έχει αποκαλυφθεί ένα μοντέλο παρακρινούς ρύθμισης της παραγωγής της ATX σε καρκίνο μαστού. Σύμφωνα με αυτό, η έκκριση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών από το μαστικό όγκο επάγει την έκφραση της ATX σε διπλανούς ιστούς του μαστού, με αποτέλεσμα την αύξηση του LPA στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Το παραγόμενο LPA αυξάνει περισσότερο την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και COX-2, οι οποίες τροφοδοτούν την επαγωγή της παραγωγής της ATX. Παρομοίως, η προερχόμενη από τον όγκο φλεγμονή στο μαστικό λιπώδη ιστό αυξάνει την προσέλκυση μακροφάγων, την παραγωγή IL-8, IL-6, TNFa, μεταγραφικών παραγόντων (VEGF, G-CSF) και κατά συνέπεια, την επέκταση της φλεγμονής και την περαιτέρω αύξηση της ATX ^{195,267,268}.

1.3.3.7.2. Σηματοδότηση μέσω LPA στην εξέλιξη του καρκίνου

Η μεταγωγή σήματος μέσω LPA εμπλέκεται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Οι ασθενείς με HCC και αυξημένα επίπεδα ATX παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες θανάτου ²⁶⁹. Τα αυξημένα επίπεδα των υποδοχέων LPA_{2/6} υποδεικνύουν αυξημένη κακοήθεια ²⁷⁰. Στο εργαστήριό μας, έχει βρεθεί ότι η γενετική απαλοιφή της ATX συγκεκριμένα από τα ηπατοκύτταρα ποντικών είχε προστατευτική δράση έναντι στο HCC και την ηπατική ίνωση συγκριτικά με την ομάδα ποντικών ελέγχου ⁷⁰. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) θα αποτελεί τον κύρια αιτία δημιουργίας HCC μέχρι το 2030 λόγω των συνεχώς αυξανόμενων ποσοστών παχυσαρκίας ²⁷¹. Δεδομένου του γνωστού ρόλου της σηματοδότησης του άξονα ATX/LPA με αναστολείς, μπορεί να προστατεύσει από το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ^{15,272}.

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την πέμπτη κατά σειρά αιτία θανάτου στους καρκίνους στο δυτικό κόσμο. Έχει βρεθεί σημαντική αύξηση της δραστικότητας της ΑΤΧ στον ορό ασθενών με καρκίνο στο πάγκρεας. Επιπλέον, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα λυσοφωσφατιδυλοσερίνης και λυσοφωσφατιδυλογλυκερόλης στο γαστρικό ασκίτη των παραπάνω ασθενών, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή άλλων λυσοφωσφολιπιδίων εκτός του LPA στην παθογένεση του καρκίνου, άμεση ή έμμεση μέσω μετατροπής τους σε LPA ^{273,274}. Έχει περιγραφεί σε καρκίνο παγκρέατος η σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων LPA₁ και LPA₃, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων μέσω έκκρισης των μεταλλοπρωτεϊνασών MMP2 και συνακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης FAK και της πρωτεΐνης paxillin ²⁷⁵.

Στον καρκίνο των ωοθηκών, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα παράγουν περίσσεια ATX κι εκφράζουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα LPA₁ μέσω του άξονα σηματοδότησης ATX-LPA-LPA₁-Akt1²⁷⁶, ενώ ο υποδοχέας LPA₁ εμπλέκεται στη μετάσταση του καρκίνου των ωοθηκών ²⁷⁷. Η σηματοδότηση μέσω ATX/LPA έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει ρόλο και στον καρκίνο του ενδομητρίου, με την εμπλοκή των υποδοχέων LPA₁ και LPA₂ στον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση στους καρκινικούς ιστούς, παρουσιάζοντας θετική συσχέτιση των επιπέδων ATX και υποδοχέων του LPA με το στάδιο του καρκίνου ²⁷⁸.

1.3.3.7.3. Ο ρόλος των LPPs στον καρκίνο

Μελέτες *in vivo* δείχνουν ότι η αύξηση της έκφρασης των LPP1/3 στα καρκινικά κύτταρα περιορίζει την εξάπλωση του όγκου ²⁷⁹. Συγκεκριμένα, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LPP1 (*PLPP1*) αποτελούν δείκτη πρόγνωσης της χαμηλής επιβίωσης που σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού ²⁸⁰. Σε αντίθεση με τις LPP1/3, η LPP2 επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα στην ανάπτυξη του όγκου και παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της LPP2 στον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα και των ωοθηκών ¹³⁹. Συνοπτικά, η αύξηση της έκφρασης των LPP1/3 και η μείωση της έκφρασης της LPP2 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποτελέσουν νέους στόχους στη θεραπεία ενάντια στον καρκίνο ¹⁵.

1.4. ΑΤΧ και υποδοχείς του LPA ως φαρμακευτικοί στόχοι

Δεδομένης της εμπλοκής του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, η ΑΤΧ και οι υποδοχείς του LPA μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι για τη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου, της χρόνιας φλεγμονής, ασθενειών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, των αυτοάνοσων νοσημάτων αλλά και του μεταβολικού συνδρόμου ²⁸¹⁻²⁸³. Για το λόγο αυτό, μέχρι στιγμής, μεγάλη προσπάθεια έχει καταβληθεί για την ανάπτυξη αναστολέων της ΑΤΧ

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής της ΑΤΧ επέτρεψε το σχεδιασμό φαρμάκων προς την κατεύθυνση της αναστολής της ΑΤΧ ^{41,42,290,291}. Ο πιο συνηθισμένος έλεγχος της αποτελεσματικότητας των ανταγωνιστών των υποδοχέων του LPA είναι η μέτρηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ στα υπό έλεγχο κύτταρα, μιας και οι αγωνιστές των LPAR αυξάνουν την κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ 164.

1.4.1. Αναστολείς της ΑΤΧ

Η παρεμπόδιση της δραστικότητας της ΑΤΧ αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης της χρόνιας φλεγμονής βάσει πρόσφατων μελετών. Η σημασία της αναστολής της ΑΤΧ καταδεικνύεται όχι μόνο από τα φαρμακολογικά επιστημονικά δεδομένα αλλά και από το ελπιδοφόρο γεγονός ότι ο αναστολέας της ΑΤΧ GLPG1690 βρίσκεται ήδη σε επίπεδο 2β κλινικών δοκιμών σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ²⁸³.

Η δημιουργία των πρώτων αναστολέων της ΑΤΧ είχε βασιστεί σε ένα εύρημα σύμφωνα με το οποίο το LPA και το S1P μπορούσαν να αναστείλουν την ΑΤΧ σε χαμηλές συγκεντρώσεις LPC, νουκλεοτιδίων ή τεχνητών υποστρωμάτων. Ωστόσο, αυτή η αναστολή της ΑΤΧ από το LPA δε συμβαίνει σε φυσιολογικές συνθήκες ⁵. Ως αποτέλεσμα, τα ανάλογα του LPA ως αναστολείς της ΑΤΧ, καθαρίζονται ταχύτατα από την κυκλοφορία χωρίς να μειώνουν τα επίπεδα του LPA ^{76,140}.

Η νεότερη γενιά αναστολέων της ΑΤΧ είναι ενώσεις που βασίζονται στη θειαζολιδινοδιόνη ¹⁴¹. Η δραστικότητα των αναστολέων της ΑΤΧ βρέθηκε ότι αυξάνεται με την προσθήκη βορονικού οξέος, το οποίο στοχεύει το κατάλοιπο της θρεονίνης στην καταλυτική περιοχή της ΑΤΧ ²⁹². Ο αναστολέας της ΑΤΧ ΗΑ155 σχηματίζει αναστρέψιμο ομοιοπολικό δεσμό με την ΑΤΧ, ενώ ο αναστολέας PF-8380 μειώνει επαρκώς τα επίπεδα του LPA στο πλάσμα αλλά και στα σημεία της φλεγμονής ²⁹³. Τα χολικά οξέα δρουν ως μησυναγωνιστικοί αναστολείς της ΑΤΧ, υποδεικνύοντας ότι φάρμακα που βασίζονται σε στεροειδή μπορεί να έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι στην ΑΤΧ ²⁹⁴.

Μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι η παρεμπόδιση της ΑΤΧ από αναστολείς είχε ως αποτέλεσμα περιορισμό της ίνωσης σε διαφορετικά ινωτικά μοντέλα, όπως για παράδειγμα στο δέρμα ²⁹⁵, στο ήπαρ ^{272,296} και στον πνεύμονα ^{15,240,297}. Επίσης, ο αναστολέας της ΑΤΧ Compound 1 μείωσε τον πόνο στις αρθρώσεις σε μοντέλα τρωκτικών ²⁹⁸ και είχε αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές ιδιότητες σε μοντέλα πολλαπλής σκλήρυνσης και φλεμονώδους νόσου του εντέρου ²⁹⁹. Τέλος, ο GWJ-A-23 είχε θετική επίδραση στο άσθμα και την πνευμονική ίνωση ^{54,250}.

Ο αναστολέας της ATX ONO-8430506 ελάττωσε τη μετάσταση και την ανάπτυξη του όγκου κατά 70%, μειώνοντας την έκφραση μέχρι και 20 φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, οι οποίες ωθούν την ογκογένεση άμεσα αλλά και έμμεσα μέσω της επαγωγής της έκκρισης της ATX και άρα της αύξησης του LPA ¹⁵. Πρόσφατα οι αναστολείς της ATX compound 3a, 3b και 14 μείωσαν τη μετάσταση σε κύτταρα μελανώματος και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία σε βλαστοκύτταρα καρκίνου του μαστού ³⁰⁰.

1.4.2. Αναστολείς της σηματοδότησης του LPA

Το LPA προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τις αντικαρκινικές θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των tamoxifen, paclitaxel, cisplatin και της ιονίζουσας ακτινοβολίας, μέσω της αύξησης του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα Nrf-2 (Nuclear factor 2), ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες μεταφορείς που παρέχουν ανθεκτικότητα σε φάρμακα (ABCC1, ABCG2, ABCC2, ABCC3), την αλδεϋδική αφυδρογονάση 1 (ALDH1) και τη διατήρηση των βλαστοκυττάρων ³⁰¹⁻³⁰⁴ και επάγουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA ³⁰⁵.

Οι αναστολείς της σηματοδότησης του LPA αναμένεται να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας μπλοκάροντας την LPA-διαμεσολαβούμενη φλεγμονή που επάγει τον καρκινικό όγκο. Πιο συγκεκριμένα, περιορίζοντας τη δεσμοπλαστική αντίδραση, η οποία παρεμποδίζει την εναπόθεση του φαρμάκου στον όγκο μιας και συμπιέζονται τα αγγεία, αλλά επίσης μειώνοντας τη μεγάλη διαπερατότητα των αγγείων ³⁰⁶.

Η θεραπεία με ακτινοβολία στα καρκινικά κύτταρα του μαστού προκαλεί φλεγμονή στα κύτταρα του λιπώδους ιστού του μαστού, με συνακόλουθη αύξηση της έκφρασης της ΑΤΧ και της σηματοδότησης μέσω LPA1 και LPA2, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της επιβίωσης των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων και άρα, στη μείωση της αποτελεσματικότητας στην εφαρμογή της ακτινοθεραπείας ³⁰⁷.

Μία από τις παρενέργειες της ακτινοβολίας είναι η επαγόμενη ίνωση. Η αναστολή των υποδοχέων LPA_{1/3} με τον ανταγωνιστή VPC12249 είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της πνευμονικής ίνωσης που ακολούθησε την εφαρμογή ακτινοβολίας ³⁰⁸. Συνεπώς, οι αναστολείς του LPA ενδεχομένως να μπορούν να μειώσουν τις ανεπιθύμητες παρενέργειες της ακτινοθεραπείας ^{15,309}.

Ο αναστολέας των υποδοχέων LPA_{1/3} SAR100842 βελτίωσε τη συστεμική σκλήρυνση ³¹⁰, οι αναστολείς του LPA₁ BMS-986202 και BMS-986020 είχαν θετικά αποτελέσματα στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (BMS 2011, BMS 2014), όπως και ο αναστολέας του LPA₁ AM966 και ο ανταγωνιστής των LPA_{1/3} VPC12249 ²⁴³. Ο ανταγωνιστής όλων των υποδοχέων του LPA HLZ-56 και ο αναστολέας του LPA₁ AM095 μείωσαν την ίνωση σε νεφρούς και δέρμα σε ζωικά μοντέλα ^{311,312}, ο ανταγωνιστής των LPA_{1/3} Ki16425 και ο ανταγωνιστής όλων των υποδοχέων του LPA R και της ATX BrP-LPA μείωσαν το κλινικό σκορ της αρθρίτιδας σε ζωικά μοντέλα ^{233,313}. Ο Ki16425 βελτίωσε την επαγόμενη από το LPA μετα-αιμορραγική υδροκεφαλία σε μοντέλο νεογνών ποντικών ³¹⁴. Η εταιρεία Bristol-Myers Squibb έχει χρησιμοποιήσει σε πατέντα αναστολείς των LPAR για βλάβη στο νωτιαίο μυελό και το νευροπαθητικό πόνο ³¹⁵.

Αναφορικά με τη χρήση αναστολέων των LPAR για την αντιμετώπιση του καρκίνου έχει δειχθεί σε *in vitro* μελέτες ότι ο BrP-LPA και οι ανταγωνιστές των LPA_{1/3} Ki16425, Ki16198 και Debio 0719 εξασθένησαν την κυτταρική επιθετικότητα του καρκίνου και αύξησαν την κυτταρική ευαισθησία στην ακτινοβολία μέσω αναστολής της σηματοδότησης Rho/ROCK, MEK/ERK, και μείωσης των μεταλλοπρωτεϊνασών της θεμέλιας ουσίας ³¹⁶⁻³¹⁹. Επίσης, ο αναστολέας του LPA₂ compound 35 μείωσε τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω εξασθένησης της φωσφορυλίωσης της Erk ³²⁰.

Ο μη λιπιδιακός αναστολέας PF-8380 προσδένεται απευθείας στην ATX παρεμποδίζοντας τη δραστικότητα λυσοφωσφολιπάσης D. Έχει IC₅₀ 2.8 nM για την απομονωμένη ATX και IC₅₀ 101 nM *in vivo* ^{293,321,322}. Ο αναστολέας BrP-LPA αναστέλλει την ATX και τους υποδοχείς LPA₁₋₅ ^{233,323,324}.

1.4.2.1. Αναστολείς της σηματοδότησης του LPA – Κλινικές δοκιμές

Οι αναστολείς της σηματοδότησης μέσω LPA που βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές και αφορούν σε ασθένειες εκτός του καρκίνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2^{241,309,325-327,310}.

Compound	Mechanism of Action	Clinical Stage	Clinical Indication	Company	Clinicaltrials.gov ID
GLPG1690	ATX direct inhibition	Phase 2	IPF	Galapagos NV (Mechelen, Belgium)	NCT02738801
BMS-986020	LPA ₁ antagonist	Phase 2	IPF	Bristol-Myers Squibb (New York, NY, USA)	NCT01766817
SAR100842	LPA1/3 antagonist	Phase 2	Systemic Sclerosis	Sanofi (Paris, France)	NCT01651143
Lpathomab TM	LPA monoclonal antibody	Phase 1	—	Lpath, Inc. (San Diego, CA, USA)	NCT02341508

Πίνακας 1.2: Στόχοι του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές ¹⁵.

Β΄ Μέρος. Ο ρόλος της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή

1.5. Σήψη: Εισαγωγή – Επιδημιολογικά στοιχεία

Η σήψη αποτελεί ένα από τα κυριότερα προβλήματα στον τομέα της υγείας παγκοσμίως, όχι μόνο λόγω του υψηλού κόστους για την αντιμετώπισή της, αλλά κυρίως λόγω της αυξημένης θνησιμότητας και νοσηρότητας που μπορεί να επιφέρει. Η σήψη αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου στις μονάδες εντατικής θεραπείας 328. Η θνητότητα λόγω σήψης κυμαίνεται σε πολύ υψηλά ποσοστά, της τάξης του 25-30%, ενώ αγγίζει το 40-50% στις περιπτώσεις σηπτικού σοκ ³²⁹. Υπολογίζεται ότι 30 εκατομμύρια περιπτώσεις σήψης εμφανίζονται κάθε χρόνο παγκοσμίως με 6 εκατομμύρια θανάτους ³³⁰. Οι θάνατοι στα νοσοκομεία λόγω σήψης και επιπλοκών που σχετίζονται με τη σήψη είναι περισσότεροι από εκείνους λόγω καρκίνου του μαστού και τους παχέος εντέρου αθροιστικά ³³¹. Αξίζει να αναφερθεί ότι ασθενείς που επιβίωσαν αρχικά της σήψης, συχνά υποκύπτουν σε μεταγενέστερες επιπλοκές, όπως είναι η αδυναμία τους να επιστρέψουν στην πρότερη λειτουργική τους κατάσταση (chronic critical illness) και η πολυ-οργανική βλάβη ³³². Η σήψη μπορεί να συμβεί στον οποιονδήποτε ως αποτέλεσμα μίας λοίμωξης και να επηρεάσει οποιοδήποτε μέρος του σώματος προκαλώντας καταστροφή των ιστών και ενός ή περισσοτέρων οργάνων. Αιτιολογικά, οποιαδήποτε «αδυναμία» του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή τον καθιστά περισσότερο ευάλωτο στην ανάπτυξη της σήψης, όπως για παράδειγμα σε βρέφη με ανώριμο ανοσοποιητικό, ηλικιωμένους, ασθενείς με κακοήθειες, υποθερμία, AIDS ή όσους λαμβάνουν θεραπεία με κορτικοστεροειδή ³³³.

1.5.1. Σήψη – Ορισμοί

Τις τελευταίες δεκαετίες διάφορες ορολογίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της σήψης, μεταξύ των οποίων σήψη, σοβαρή σήψη, σηπτικό σύνδρομο, σηψαιμία. Αρχικά η σήψη, το 1991, χαρακτηρίστηκε ως το σύνδρομο συστεμικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS: systemic inflammatory response syndrome) του ξενιστή απέναντι σε λοίμωξη. Για τη διάγνωση του SIRS έπρεπε να υπάρχουν τουλάχιστον 2 από τις παρακάτω παραμέτρους ³³⁴:

- Θερμοκρασία σώματος >38°C ή <36°C (πυρετός ή υποθερμία)
- Ταχυπαλμία με καρδιακό ρυθμό >90/min
- Ταχύπνοια με αριθμό αναπνοών >20/min ή υποκαπνία με Pco2<32mmHg
- Λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία, με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων >12.000/μΙ ή
 <4.000/μΙ ή >10% βλάστες στο περιφερικό αίμα

Η παρουσία SIRS σε συνδυασμό με ανεπάρκεια ενός ή περισσοτέρων οργάνων αποτελούσε τη σοβαρή σήψη. Η σοβαρή σήψη σε συνδυασμό με καταπληξία, δηλαδή εμμένουσα υπόταση λόγω σήψης, παρά τη χορήγηση υγρών χαρακτήριζε το σηπτικό σοκ ³³⁵. Ωστόσο, ο παραπάνω ορισμός της σήψης αν και έδειχνε φλεγμονή ως απάντηση σε μια λοίμωξη, δεν περιέγραφε μια απειλητική για τη ζωή κατάσταση, εγείροντας ερωτήματα σχετικά με την εγκυρότητά του ³³⁶.

Η οργανική ανεπάρκεια αφορά σε δυσλειτουργία του καρδιαγγειακού, αναπνευστικού, νευρολογικού, ηπατικού, αιματολογικού ή άλλου συστήματος ³³⁷. Υπάρχουν διάφορα συστήματα κατηγοριοποίησης της σοβαρότητας της οργανικής βλάβης, με κυριότερο την κλίμακα SOFA (sequencial [sepsis-related] organ failure assessment, Πίνακας 1.3). Όσο αυξάνεται η τιμή SOFA αυξάνεται και η πιθανότητα θνητότητας ³³⁸. Η κλίμακα SOFA χρησιμοποιείται ως μέσο για την κλινική αναγνώριση ενός σηπτικού ασθενούς. Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση διαφορετικών ορισμών για το σηπτικό σοκ περιέπλεκε περισσότερο την κατάσταση, λόγω σημαντικής ετερογένειας στην αναφερόμενη θνητότητα. Η ετερογένεια προέκυπτε από τις διαφορές στις κλινικές μεταβλητές (όριο αρτηριακής πίεσης, επίπεδα γαλακτικού οξέος στην κυκλοφορία, όγκος υγρού αναβίωσης, χρήση αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, ταυτόχρονη οργανική δυσλειτουργία), την πηγή των δεδομένων κ.ά. ³³⁶.

Κατά συνέπεια, η επικαιροποίηση των ορισμών και των κλινικών κριτηρίων για τη σήψη και το σηπτικό σοκ ήταν επιτακτική ανάγκη, με στόχο την έγκαιρη διάγνωση της σήψης. Για το σκοπό αυτό, δημοσιεύθηκε η 3^η Διεθνής Συμφωνία Ορισμών για τη σήψη και το σηπτικό σοκ, γνωστή ως Σήψη-3, το 2016 από μία ομάδα αναγνωρισμένων ειδικών στο συγκεκριμένο αντικείμενο ³³⁶, αξιολογώντας δεδομένα από ανεξάρτητες βάσεις δεδομένων.

Πίνακας 1.3: Κλίμακα κλινικο-εργαστηριακής αξιολόγησης SOFA (Sequential [sepsis-related] orga	n
failure assessment score) 336,339.	

	Score				
System	0	1	2	3	4
Respiration		11.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1			
Pao ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /µL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (µmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (µmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

FIO₂: τμήμα εισπνεόμενου οξυγόνου, PaO₂: μερική πίεση οξυγόνου, MAP: μέση αρτηριακή πίεση. b: δόσεις κατεχολαμίνης σε μg/kg/min για τουλάχιστον 1 ώρα, c: σκορ κατά Glasgow coma κλίμακα (3-15), όπου το 15 δείχνει καλύτερη νευρολογική λειτουργία.

Σύμφωνα με τους ανανεωμένους ορισμούς της Σήψης-3:

- Η σήψη είναι μία απειλητική για τη ζωή δυσλειτουργία οργάνων ως αποτέλεσμα απορρυθμισμένης απόκρισης του ξενιστή σε μία λοίμωξη.
- Η δυσλειτουργία οργάνων συμβατή με σήψη αναγνωρίζεται ως μία απότομη μεταβολή στην κλίμακα SOFA ≥ 2 ως αποτέλεσμα της μόλυνσης. Η αρχική τιμή SOFA σε ασθενείς χωρίς κάποια γνωστή προϋπάρχουσα οργανική βλάβη, θεωρείται 0. Τιμή της κλίμακας SOFA πάνω από 2 δείχνει αυξημένο κίνδυνο θνητότητας της τάξης του 10% σε ασθενείς νοσηλευόμενους σε νοσοκομείο με γνωστή λοίμωξη.
- Η σήψη είναι μία απειλητική για τη ζωή κατάσταση που προκύπτει όταν η άμυνα του οργανισμού ξενιστή έναντι σε μία λοίμωξη στρέφεται εναντίον των δικών του ιστών και οργάνων.
- Το σηπτικό σοκ είναι το υποσύνολο της σήψης όπου οι υποκείμενες κυκλοφορικές, κυτταρικές και μεταβολικές διαταραχές είναι τόσο έκδηλες που αυξάνουν σημαντικά τη θνητότητα.
- Η ανάγκη άμεσης αναγνώρισης των σηπτικών ασθενών, οι οποίοι είναι πιθανό να παραμείνουν στη μονάδα εντατικής θεραπείας για μεγάλο χρονικό διάστημα ή να πεθάνουν στο νοσοκομείο, οδήγησε στη θέσπιση απλούστερης κλινικής κλίμακας που ονομάστηκε qSOFA (quick SOFA) και απαιτεί 2 από τα εξής 3 κριτήρια:

Συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 100 mm Hg, αριθμό αναπνοών ≥ 22/min, αλλαγή στην ψυχική/ διανοητική κατάσταση.

Οι ασθενείς με σηπτικό σοκ μπορούν να αναγνωριστούν από τη συνεχή υπόταση και την ανάγκη χορήγησης αγγειοσυσταλτικών παραγόντων για να διατηρηθεί η μέση αρτηριακή τους πίεση σε επίπεδα ≥ 65 mm Hg και τη διατήρηση του γαλακτικού οξέος στον ορό σε επίπεδα >2 mmol/L (18 mg/dL) παρά τη χορήγηση υγρού αναβίωσης. Με βάση τα κριτήρια αυτά, η ενδονοσοκομειακή θνητότητα κυμαίνεται στο 40% ³³⁶.

Είναι ευνόητο ότι οι παραπάνω ορισμοί και τα κλινικά κριτήρια για τη σήψη πρέπει να υπόκεινται σε μία διαρκή αξιολόγηση και προσπάθεια βελτίωσης ως διαγνωστικά εργαλεία προς όφελος του ασθενούς. Η Ελληνική Ομάδα Μελέτης της Σήψης έκανε μία προσπάθεια αναδρομικής ανάλυσης των ορισμών και των κριτηρίων της Σήψης-3 ως προς την έγκαιρη εκτίμηση της θνητότητας και της δυσλειτουργίας οργάνων, μέσω της χρήσης της ελληνικής βάσης δεδομένων καταγραφής της σήψης. Η σύγκριση του qSOFA με τα κριτήρια SIRS (τουλάχιστον 3), έδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία του qSOFA στην πρόγνωση θνητότητας στις 28 ημέρες στους ασθενείς εκτός Μονάδων Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), ενώ ως προς την πρόγνωση οργανικής δυσλειτουργίας σε ασθενείς εκτός ΜΕΘ μεγαλύτερη ευαισθησία έδειξαν τα 3 κριτήρια SIRS. Η Ελληνική Ομάδα Μελέτης της Σήψης με σκοπό τη βελτίωση του qSOFA ως διαγνωστικού εργαλείου, πρότεινε την προσθήκη μίας επιπλέον παραμέτρου, την τιμή pH αρτηριακού αίματος ≤ 7,30, καθώς αυξάνει την πρόγνωση θνητότητας σε ασθενείς με κλινική υποψία λοίμωξης που δε συμπληρώνουν τιμή qSOFA ≥ 2 ³⁴⁰.

1.5.2. Παθοφυσιολογία της σήψης

Οι παθογόνοι παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση της σήψης είναι Gram-θετικά βακτήρια (*Staphylococci*, *Streptococci*), Gram-αρνητικά βακτήρια (*Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escerichia coli*), μύκητες (*Candida*), παράσιτα ή ιοί ³³⁷. Για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της σήψης αρχικά επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών των βακτηρίων που αρχίζουν τη σήψη, όπως για παράδειγμα τα μαστίγια.

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια κυρίαρχο ρόλο έχει ο λιποπολυσακχαρίτης (ή ενδοτοξίνη) LPS (lipopolysaccharide) που αποτελεί συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης



και αγκιστρώνεται στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου μέσω του λιπιδίου Α του μορίου. Έχει βρεθεί ότι η πιο ενεργή μορφή λιπιδίου Α έχει σχήμα κομμένου κώνου ³⁴¹. Επίσης, η πρωτεΐνη T3SS (Type III secretion system) των Gram-αρνητικών βακτηρίων η οποία ομοιάζει με τα μαστίγια είναι σημαντική ως προς την παθογονικότητά τους ³³³.

Αντίθετα, τα Gram-θετικά βακτήρια έχουν στο κυτταρικό τους τοίχωμα πεπτιδογλυκάνη και λιποτειχοϊκά οξέα, τα οποία έχουν επίσης την ικανότητα να επάγουν φλεγμονώδη αντίδραση. Κυρίως όμως τα Gram-θετικά βακτήρια παράγουν εξωτοξίνες, οι οποίες ως υπεραντιγόνα προσδένονται στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τύπου ΙΙ (MHC II) επάγοντας την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Οι διαφορές στην αμινοτελική αλληλουχία των εξωτοξινών των Gram-θετικών βακτηρίων δείχνουν προτίμηση (λόγω αγχιστείας) σε διαφορετικά ανθρώπινα αλλήλια HLA τύπου II ³⁴¹.

Η πολύπλοκη αλληλεπίδραση του παθογόνου παράγοντα με τον ξενιστή ενεργοποιεί την ανοσολογική αντίδραση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι η άμυνα του οργανισμού απέναντι στην εισβολή των παθογόνων και διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, στο έμφυτο ή ενδογενές (innate) και το επίκτητο ή προσαρμοσμένο (adaptive). Η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού είναι οι φυσικοί φραγμοί: το δέρμα και οι βλεννώδεις μεμβράνες της γαστρεντερικής, αναπνευστικής και ουρογεννητικής οδού ³³¹.

1.5.2.1. Έμφυτη – επίκτητη ανοσία

Η επίκτητη ανοσία οργανώνεται γύρω από δύο κατηγορίες κυττάρων, τα B και T λεμφοκύτταρα, τα οποία εκφράζουν μία πληθώρα υποδοχέων που αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα, εξασφαλίζουν την ειδική ανοσολογική απόκριση αλλά και τη μνήμη απέναντι σε επαναμόλυνση. Τα T λεμφοκύτταρα οργανώνουν τη φλεγμονώδη απόκριση και κυρίως τα CD4⁺ T βοηθητικά (T_H1, T_H2 και T_H17) κύτταρα, τα οποία εκφράζουν διαφορετικά προφίλ κυτταροκινών: παραγωγή IFN-γ, IL-12 από τα T_H1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 από τα T_H2 και IL-17 από τα T_H17 κύτταρα ³⁴².

Οι κυτταροκίνες είναι μικρές σηματοδοτικές πρωτεΐνες <40 kDa οι οποίες όταν προσδεθούν σε συγκεκριμένους υποδοχείς, σε διάφορους κυτταρικούς τύπους επάγουν ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό ή μετακίνηση στα κύτταρα στόχους. Ο όρος κυτταροκίνη αναφέρεται χονδρικά σε περίπου 100 ξεχωριστά γονίδια και περιλαμβάνει ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων ³⁴³.

Αντιθέτως, η έμφυτη ανοσία, αποτελείται από όλα εκείνα τα μόρια δράσης που παρέχουν ταχεία, αποτελεσματική και μη εξειδικευμένη ανοσολογική απόκριση και περιλαμβάνει όλες τις χυμικές, κυτταρικές και μηχανικές διαδικασίες που προστατεύουν τον ξενιστή από τα παθογόνα. Το συμπλήρωμα είναι βασικό συστατικό της έμφυτης ανοσίας, αλλά αποτελεί και μία λειτουργική γέφυρα ανάμεσα στην έμφυτη και την επίκτητη ανοσία³⁴⁴. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ιδιαίτερα συντηρημένο κατά την εξέλιξη. Τα λευκοκύτταρα – κλειδιά της έμφυτης απόκρισης είναι τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες (NKs)³⁴³.

1.5.2.2. Έναρξη της φλεγμονής

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκφράζουν υποδοχείς με τους οποίους αναγνωρίζουν κυτταρική βλάβη ή μικροβιακή εισβολή οι οποίοι είναι γνωστοί ως pattern recognition receptors (PRRs). Η μικροβιακή εισβολή ανιχνεύεται από τους PRRs με αναγνώριση συντηρημένων μοριακών μοτίβων των υδατανθράκων και λιπαρών οξέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των παθογόνων μικροοργανισμών, τα οποία ονομάζονται PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Τα PAMPs δεν παράγονται ούτε εκφράζονται από τα κύτταρα του ξενιστή. Οι υποδοχείς PRRs αναγνωρίζουν επίσης ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες ή μεσολαβητές που απελευθερώνονται από κύτταρα του ξενιστή που έχουν υποστεί βλάβη λόγω βιολογικού στρες και υφίστανται απόπτωση, τις λεγόμενες αλαρμίνες, που αποτελούν τα DAMPs (danger-associated molecular patterns) και προκαλούν νέκρωση. Τα DAMPs απελευθερώνονται κυρίως από τα μιτοχόνδρια των τραυματισμένων κυττάρων, και είναι παρόμοιες πρωτεΐνες ανεξάρτητα από την αιτία της βλάβης του κυττάρου: λόγω βακτηριακής εισβολής, είτε λόγω τραύματος, καψίματος, χειρουργικής επέμβασης κλπ, γεγονός που αποδίδεται στο παρόμοιο γενετικό υπόβαθρο μιτοχονδρίων και βακτηρίων ³³¹. Ως DAMPS θεωρούνται πρωτεΐνες στρες, μιτοχονδριακό DNA, HMGB-1, ATP, ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), ιστόνες και η εκροή ιόντων καλίου ³³³. Οι PRRs ενεργοποιούν την έμφυτη ανοσία ^{342,343}. Κάθε ελάττωμα στους PRRs και τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια κατά την αναγνώριση των PAMPs ενισχύουν την εμφάνιση της σήψης ³⁴⁵.

Η αρχική λοίμωξη επάγει την τοπική έμφυτη ανοσολογική αντίδραση, κατά την οποία συσσωρεύονται λευκοκύτταρα στο σημείο της βλάβης για να εξολοθρεύσουν τα βακτήρια. Τα λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα) ενεργοποιούνται από συνδιεγερτικά μόρια στο σημείο της μόλυνσης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν το τοπικό επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα για την αντιμετώπιση της εισβολής. Ο στόχος της έμφυτης ανοσίας είναι η εξάλειψη των DAMPs και PAMPs και ακολουθείται από την επίκτητη ανοσία με τη συνακόλουθη λύση της ανοσολογικής αντίδρασης. Η επίκτητη ανοσολογική απόκριση βασίζεται στην ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, γεγονός που ρυθμίζεται από το «προφίλ» κυτταροκινών της έμφυτης ανοσίας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι διαδικασίες αυτές είναι καλά ρυθμιζόμενες, διατηρώντας έτσι την ισορροπία και κρατώντας τη φλεγμονώδη απόκριση σε τοπικά επίπεδα ³³¹.

Σε περίπτωση ανισορροπίας (προφλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους) και απορρύθμισης (ωρίμανσης και πολλαπλασιασμού) της ανοσολογικής απόκρισης, η τοπική φλεγμονή πολλαπλασιάζεται και επεκτείνεται σε όλο το σώμα μέσω της κυκλοφορίας των ανοσοκυττάρων και των διαλυτών μεσολαβητών. Η απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών επάγει την περαιτέρω παραγωγή και απελευθέρωση κυτταροκινών, δημιουργώντας ένα «αυτο-πολλαπλασιαζόμενο» φαινόμενο το οποίο ενώ είχε ως αρχικό σκοπό την αντιμετώπιση του εισβολέα και τη διατήρηση της ομοιόστασης, εν τέλει, προκαλεί απομακρυσμένη κυτταρική και οργανική βλάβη. Η υπερπαραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών είναι γνωστή ως «θύελλα κυτταροκινών» (Εικόνα 1.20)³⁴³ (Laszlo 2015).



Εικόνα 1.20: «Θύελλα κυτταροκινών» στη σήψη ³⁴³.

Η απόκριση του ξενιστή στη λοίμωξη περιλαμβάνει εκτός από τα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν αποτελούν μόνο «θύμα» της φλεγμονής, αλλά αντίθετα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επέκταση και τον πολλαπλασιασμό της φλεγμονώδους απόκρισης. Ως απάντηση στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, το ενδοθήλιο εκφράζει μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως τα ICAM1 και VCAM1 τα οποία βοηθούν τα ενεργοποιημένα ανοσοκύτταρα να προσδεθούν στο τοίχωμα των αγγείων και να εισέλθουν στο σημείο της βλάβης, συνθέτει χημειοκίνες που προσελκύουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, παράγει παράγοντες πήξης και παράγοντες ιστών. Επιπλέον, η ενδοθηλιακή κυτταρική δυσλειτουργία και νέκρωση οδηγεί στην αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, την αυξημένη παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού παράγοντα ΝΟ και την οργανική βλάβη λόγω ισχαιμίας ³⁴³.

Η φλεγμονή, εκδηλώνεται περαιτέρω με ενεργοποίηση του συμπληρώματος και του μηχανισμού πήξης, καταλήγοντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Αρχικά συσσωρεύονται κι ενεργοποιούνται τα ουδετερόφιλα, τα οποία προσπαθούν να παράξουν τοξικούς μεταβολίτες οξυγόνου, μετατρέποντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε υποχλωριώδες οξύ. Οι τοξικοί αυτοί μεταβολίτες είναι σε κυτταροπλασματικά κοκκία και απελευθερώνονται κατά την αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων, μια διαδικασία που επάγει περαιτέρω τη φλεγμονή αλλά ταυτόχρονα καταστρέφει τους παρακείμενους ιστούς ^{335,346}.

Οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα μεταφέρουν το «σήμα» μέσω των δενδριτικών κυττάρων στα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται, ωριμάζουν και εκφράζουν διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους. Η ανοσολογική απόκριση είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο που αποτελείται από την τύπου-καταρράκτη ενεργοποίηση κυτταροκινών, παραγόντων πήξης και την απελευθέρωση πρωτεϊνών οξείας φάσης, ορμονών του στρες και χημειοκινών. Το κλειδί για τη λύση της ανοσολογικής απόκρισης είναι η ισορροπία ανάμεσα στις προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις δυνάμεις, η οποία καθορίζεται από την ισορροπία της Τ_{H1}, T_{H2}, T_{H17} και γΔΤ απόκρισης ³³¹.

1.5.2.3. Μοριακοί μηχανισμοί παθοφυσιολογίας της σήψης

Η σήψη ξεκινάει από τη μοριακή αλληλεπίδραση ανάμεσα σε συγκεκριμένα συστατικά των μικροοργανισμών και τα κύτταρα του ξενιστή. Έπειτα, οι πολλαπλές φλεγμονώδεις αντιδράσεις σε τοπικό επίπεδο, η συσσώρευση κυττάρων στο σημείο της λοίμωξης ή του προσβεβλημένου ιστού και η φλεγμονώδης ανοσολογική απόκριση στην κυκλοφορία εμπλέκονται στην εξέλιξη της σήψης ³³³.

Κατά τη διάρκεια της σήψης, η ανοσολογική απόκριση λόγω PAMPs και DAMPs είναι γενικευμένη και σε τόσο μεγάλη έκταση, με αποτέλεσμα να συνοδεύεται από μία ανισορροπία στην απελευθέρωση και δράση των κυτταροκινών. Η ανισορροπία αυτή έχει ως συνέπεια να μετατρέπεται η φυσιολογικά ωφέλιμη ανοσολογική απόκριση έναντι στη λοίμωξη σε μία μαζική καταστροφική φλεγμονή για τους ιστούς του ξενιστή ^{342,347}.

Κατά τη διάρκεια της σήψης, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού υφίστανται φαινοτυπικές αλλαγές όσον αφορά την κατάσταση ενεργοποίησής τους, τον εντοπισμό και τον αριθμό τους. Οι αλλαγές αυτές ρυθμίζονται από τις κυτταροκίνες και τους αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες (HGF). Οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες

(GM-CSF, G-CSF, M-CSG, EPO) είναι εκκρινόμενες ή μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που επάγουν την ωρίμανση, τη διαφοροποίηση των μυελοειδών κυττάρων και/ ή τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων. Έτσι, αυξάνεται ο αριθμός των ενεργοποιημένων κυττάρων που εισέρχονται στην κυκλοφορία, με συνέπεια να διαδραματίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία της σήψης τόσο στην αρχή όσο και στην τελική φάση ^{343,347}.

Οι υποδοχείς PRRs αποτελούνται από τους μεμβρανικούς υποδοχείς TLRs (Tolllike receptors), τους κυτταροπλασματικούς NLRs (Nod-like receptors), RLRs (RIG-like receptors), ALRs (AIM2-like receptors) και τους CLRs (C-type lectin receptors) (Εικόνα 1.21). Οι TLRs είναι η υποκατηγορία των καλύτερα μελετημένων PRRs με σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση των PAMPs και DAMPs και υπεύθυνοι για την έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης ³⁴². Η οικογένεια υποδοχέων TLRs οι οποίοι ομοιάζουν στην πρωτεΐνη Toll που αναγνωρίστηκε αρχικά στη δροσόφιλα, απαρτίζεται από 10 μέλη για τον άνθρωπο (12 στα ποντίκια), με εξειδίκευση σε προσδέτες που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες βακτηρίων, μυκήτων και ζυμομυκήτων. Για παράδειγμα, ο TLR4 είναι ο υποδοχέας για το LPS κι έχει μελετηθεί σε βάθος για την απόκριση του ξενιστή στην ενδοτοξιναιμία. Ο TLR2 αναγνωρίζει κυρίως δομές του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων, ο TLR5 τις φλαγγελίνες των μαστιγίων, ο TLR9 περιοχές CpG στο βακτηριακό DNA, ο TLR1 τριακυλολιποπρωτεΐνες, ο TLR3 δίκλωνο RNA, ενώ ο TLR7 μονόκλωνο RNA 341,343. Οι TLRs εντοπίζονται εκτός από την εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων και στη μεμβράνη των ενδοκυτταροπλασματικών ενδοσωμάτων, λυσοσωμάτων και φαγοσωμάτων ^{333, 345}. Η TLR-διαμεσολαβούμενη σηματοδότηση είναι γνωστή ως «σηματοδοτόσωμα» (signalosome) (Εικόνα 1.21) 333, 348.



Εικόνα 1.21: Οι υποδοχείς PRRs και η επαγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω διαφορετικών μονοπατιών («σηματοδοτόσωμα» ή «φλεγμονόσωμα») ³³³.

1.5.2.4. Αναγνώριση των μικροβιακών συστατικών από τον ξενιστή

Η ενεργοποίηση του ξενιστή από το LPS γίνεται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης LBP (LPSbinding protein) και του υποδοχέα CD14. Ο CD14 είναι είτε μεμβρανικός (mCD14) υποδοχέας συνδεδεμένος με τη γλυκοσυλ-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη ή διαλυτός στην κυκλοφορία (sCD14). Το σύμπλοκο LBP-LPS-CD14 ενεργοποιεί τον υποδοχέα TLR4 μέσω του οποίου γίνεται η σηματοδότηση στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή (Εικόνα 1.22), γνωστή ως «σηματοδοτόσωμα» ^{333, 342}. Το ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων TLRs είναι ομόλογο με εκείνο των υποδοχέων της IL-1 και IL-18 και ονομάζεται TIR (Toll/IL-1 receptor homology domain) ^{341,349}.

Έχει βρεθεί ότι για την ενεργοποίηση του TLR4 απαιτείται η πρωτεΐνη MD-2 της κυτταρικής επιφάνειας. Το ενδοκυτταρικό τμήμα του TLR4 TIR συνδέεται μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα MyD-88 και/ ή της TIRAP στην κινάση IRAK (IL-1 receptor associated kinase), η οποία επάγει τον TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), που ως μεταγωγέας σήματος στο μονοπάτι του NF-κB, ενεργοποιεί την κινάση IKK και οδηγεί στη μετακίνηση του NF-κB στον πυρήνα με συνακόλουθη παραγωγή κυτταροκινών, όπως οι TNF-α, IL-1β, IRF3, IRF7, AP-1. Υπάρχει κι άλλο μονοπάτι ανεξάρτητο του MyD-88, στο οποίο το σήμα από τον TLR4 μεταφέρεται ενδοκυτταρικά μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα TIRAP/ Mal (TIR domain-containing adaptor protein), η οποία ενεργοποιεί την κινάση PKR (RNA-dependent protein kinase) και τον ρυθμιστικό παράγοντα 3 της ιντερφερόνης (IRF3). Εκτός από τον TLR4 κι άλλα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας μπορούν να ανιχνεύσουν το LPS, όπως είναι ο υποδοχέας των μακροφάγων MSR (macrophage scavenger receptor), το CD11b/CD18 και κανάλια ιόντων (Εικόνα 1.22, Εικόνα 1.23) ^{341,350}.



Εικόνα 1.22: Μηχανισμοί αναγνώρισης του LPS από τον ξενιστή ³⁴¹.

Υπάρχει και δεύτερο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκει τον TLR4 και τον CD14 έπειτα από τη δράση του LPS, το οποίο περιλαμβάνει την ενδοκυττάρωση του TLR4 μέσω του ενδοσωμικού δικτύου του κυττάρου ξενιστή. Ο υποδοχέας CD14 εκτός από το να μεταφέρει το LPS στο σύμπλοκο TLR4/MD-2, ρυθμίζει την LPS-επαγόμενη ενδοκύττωση του TLR4. Η σηματοδότηση ενδοκυτταρικά βασίζεται περαιτέρω στις πρωτεΐνες προσαρμογείς TRAM και TRIF, οι οποίες μεσολαβούν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 που ρυθμίζει την έκφραση της IFN ³⁴⁹.



Εικόνα 1.23: Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών του TLR4, μέσω MyD-88 ή ανεξάρτητο του MyD-88 ³⁵⁰.

1.5.2.5. Αναγνώριση των μικροβιακών συστατικών μέσω φλεγμονοσώματος

Η ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών υποδοχέων NLRs (και ALRs) γίνεται από τα DAMPs και από μικρόβια που έχουν φαγοκυτταρωθεί, όταν δημιουργείται ένας πόρος στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή με ταυτόχρονη εκροή ιόντων K ή είσοδο ATP και συνεπάγεται αλλαγή της διαμόρφωσης των NLRs (και ALRs) με ταυτόχρονο σχηματισμό κι ενεργοποίηση ενός συμπλόκου, του φλεγμονοσώματος. Μόνο πέντε PRRs μπορούν να σχηματίσουν φλεγμονοσώματα, οι NLRP1, NLRP3, NLRC4, pyrin και AIM2. Το φλεγμονόσωμα μπορεί να ενεργοποιηθεί και με ATP που απελευθερώνεται από τα κύτταρα του ξενιστή σε περίπτωση κατεστραμμένου λόγω ανοξίας ιστού, μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας ή χημικών όπως είναι οι κρύσταλλοι ουρικού οξέος ³³³.

1.5.2.5.1. Φλεγμονόσωμα

Το φλεγμονόσωμα είναι ένα σύμπλοκο το οποίο αποτελεί βασικό συστατικό του ανοσοποιητικού μηχανισμού του ξενιστή και μετακινείται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα. Βοηθάει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού, διαδραματίζει ρόλο στην αναγνώριση των ενδοκυτταρικών παθογόνων και την αντιμετώπισή τους μέσω της ρύθμισης της προφλεγμονώδους ανοσολογικής απόκρισης. Η ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών υποδοχέων NLRs και ALRs σχηματίζει ένα περίπλοκο σύμπλεγμα που ενεργοποιεί τις κασπάσες 1 και 11 (CASP1, CASP11) από τις αντίστοιχες προκασπάσες. Οι CASP1 και CASP11 οδηγούν στην απελευθέρωση των IL-1β και IL-18 και τον κυτταρικό θάνατο μέσω πυρόπτωσης ή νεκρόπτωσης (Εικόνα 1.24Α). Κατά συνέπεια, τα φλεγμονοσώματα παίζουν ενεργό ρόλο στην παθογένεση της συστεμικής φλεγμονής ³⁴⁵.

Οι IL-1β και IL-18 είναι από τις πρώτες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Η IL-1β δρα ως ενδογενές πυρετογόνο και είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ, την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και τη σύνθεση προστανοειδών. Η IL-18 επάγει την υπερέκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης που είναι απαραίτητα για τη διείσδυση των ουδετερόφιλων στο σημείο της μόλυνσης, την παραγωγή NO, χημειοκινών και IFN-γ (Εικόνα 1.24A) ³⁴⁵.



Εικόνα 1.24: Α. Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού (κανονικού και μη) μέσω φλεγμονοσώματος και Β. Μοριακά συστατικά του φλεγμονοσώματος NLRP3 ^{333,345}.

Το φλεγμονόσωμα αποτελείται από μία αναγνωριστική πρωτεΐνη, μία πρωτεΐνη προσαρμογέα και μία καταλυτική περιοχή, την κασπάση. Η αναγνωριστική πρωτεΐνη στο καλύτερα μελετημένο φλεγμονόσωμα, το NLRP3, έχει μια περιοχή πλούσια σε λευκίνη στο αμινοτελικό άκρο της NOD και την περιοχή PYD, μέσω της οποίας προσδένεται στην περιοχή PYD της πρωτεΐνης προσαρμογέα ASC. Η ASC στρατολογεί κι ενεργοποιεί την κασπάση μέσω της CARD περιοχής της, η οποία είναι ένα μοτίβο πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης που εμπλέκεται στη φλεγμονή και την απόπτωση, συμβάλλοντας στο σχηματισμό του φλεγμονοσώματος (Εικ. 1.24B) ³³³. Τα φλεγμονοσώματα ενεργοποιούνται υπό διαφορετικές συνθήκες λοίμωξης και μπορεί να οδηγήσουν σε σήψη εάν δεν υπάρξει αποτελεσματική ρύθμιση.

1.5.2.6. Ενίσχυση μεταγωγής σήματος

Τα μονοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση με την απελευθέρωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, IL-6, TNF-a, αλλά και επιπρόσθετων, όπως των IL-12, IL-15, IL-18 αλλά και άλλων μορίων (Πίνακας 1.4). Η IL-1 και ο TNF-a απελευθερώνονται τα πρώτα 30-90 λεπτά από την έκθεση στο LPS. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ρυθμίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο δευτερογενών αποκρίσεων. Η IL-1 και ο TNF-a επάγουν εκτός από κυτταροκίνες, λιπιδιακούς διαμεσολαβητές, ενεργές ρίζες οξυγόνου και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, των οποίων οι δράσεις ενισχύουν περαιτέρω την ανοσολογική απόκριση και παρουσιάζονται στον πίνακα 1.4³⁴¹.

Mediators	Typical effects
Cytokines	***************************************
II-1, IL-6, IL-12, IL-15,	Activate neutrophils, lymphocytes and vascular
IL-18, TNF-α, MIF,	endothelium; upregulate cellular adhesion molecules;
HMGB1, IL-10	induce prostaglandins, nitric oxide synthase and
	acute-phase proteins; induce fever. Note that IL-10 is
	predominantly a negative regulator of these effects
Chemokines	
IL-8, MIP-1α, MIP-1β,	Mobilize and activate inflammatory cells, especially
MCP-1, MCP-3	neutrophils; activate macrophages
Lipid mediators	
Platelet-activating factor,	Activate vascular endothelium; regulate vascular
prostaglandins,	tone; activate extrinsic coagulation cascade
leukotrienes, thromboxane,	
tissue factor	
Oxygen radicals	
Superoxide and hydroxyl	Antimicrobial properties; regulation of vascular tone
radicals, nitric oxide	

Πίνακας 1.4: Προϊόντα μακροφάγων που εμπλέκονται στην παθογένεση της σήψης (Cohen 2002).

Το HMGB1 (high-mobility group box 1) παράγεται από τα μακροφάγα και δρα ως κυτταροκίνη διαδραματίζοντας ρόλο στη σταθεροποίηση νουκλεοσωμάτων, στη μεταγραφή γονιδίων και στη δραστικότητα υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Τα επίπεδα του HMGB1 στην κυκλοφορία αυξάνονται πολύ αργότερα από την IL-1 και τον TNF-a, περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση LPS σε ποντίκια. Μία επιπλέον προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που μεσολαβεί στη σήψη και το σηπτικό σοκ από Gram-αρνητικά αλλά και Gram-θετικά βακτήρια είναι ο MIF (macrophage migration-inhibitory factor), ο οποίος επάγεται μεταξύ όλων των υπολοίπων και από μικρή ποσότητα γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα
1.25). Η IL-18 επάγει την παραγωγή IFN-γ, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την έκφραση των TLR4, MD-2, MyD-88 από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα και αντισταθμίζει τη μείωση των επιπέδων του TLR4 από το LPS ^{341,342}.

Έχει βρεθεί ότι ένα μη κωδικοποιόν RNA που ονομάζεται microRNA εμπλέκεται στο πολύπλοκο δίκτυο μηχανισμών της σήψης, εμφανίζοντας αυξημένα επίπεδα σε σηπτικούς ασθενείς (miR-132, miR-146, miR-150, miR-155) και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη της έμφυτης ανοσίας ³³⁷.

Οι υποδοχείς TLRs διαμεσολαβούν τη φλεγμονώδη αντίδραση μέσω αναγνώρισης από το συμπλήρωμα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.25, κατά τη διάρκεια της σήψης, αφού ενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα μέσω 3 μονοπατιών, η θρομβίνη μέσω της δράσης της C5κονβερτάσης παράγει την αναφυλατοξίνη C5a. Η C5a ρυθμίζει αρνητικά τον TLR4, ενώ ενεργοποιεί το μηχανισμό πήξης και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως του MIF και του HMGB1. Γενικά η υπερβολική παραγωγή της C5a κατά τη σήψη έχει πολλές επιπτώσεις στον ξενιστή, όπως ανοσοπαράλυση, απόπτωση κυττάρων του ανοσοποιητικού, διαταραχές πήξης και καρδιομυοπάθεια ³³⁷.

Το HMGB1 το οποίο απελευθερώνεται στη φλεγμονή από μακροφάγα, μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα, δρα πλειοτροπικά ως ενδογενής αλαρμίνη, προσδένεται στον TLR4 κι επάγει περαιτέρω τη φλεγμονή. Παρομοίως δρα και ο MIF, ο οποίος παράγεται από τους βλεννογόνους και τα λευκοκύτταρα. Επάγεται από βακτήρια, TNF, IFN-γ, C5a και σε καταστάσεις στρες. Ο MIF συνδέει το ανοσοποιητικό σύστημα με το ενδοκρινικό σύστημα, αναστέλλοντας την αντιφλεγμονώδη δράση των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών του ενδοκρινούς συστήματος. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα ελέγχει την απελευθέρωση του HMGB1 και άλλων κυτταροκινών κατά τη σήψη. Η ενεργοποίηση του χολινεργικού αντι-φλεγμονώδους μονοπατιού κατά τη σήψη αναστέλλει τον HMGB1 και βελτιώνει την επιβίωση (Εικόνα 1.25). Στην αρχή της σήψης, η ενεργοποίηση των αδρενεργικών μονοπατιών του συμπαθητικού αυτόνομου νευρικού συστήματος προάγει την προφλεγμονώδη απόκριση. Στη σήψη, το σύστημα πήξης αλληλεπιδρά με την έμφυτη ανοσία, μιας και η ενεργοποίηση του TLR4 στα αιμοπετάλια ξεκινάει το σχηματισμό των NETs (neutrophil extracellular traps) από τα ουδετερόφιλα^{337,342,351}.

Η IL-17Α ρυθμίζει τις αποκρίσεις της έμφυτης αλλά και της επίκτητης ανοσίας (Εικόνα 1.25), επάγοντας τον GM-CSF, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1β, IL-6, TNFα), χημειοκίνες (IL-8, Gro-a, CCR2/MCP-1) από ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά, ινοβλάστες ή μακροφάγα, καθώς και την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε λεμφοκύτταρα και φαγοκύτταρα ^{337,343}.



Εικόνα 1.25: Οι κεντρικοί άξονες της φλεγμονώδους απόκρισης στη σήψη 342.

Αυξημένα επίπεδα IL-1β και IL-6 έχουν βρεθεί σε σηπτικούς ασθενείς και συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της σήψης και την αρνητική έκβαση της ασθένειας. Η IL-1 παράγεται μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (inflammasome). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα της IL-1 οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού JNK-p38-MAPK το οποίο επάγει τον NF-κB. Στη σήψη, η IL-6 πιθανώς σχετίζεται με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τη διαρροή των αγγείων. Η IL-12 αυξάνεται κατά τη διάρκεια της σήψης και επάγει τη διαφοροποίηση των naïve T κυττάρων σε T_{H1} και την ενεργοποίηση των NKs, με αποτέλεσμα την παραγωγή IFN-γ. Η IFN-γ επάγει τη φλεγμονώδη αντίδραση στη σήψη ³⁴³.

1.5.2.7. Διαταραχή στους μηχανισμούς πήξης και ινωδόλυσης

Κατά τη διάρκεια της σήψης, οι μηχανισμοί φλεγμονής και πήξης αλληλεπιδρούν με αμφίδρομο τρόπο. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν την έκφραση παραγόντων ιστών (tissue factors) στην κυτταρική επιφάνεια των μονοπύρηνων, ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών ενεργοποιώντας το μηχανισμό πήξης στην κυκλοφορία. Οι παράγοντες πήξης της κυκλοφορίας μεταβαίνουν στο σημείο της βλάβης των ενδοθηλιακών αιμοφόρων αγγείων. Αρχικά, τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια προσδένονται στο κολλαγόνο μέσω των υποδοχέων γλυκοπρωτεϊνών la/lla, δημιουργώντας ένα αιμοστατικό πλέγμα στο σημείο της βλάβης, το οποίο ενισχύεται με τη σύνδεση μεγάλων πρωτεϊνών von-Willebrand-factor. Την ίδια στιγμή, το μονοπάτι πήξης ενεργοποιεί τη θρομβίνη, η οποία μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδη ουσία, η οποία με τη σειρά της σταθεροποιεί περαιτέρω το πλέγμα αιμοπεταλίων. Κατά τη σήψη, η διαταραχή στον πηκτικό μηχανισμό δημιουργεί διάσπαρτη θρόμβωση στην κυκλοφορία (DIC: disseminated intravascular coagulation) (Εικόνα 1.26) ^{335,337,342}.

Ταυτόχρονα, κατά τη διάρκεια της σήψης, η ύπαρξη DIC επιφέρει διαταραχή στη λειτουργία του ινωδολυτικού μηχανισμού που φυσιολογικά διασπά την ινώδη ουσία, λόγω αυξημένων επιπέδων PAI-1 (plasminogen-activator inhibitor type-1) στο πλάσμα. Η διαταραχή αυτή σε συνδυασμό με τον αυξημένο σχηματισμό ινώδους ουσίας, και λόγω μείωσης της ενεργοποιημένης αντιπηκτικής πρωτεΐνης C (aPC), η οποία φυσιολογικά απενεργοποιεί τους παράγοντες πήξης Va και VIIIa, έχει σαν αποτέλεσμα την εναπόθεση ινώδους θρόμβου στα μικρά αγγεία, ανεπαρκή αιμάτωση των ιστών και άρα οργανική βλάβη (Εικόνα 1.26). Η ενεργοποιημένη PC εκτός από αντιπηκτική έχει αντιαποπτωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα EPCR (endothelial protein C receptor) και την αποκοπή του υποδοχέα PAR1 (protease-activated receptor 1) ^{341,342,345}.



Εικόνα 1.26: Διαταραχή της ομοιοστατικής ισορροπίας ανάμεσα σε πηκτικούς και αντι-πηκτικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της σήψης ³⁴¹.

Ο αυξημένος σχηματισμός θρόμβων επιδεινώνει την υποαιμάτωση των ιστών. Παράλληλα, εξασθενεί η λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων διότι διακόπτεται η στενή σύνδεση των κυττάρων, με αποτέλεσμα την αυξημένη αγγειακή διαρροή και το οίδημα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια χάνουν την ικανότητα παραμόρφωσης και σε συνδυασμό με την αγγειοδιαστολή, τη διάρρηξη του αγγειακού ενδοθηλίου και τη συνακόλουθη υπόταση χειροτερεύουν την οξυγόνωση των ιστών ³³⁵.

1.5.2.8. Αντιφλεγμονώδης απόκριση – ανοσοκαταστολή στη σήψη

Η έντονη φλεγμονή που παρατηρείται στη σήψη αντισταθμίζεται από ρυθμιστικά μόρια και μηχανισμούς αντιφλεγμονώδους δράσης που στοχεύουν στη διατήρηση της ανοσολογικής ισορροπίας ³⁴¹.

Η σήψη αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως μία υπερφλεγμονώδης απόκριση με μεγάλη αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών, γνωστή ως «θύελλα κυτταροκινών». Σύντομα όμως αμφισβητήθηκε, λόγω της αδυναμίας των αντι-φλεγμονωδών παραγόντων (κορτικοστεροειδή, ανταγωνιστές TNF, αναστολείς IL-1) να βελτιώσουν την επιβίωση των ασθενών ³⁵². Λίγοι ασθενείς πεθαίνουν στα αρχικά στάδια της σήψης. Οι περισσότεροι υποκύπτουν στα τελικά στάδια, όπου επικρατεί παρατεταμένη ανοσοκαταστολή ³⁴². Για το λόγο αυτό προτάθηκε ότι στους σηπτικούς ασθενείς με την πάροδο του χρόνου υπερισχύει η αντιφλεγμονώδης απόκριση και η ανοσοκαταστολή ³⁵², γεγονός που οδηγεί σε δευτερογενείς λοιμώξεις ³³¹.

Οι αντιφλεγμονώδεις ιντερλευκίνες είναι ο ανταγωνιστής IL-1RA, η IL-4 και η IL-10. Η IL-4 επάγει τον πολλαπλασιασμό των Β και Τ κυττάρων και τη διαφοροποίηση των Τ σε Τ_{H2}. Η IL-10 μπλοκάρει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μυελοειδή κύτταρα, τα ΝΚ και τα Τ κύτταρα. Αυξημένα επίπεδα της IL-10 συσχετίζονται με ανοσοκαταστολή λόγω σήψης ³⁴³.

Κατά τη σήψη, μπορεί να παρατηρηθεί «ανοσολογική παράλυση» των ουδετερόφιλων κυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από πλήρη παύση των ενδογενών σηματοδοτικών τους μονοπατιών. Επιπλέον, η δυσλειτουργία του επίκτητου ανοσολογικού συστήματος που συμβαίνει στα μετέπειτα στάδια της σήψης λόγω της μετάβασης από Τ_H1κυτταρική απόκριση σε T_H2, μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή. Η αυξημένη απόπτωση των λεμφοκυττάρων (B και CD4 T) και δενδριτικών κυττάρων που συμβαίνει στη σήψη, εκτός από τη μείωση του αριθμού των κυττάρων οδηγεί σε «ανοσοπαράλυση» λόγω της ανοσοκατασταλτικής δράσης των αποπτωτικών κυττάρων. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της σήψης δε συμβαίνει απόπτωση στα μακροφάγα και ουδετερόφιλα, γεγονός που ενισχύει έμμεσα τις επιπτώσεις από την υπερβολική προφλεγμονώδη αντίδραση. Γενικά η αρχική έμφυτη φλεγμονώδης αντίδραση πρέπει να ακολουθείται από την Τκυτταρο-διαμεσολαβούμενη απόκριση για την προστασία του ίδιου του ξενιστή και τη μεγιστοποίηση της άμυνάς του ενάντια στον παθογόνο οργανισμό ^{331,342,352}.

Τα φλεγμονοσώματα διαδραματίζουν ρόλο στην ανοσοκαταστολή κατά τη διάρκεια της σήψης μιας και η ενεργοποίησή τους επάγει το θάνατο των δενδριτικών κυττάρων και των μακροφάγων μέσω πυρόπτωσης ή νεκρόπτωσης ³⁴⁵.

Ο όρος ανοσοπαράλυση μπορεί να περιγραφεί με μεγαλύτερη ακρίβεια με τον όρο κυτταρικός αναπρογραμματισμός, κατά τον οποίο συμβαίνουν ταυτόχρονα δύο αντίθετες διαδικασίες. Τα κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης, που προέρχονται από το μυελό των οστών, σπλήνα, λεμφαδένες και αίμα υπολειτουργούν, σε αντίθεση με τα κύτταρα άλλων ιστών και οργάνων, όπως ήπατος, νεφρών, πνεύμονα, εγκεφάλου, γαστρεντερικού σωλήνα, τα οποία υπερλειτουργούν και δημιουργούν φλεγμονή ³³¹.

Η ανοσοκαταστολή παρατηρήθηκε σε σηπτικά μοντέλα μυών από μετρήσεις που έγιναν τόσο στην κυκλοφορία αλλά και σε ιστούς. Βιοχημική, κυτταρομετρική και ανοσοϊστολογική μελέτη σηπτικών ασθενών που πέθαναν σε ΜΕΘ κατέδειξε ανοσοκαταστολή, η οποία φάνηκε με επαγωγή ανασταλτικών μηχανισμών, όπως επικράτηση ανασταλτικών υποδοχέων έναντι των ενεργοποιητικών υποδοχέων (μειωμένη έκφραση του CD28 που ενεργοποιεί τα T κύτταρα, αύξηση του υποδοχέα CTLA-4 που αναστέλλει το ανοσοποιητικό, μείωση του IL-7Ra στα T κύτταρα που φυσιολογικά προωθεί την κυτταρική επιβίωση), εξάπλωση των κατασταλτικών κυττάρων T_{reg} που αναστέλλουν την ανοσολογική απόκριση, επαγωγή ανασταλτικών προσδετών (ligands) και υποδοχέων στα αντιγονοπαρουσιαστικά (μείωση του υποδοχέα HLA-DR που επάγει T-κυτταρική απόκριση) και στα παρεγχυματικά κύτταρα, αλλά και με μειωμένη έκφραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IFN-γ, IL-6 ³⁵³.

Οι μηχανισμοί με αντιφλεγμονώδη δράση περιλαμβάνουν ανταγωνιστές των υποδοχέων TNF και IL-1, απενεργοποιητές του συμπληρώματος, επαγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, κυρίως της IL-10, μεταβολικές αλλαγές (αυξημένη παραγωγή κορτιζόλης, απελευθέρωση κατεχολαμινών), επαγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης (acute phase proteins) κι ενεργοποίηση του ενδοθηλίου με επαγωγή των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, απελευθέρωση προστανοειδών και του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Παράλληλα, παρατηρείται απόπτωση των λεμφοκυττάρων η οποία εκδηλώνεται με μείωση των Β και CD4⁺ λεμφοκυττάρων ³⁴¹.

Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν την άποψη ότι η αντιφλεγμονώδης αντίδραση είναι η αιτία ανεπαρκούς απόκρισης του ξενιστή στη σήψη που οδηγεί σε βαθμιαία οργανική ανεπάρκεια και άρα προτείνουν την αναστολή της ανοσοκαταστολής ως τρόπο θεραπευτικής προσέγγισης ³⁴¹. Η αυξημένη φλεγμονή και η ανοσοκαταστολή μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα στους σηπτικούς ασθενείς, ενώ η ανοσοκαταστολή μπορεί να είναι αναστρέψιμη. Οι δυναμικές ανοσολογικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τις διαφορετικές περιπτώσεις σήψης επιβάλλουν την προσωποποιημένη θεραπεία, είτε προς την κατεύθυνση της αντιφλεγμονώδους ή της ανοσοενισχυτικής προσέγγισης ³⁵³.

1.5.2.9. Μηχανισμοί οργανικής ανεπάρκειας στη σήψη

Η τελική αιτία θανάτου στους σηπτικούς ασθενείς είναι η πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια. Έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στην πιθανότητα θνητότητας και στον αριθμό των οργάνουν που έχουν υποστεί βλάβη. Ανεπάρκεια σε 4-5 όργανα αυξάνει το ποσοστό θνητότητας στο 90% ανεξάρτητα από τη θεραπεία.

Η παθογένεση της οργανικής δυσλειτουργίας στη σήψη είναι πολυπαραγοντική (Εικόνα 1.27). Η διάχυτη εναπόθεση ινώδους ουσίας δημιουργεί αγγειακή έμφραξη με αποτέλεσμα την ανεπαρκή οξυγόνωση (υποξία) και υποαιμάτωση των ιστών. Η έλλειψη των αγγειοδραστικών ουσιών όπως για παράδειγμα PAF, ισταμίνες και προστανοειδή (προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες, προστακυκλίνες), διαταράσσει την αγγειακή ομοιόσταση.

Η συσσώρευση κυττάρων, κυρίως ουδετερόφιλων, προκαλεί καταστροφή των ιστών λόγω των λυσοσωμικών ενζύμων και των ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου. Ο TNFa και άλλες κυτταροκίνες επάγουν τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), με συνέπεια το αυξημένο NO να επιτείνει την αστάθεια των αγγείων, οδηγώντας στη μυοκαρδιακή δυσλειτουργία που παρατηρείται στη σήψη ^{341,354}.





Η υποξία των ιστών κατά τη σήψη παρουσιάζεται ως η διαφορά ανάμεσα στο μεταφερόμενο προς τους ιστούς οξυγόνο και στις απαιτήσεις σε οξυγόνο των ιστών. Εκτός όμως από την υποξία, τα κύτταρα ενδέχεται να μην μπορούν να χρησιμοποιήσουν το διαθέσιμο οξυγόνο, πιθανώς λόγω υπερβολικής παραγωγής NO. Μελέτη σε βιοψίες σκελετικών μυών από σηπτικούς ασθενείς έδειξε ελαττωματική μιτοχονδριακή αναπνοή λόγω αναστολής από το NO ³⁴². Η οργανική δυσλειτουργία σε σηπτικούς ασθενείς δε σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό θάνατο στα πάσχοντα όργανα, αλλά μπορεί να αποδοθεί σε «κυτταρική αναισθητοποίηση» (cell stunning), πιθανώς λόγω ελαττωμένης κατανάλωσης οξυγόνου ³⁵².

Η προβληματική οξυγόνωση των ιστών δημιουργεί δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα το πυροσταφυλικό οξύ να μη χρησιμοποιείται στον κύκλο του Krebs, αλλά να ανάγεται σε γαλακτικό οξύ. Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος αυξάνονται αρχικά στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια διαχέονται στην κυκλοφορία, δημιουργώντας υπεργαλακταιμία. Η υπεργαλακταιμία στη σήψη είναι αποτέλεσμα πολλών αλλαγών σε μεταβολικές διεργασίες. Η συστεμική υποαιμάτωση, η τοπική υποαιμάτωση και η αποσταθεροποίηση της μικροκυκλοφορίας ευνοούν την υπεργαλακταιμία. Η μειωμένη μεταφορά οξυγόνου από την κυκλοφορία και η υποοξυγόνωση των ιστών οδηγούν σε αναερόβιο μεταβολισμό των κυττάρων, που επίσης ευνοεί την παραγωγή γαλακτικού οξέος ³³⁵.

Η συνεχής απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών στην κυκλοφορία επιτείνει τη δυσλειτουργία της καρδιάς και του αγγειακού συστήματος των σπλάχνων. Το αίμα από τα σπλάχνα μεταβαίνει σε άλλα όργανα ειδικά λόγω υπότασης, και άρα αυξάνεται η πιθανότητα μετακίνησης των εντερικών βακτηρίων μέσω του βλεννογόνου του εντέρου στη συστεμική κυκλοφορία ³³⁵.

Στη σήψη αλλάζει η αγγειοσυστολή μέσω τροποποίησης των επιπέδων των προστανοειδών. Τα προστανοειδή παράγονται από το αραχιδονικό οξύ με τη δράση της COX2. Η απορυθμισμένη παραγωγή εικοσανοειδών, συμπεριλαμβανομένων των προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, είναι θανάσιμη για τον ξενιστή εξαιτίας της απώλειας αγγειακού υγρού στο έντερο και την περιτοναϊκή κοιλότητα ³⁴⁵.

1.5.2.10. Μηχανισμοί οργανικής βλάβης στη σήψη λόγω φλεγμονοσώματος

Στη σήψη, η επίμονη λοίμωξη και η υπερενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης μπορεί να προκαλέσουν αυξημένη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3. Αυτό αυξάνει την απελευθέρωση μικροσωματιδίων από τα θανόντα μακροφάγα που περιέχουν IL-1β, ASC, CASP1, NLRP3, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η επακόλουθη αυξημένη διείσδυση των ουδετερόφιλων/ μονοκυττάρων και η μετακίνησή τους σε απομακρυσμένα όργανα, συνεργιστικά με τη δράση εκκαθάρισης του παθογόνου οργανισμού, καταστρέφουν τα παράπλευρα κύτταρα και απουσία ελέγχου και ρύθμισης, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα όργανα (πνεύμονες, νεφρούς, ήπαρ κ.ά.) ³⁴⁵.

Από την άλλη πλευρά, η υπερενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί στην καταστροφή τους και την απελευθέρωση μικροσωματιδίων από αυτά, τα οποία ενισχύουν το παθογόνο αποτέλεσμα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η παρατεταμένη αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ουδετερόφιλα/ μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά, όπου η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 επάγει την αυξημένη έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλεί τη διασπορά των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στην κυκλοφορία και οργανική βλάβη. Επίσης, οι ROS που παράγονται από τα ουδετερόφιλα προκαλούν καταστροφή των ιστών ³⁴⁵.

1.5.2.11. Δίκτυο φλεγμονώδους απόκρισης στη σήψη

Η φλεγμονώδης απόκριση στη σήψη περιλαμβάνει μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση ανάμεσα σε διαφορετικά βιολογικά συστήματα και κυτταρικούς τύπους του ξενιστή που έχει ως αποτέλεσμα την απορρυθμισμένη λειτουργία και την απώλεια της ομοιόστασης (Εικόνα 1.28). Στην έναρξη της σήψης, η απελευθέρωση PAMPs και DAMPs από τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς και τα προσβεβλημένα κύτταρα του ξενιστή αντίστοιχα, προκαλεί υπερδιέγερση των PRRs στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία παράγουν μία «θύελλα κυτταροκινών» και προφλεγμονωδών μεσολαβητών που προσελκύουν κι άλλα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του αδρενεργικού μονοπατιού του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και/ ή η μειωμένη δραστικότητα του χολινεργικού αντιφλεγμονώδους μονοπατιού του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος ενισχύουν περαιτέρω την υπερβολική προφλεγμονώδη απόκριση στα μακροφάγα, δενδριτικά και ουδετερόφιλα, η οποία στρέφεται εναντίον των ιστών του ίδιου του ξενιστή. Οι παθογόνοι οργανισμοί ή τα προϊόντα τους στο αίμα προκαλούν συστεμική ενεργοποίηση του συμπληρώματος, το οποίο παράγει μεγάλες ποσότητες αναφυλατοξινών, οι οποίες σε τέτοιες συγκεντρώσεις είναι επιζήμιες. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του πηκτικού συστήματος και η αναστολή του ινωδολυτικού μηχανισμού διατηρούν την προφλεγμονώδη αντίδραση και δημιουργούν διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, η οποία δύναται να προκαλέσει οργανική βλάβη 342.



Εικόνα 1.28: Το δίκτυο φλεγμονώδους απόκρισης στη σήψη 342.

Η συνολική ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή στη λοίμωξη και στη σήψη παρουσιάζονται στην εικόνα 1.29. Η σήψη είναι μία κατάσταση όπου παρατηρούνται Α. παρατεταμένη ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας, με την παρατεταμένη προφλεγμονώδη αντίδραση να επηρεάζει τη λειτουργία των ουδετερόφιλων προκαλώντας

«ανοσοπαράλυση» και Β. καταστολή της συμβατικής Τ-κυτταρο-διαμεσολαβούμενης ανοσολογικής απόκρισης κι ενεργοποίηση των Treg κυττάρων, μαζί με την αυξημένη απόπτωση των λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων οδηγούν σε ανοσοκαταστολή, η οποία αυξάνει την ευαισθησία σε δευτερογενείς λοιμώξεις. Η συντριπτική προφλεγμονώδης αντίδραση δημιουργεί την οργανική δυσλειτουργία, ενώ η παρατεταμένη ανοσοκαταστολή των σηπτικών ασθενών τους καθιστά ευάλωτους σε δευτερογενείς λοιμώξεις ^{342,345}.



Εικόνα 1.29: Η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στη λοίμωξη και στη σήψη 355.

1.5.2.12. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί στη σήψη

Η απόκριση του κάθε ξενιστή στη λοίμωξη εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο μικροοργανισμός, το σημείο της μόλυνσης, η ανοσολογική κατάσταση, η ισορροπία ανάμεσα στους παράγοντες που ενεργοποιούν τα γονίδια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της σήψης, η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής και οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που σχετίζονται με τη σήψη. Ενώ η πλειοψηφία των παραπάνω παραγόντων διαφέρουν στο χρόνο, το DNA είναι σταθερό. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί που έχουν επίδραση στο αποτέλεσμα ή τη θνητότητα λόγω σήψης θα μπορούσαν θεωρητικά να αξιοποιηθούν για την καλύτερη πρόγνωση του συνδρόμου. Έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) σε γονίδια για κυτταροκίνες (TNF-α, IL-10), υποδοχείς (IL-1Ra, CD14, TLR4, TLR1) και μεταγραφικούς παράγοντες ³⁴³.

1.5.2.13. Διαγνωστική στόχευση

Οι πολυποίκιλες εκδηλώσεις της σήψης και η μεγάλη ετερογένεια των σηπτικών ασθενών καθιστούν αδύνατη τη στόχευση της διάγνωσης βάσει ενός μεμονωμένου δείκτη, ο οποίος μπορεί να υστερεί σε εξειδίκευση. Ο ταχύς και άμεσος προσδιορισμός της έναρξης και της έκτασης της βακτηριακής εισβολής επιβάλλεται για την άμεση χορήγηση επαρκούς αντιβιοτικής θεραπείας. Γύρω στους 200 βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σήψη, όπως η διαλυτή CD14 (presepsin), ο διαλυτός suPAR, οι syndecan-1 και -4, οι οποίοι όμως δεν είναι ειδικοί. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες για τη σήψη είναι η προκαλσιτονίνη και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. Τα επίπεδά τους πρέπει να ερμηνεύονται διαφορετικά ανάλογα με την αιτιολογία της σήψης, ενώ η κινητική τους πρέπει να λαμβάνεται περισσότερο υπόψη από τις απόλυτες τιμές ³³¹.

Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1) στην κυκλοφορία σηπτικών ασθενών τα οποία συσχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και πολυοργανική βλάβη και άρα χρησιμοποιούνται ως προγνωστικός δείκτης για τη σήψη. Επιπλέον, ως δείκτης πρόγνωσης χρησιμοποιούνται και τα επίπεδα του ATP της κυκλοφορίας, μιας και αυτά αυξάνονται στη σήψη ³⁴⁵.

1.5.2.14. Θεραπευτική προσέγγιση

Η θεραπεία για τη σήψη πρέπει να στοχεύει στα τρία χαρακτηριστικά της σήψης, δηλαδή τη λοίμωξη, την απόκριση του ξενιστή και την οργανική δυσλειτουργία. Η μεταχείριση των σηπτικών ασθενών έχει κατηγοριοποιηθεί σε αυτή των 3 ωρών, 6 ωρών και 24 ωρών ^{335,343}.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη σήψη περιλαμβάνουν τη βελτιστοποίηση της αιμοδυναμικής λειτουργίας με χορήγηση υγρών αναβίωσης επιδιώκοντας την επαρκή οξυγόνωση των ιστών, τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στην κυκλοφορία με θεραπεία ινσουλίνης, тη χορήγηση μικρής δόσης κορτικοστεροειδών, χορήγηση тη αγγειοσυσταλτικών παραγόντων όπως επινεφρίνης, νορεπινεφρίνης, ισοπροτερενόλης, δοβουταμίνης ^{331,335,341,352}. Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι της σήψης μπορεί να είναι οι PRRs (μπλοκάρισμα TLR4), οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (μπλοκάρισμα MIF, HMGB1, IL-17A), το σύστημα πήξης με την αναπλήρωση της aPC για την αντιπηκτική και ανοσοκατασταλτική της δράση, είτε με την ενεργοποίηση των PAR1, PAR2, ή με τη χορήγηση ανταγωνιστών του PAF και άλλων μορίων στο μονοπάτι πήξης, το συμπλήρωμα με την εξουδετέρωση της C5a και το μπλοκάρισμα των υποδοχέων της, αλλά και το αυτόνομο νευρικό σύστημα με ενεργοποίηση του χολινεργικού αντιφλεγμονώδους

μονοπατιού ή την αναστολή του αδρενεργικού προφλεγμονώδους μονοπατιού ³⁴². Επίσης, η θεραπεία μπορεί να στοχεύει τους βακτηριακούς στόχους με αντιβιοτικά, με χρήση τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών για την εξουδετέρωση του LPS, με οξειδωμένα φωσφολιπίδια που αλλάζουν την ικανότητα πρόσδεσης του LPS στην LBP αλλά και με ανταγωνιστές των θέσεων πρόσδεσης των εξωτοξινών των Gram-θετικών βακτηρίων ³⁴¹.

Κλινικές μελέτες με αναπλήρωση όγκου υγρών αναβίωσης σε σηπτικούς ασθενείς δεν είχαν κάποιο όφελος στην επιβίωση των ασθενών, ενώ η σύσταση του υγρού αναβίωσης παραμένει ακόμη υπό συζήτηση. Παρομοίως, κλινικές μελέτες που είχαν ως στόχο να μετριάσουν τη φλεγμονώδη απόκριση ή στόχευαν τις κυτταροκίνες ή την επίλυση της πηκτικής διαταραχής με χορήγηση aPC δεν είχαν κάποιο θετικό αποτέλεσμα ³⁴³.

Μία άλλη προσέγγιση για την αντιμετώπιση των επιπτώσεων της «θύελλας κυτταροκινών» στους ιστούς είναι η στόχευση του ενδοθηλίου. Συγκεκριμένα, η μείωση της διαπερατότητας των αγγείων με ενεργοποίηση του μονοπατιού Slit-Robo4 στοχεύει στον περιορισμό της αγγειοπροκαλούμενης καταστροφής των ιστών. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του μονοπατιού S1P-υποδοχέας του S1P στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα μειώνει την παραγωγή κυτταροκινών ³⁴³.

Οι πιο πρόσφατες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη σήψη περιλαμβάνουν 1. Τη στοχευμένη απομάκρυνση τοξινών και φλεγμονωδών μεσολαβητών με εξειδικευμένη προσρόφηση, όπως είναι το αιμοφιλτράρισμα με το αντιβιοτικό polymyxin-B το οποίο προσδένεται και εξουδετερώνει τις ενδοτοξίνες, η συσκευή αιμοπροσρόφησης CytoSorb η οποία απομακρύνει τις προ- και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, 2. Την ανοσοθεραπεία αντι-PD-1 με αναστολή του υποδοχέα του PD-1 ή του προσδέτη του και 3. Τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από το μυελό των οστών τα οποία μπορούν να αναστείλουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, να ενεργοποιήσουν τα Treg κύτταρα, να ενισχύσουν τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα και να αυξήσουν την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Τέλος, η γενετική προσέγγιση μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά μία εναλλακτική θεραπεία για τη σήψη ³³¹.

Μία επιπρόσθετη θεραπευτική προσέγγιση για τη σήψη μπορεί να είναι η ρύθμιση της παραγωγής των ROS από τα ουδετερόφιλα και η στόχευση των υποδοχέων της αδενοσίνης A_{2A}R και A_{2B}R. Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση IL-33 εξασθενεί τη συστεμική φλεγμονή αυξάνοντας την προσέλευση ουδετερόφιλων στο σημείο της φλεγμονής ³⁵⁶. Το φλεγμονόσωμα αναστέλλει την ωρίμανση και απελευθέρωση της IL-33. Κατά συνέπεια, μόρια που στοχεύουν τα φλεγμονοσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία της φλεγμονής και της οργανικής βλάβης λόγω σήψης ³⁴⁵.

1.6. Η χρήση πειραματικών μοντέλων ποντικών για τη διερεύνηση της σήψης

Για τη διαλεύκανση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών παθοφυσιολογίας της σήψης έχουν χρησιμοποιηθεί ζωικά πειραματικά μοντέλα, με κυρίαρχο το ποντίκι. Το ποντίκι, πέρα από τη δυνατότητα που παρέχει για τη μελέτη πολύπλοκων ανθρώπινων φυσιολογικών συστημάτων και λειτουργιών, επιτρέπει τη μελέτη πολύπλοκων παθολογικών διαδικασιών, γεγονός που βασίζεται στη γενετική και φυσιολογική ομοιότητά του με τον άνθρωπο (40% κοινές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες). Ωστόσο, έχουν μελετηθεί και οι διαφορές στη γονιδιωματική έκφραση ανθρώπου και ποντικού ως απόκριση σε διαφορετικά μοντέλα συστεμικής φλεγμονής, όπως είναι η ενδοτοξιναιμία και η πολυμικροβιακή σήψη ³²⁹.

Τα πλεονεκτήματα χρήσης του ποντικού ως προκλινικού μοντέλου για τη σήψη παρουσιάζονται στην εικόνα 1.30 και περιλαμβάνουν την αυξημένη γονιμότητα, το σύντομο κύκλο ζωής, την ευκολία χειρισμού, τις μικρές απαιτήσεις συντήρησης, την ποικιλία στελεχών, τον πλήρη γονιδιωματικό χαρακτηρισμό του ποντικού, την ευρεία διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων για τον ποντικό, τη δημιουργία ποντικών με κύτταρα του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος και τέλος, την αναγκαιότητα ύπαρξης προκλινικών ζωικών μοντέλων πριν την εφαρμογή κλινικών μελετών στον άνθρωπο, όπως ορίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA: Food and Drug Administration).





Αν και οι γενεαλογίες ανθρώπου και ποντικού διαχωρίστηκαν πριν περίπου 75 εκατομμύρια χρόνια, υπολογίζεται ότι το 80% των γονιδίων του ποντικού βρίσκουν αντίστοιχα ορθόλογα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ως αποτέλεσμα, η μελέτη μέσω γενετικής τροποποίησης γονιδίων του ποντικού δίνει σημαντικές πληροφορίες για την περιπλοκότητα των ανθρώπινων γονιδίων, με απώτερο στόχο την περιγραφή των παθογενετικών μηχανισμών που διέπουν την εκάστοτε ασθένεια ³²⁹.

Με τη χρήση γενετικών εργαλείων (Cre-Lox, TALON, CRISPR-Cas9) είναι δυνατή η ιστοειδική τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης, η οποία μπορεί να ρυθμίζεται εξωγενώς. Ένα σημαντικό επίτευγμα είναι η πλήρης αντικατάσταση των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος του ποντικού με τους ομόλογους ανθρώπου ³⁵⁷, γεγονός που στοχεύει στην ανάπτυξη φαρμάκων στα πλαίσια της εξατομικευμένης ιατρικής ³⁵⁸.

Διεθνείς οργανισμοί (The Office of Laboratory Animal Welfare, NIH, The American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care) βασίζονται στον Οδηγό για τη Φροντίδα και Χρήση των Πειραματοζώων που έχει δημοσιευθεί από το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας των Εθνικών Επιστημονικών Ακαδημιών (National Research Council of the National Academies of Science). Σύμφωνα με τον παραπάνω Οδηγό επιβάλλεται η ανθρώπινη χρήση των πειραματοζώων. Ωστόσο, η χρήση αναλγητικών σε σηπτικά μοντέλα μπορεί να αλλάξει την απόκριση του ξενιστή στη σήψη. Για παράδειγμα, μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού ³²⁹.

1.6.1. Πειραματικά μοντέλα για σήψη και σηπτικό σοκ σε ποντίκια

Τα πειραματικά μοντέλα ποντικών για σήψη (Εικόνα 1.31) διακρίνονται σε 3 κύριες κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό που χρησιμοποιείται: Α. Χορήγηση εξωγενούς τοξίνης, Β. Χορήγηση ζωντανού παθογόνου και Γ. Διάσπαση του ενδογενούς προστατευτικού φραγμού του ζώου με αποτέλεσμα την εισβολή βακτηρίων ³⁵⁹. Τα χαρακτηριστικά των μοντέλων σήψης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.5.



Εικόνα 1.31: Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα σήψης σε ποντίκια: Χορήγηση εξωγενούς τοξίνης, Χορήγηση ζωντανού βακτηρίου, Διάσπαση του ενδογενούς προστατευτικού φραγμού (απολίνωση και νύξη του τυφλού - Cecal Ligation and Puncture, Colon Ascendens Stent Peritonitis) ³⁶⁰.

Στην πρώτη κατηγορία πειραματικών μοντέλων σήψης, η χορήγηση τοξίνης όπως λιποπολυσακχαρίτης (LPS), που αποτελεί συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων γίνεται στο αίμα, στο περιτόναιο ή στον πνεύμονα. Το LPS είναι ένα απλό μέρος των πολύπλοκων PAMPs που απελευθερώνονται από τα βακτήρια. Αμέσως δημιουργείται ισχυρή φλεγμονώδης απόκριση, η οποία ομοιάζει με την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας σε περίπτωση σήψης στον άνθρωπο. Τα πλεονεκτήματα είναι η ευκολία στην εφαρμογή, η δοσοεξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση και η επαναληψιμότητα στην απόκριση έπειτα από έγχυση της ίδιας δόσης LPS ^{329,361}. Η χορήγηση υψηλών δόσεων LPS προκαλεί υπόταση και υποθερμία στο ποντίκι, χαρακτηριστικά του σηπτικού σοκ ³⁶².

Πίνακας 1.5: Πειραματικά μοντέλα ποντικού για σήψη και χαρακτηριστικά τους 329.

Types of Murine Sepsis Models	Examples	Advantages	Disadvantages
Exogenous Administration of Toxin	Bolus injection of toll-like receptor (TLR) agonist such as LPS or zymosan	 Technical ease and reproducible inflammatory response Favors activation of the innate immune system Trimodal response to zymosan with resulting chronic, low-grade inflammation and organ failure (von Asmuth et al. 1990) 	 Sensitivity to toxins varies between species (e.g., humans are more sensitive to LPS) (Barber et al. 1995; Mahieu et al. 2006; Mestas and Hughes 2004; Warren et al. 2010) Inflammatory response to toxins is often short-lived (Copeland et al. 2005) Variable hemodynamic response (Fink and Heard 1990; Wichterman et al. 1980)
	Continuous IV administration of LPS	Reproduces hyperdynamic cardiovascular state of sepsis (Traber et al. 1988)	 Transient inflammatory response (Buras et al. 2005; Fink and Heard 1990; Fish et al. 1986)
Exogenous Administration of a Viable Pathogen	Inoculation of live bacteria such as E. coli, S. aureus, or Pseudomonas aeruginosa	 Technical ease Involves a single organism which can be selected by the operator Reproduces several features of septic shock 	 Often does no lead to colonization and replication of bacteria (Buras et al. 2005) Immunological response may vary depending on bacterial strain (Rubins and Pomeroy 1997) Infection of different compartments can alter host response (Buras et al. 2005)
	Intraperitoneal implantation of fibrin clot impregnated with viable bacteria	 Fibrin delays systemic absorption of trapped bacteria, promoting development of a local septic focus (Fink and Heard 1990) Reduces early mortality 	 Involves single bacteria strain, whereas human intra-abdominal sepsis is often polymicrobial
	Cecal slurry (CS)	 Induces polymicrobial sepsis Favors innate immune response (Gentile et al. 2014b; Wynn et al. 2008) Preferable in neonatal mice given their small size and the technical ease to perform CS 	 No component of tissue necrosis Inflammation does not persist as long as CLP or CASP (Gentile et al. 2014b; van der Poll 2012)
Disruption of the Endogenous Protective Barrier	Cecal ligation and puncture (CLP)	 Combines tissue necrosis and polymicrobial sepsis (Cuenca et al. 2010) often seen in intra-abdominal sepsis in humans Produces an immune, hemodynamic, and biochemical response similar to humans (Deitch 1998; Wichterman et al. 1980) 	 Inter-laboratory and inter-operator variability (Remick et al. 2000) Age and strain variability (De Maio et al. 2005; Nacionales et al. 2014)
	Colon ascendens stent peritonitis (CASP)	 Operator is able to adjust sepsis severity Favors adaptive immune response (Shelley et al. 2003) Produces polymicrobial sepsis and diffuse peritonitis (Buras et al. 2005) Causes resulting bacteremia (Maier et al. 2004; Zantl et al. 1998) Operator is able to alter sepsis severity 	 No component of tissue necrosis Technically more challenging in comparison to CLP Less characterized hemodynamic response (Buras et al. 2005)

Στα μειονεκτήματα της χορήγησης LPS ανήκουν η διαφορά στο μέγεθος της ανοσολογικής αντίδρασης στη σήψη ανθρώπου – ποντικού. Το αποτέλεσμα της χορήγησης LPS στον άνθρωπο και τον ποντικό διαφέρει ως προς την ευαισθησία και τις συγκεντρώσεις των κυτταροκινών στο πλάσμα. Ο άνθρωπος είναι πιο ευαίσθητος στη δράση της ενδοτοξίνης, σε αντίθεση με το ποντίκι που παρουσιάζει σχετική ανθεκτικότητα. Η LD₅₀ δόση LPS στο ποντίκι είναι μεταξύ 5-15 mg/kg, περίπου 1000 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη δόση στον άνθρωπο. Η συγκέντρωση των κυτταροκινών στο πλάσμα είναι πολύ μεγαλύτερη στον άνθρωπο από τον ποντικό ³⁶³. Ένα άλλο μειονέκτημα του παραπάνω μοντέλου στο ποντίκι είναι η αδυναμία αναπαραγωγής της υπερδυναμικής καρδιαγγειακής κατάστασης που παρατηρείται στην ανθρώπινη σήψη. Μία από τις πιθανές αιτίες είναι ότι σπάνια οι ασθενείς μολύνονται από έναν μόνο παθογόνο παράγοντα, αλλά μάλλον κατακλύζονται από διάφορα βακτήρια που εισβάλλουν από το σημείο της μόλυνσης ³²⁹. Το μοντέλο χορήγησης LPS δεν εξετάζει την αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή στην περίπτωση Gram θετικών βακτηρίων ή πολυμικροβιακής σήψης. Επίσης, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η καθαρότητα του χορηγούμενου LPS, καθώς εάν περιέχει DNA ή RNA, μεταβάλλεται η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή ³⁶¹.

Μία παραλλαγή του ανωτέρου μοντέλου, η συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση LPS, αν και αναπαράγει την υπερδυναμική καρδιαγγειακή κατάσταση της σήψης στον άνθρωπο, έχει εγκαταλειφθεί λόγω αδυναμίας αναπαραγωγής σημαντικών πτυχών της ανοσολογικής απόκρισης, αλλά και του βραχύβιου φλεγμονώδους αποτελέσματος που επιφέρει ³⁵⁹. Η χορήγηση ενδοτοξίνης στον πνεύμονα του ποντικού, είτε με νεφελοποίηση ή με άμεση ενστάλαξη, δημιουργεί αναπαραγώγιμη οξεία πνευμονική βλάβη, η οποία χαρακτηρίζεται από μαζική εισροή ουδετερόφιλων ³⁶⁴. Τέλος, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση γλυκάνης της κυτταρικής επιφάνειας μυκήτων (zymosan) επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα με την ανθρώπινη σήψη, όπου η σήψη είναι παρατεταμένη, με έντονη φλεγμονώδη απόκριση στην αρχή και πολυοργανική βλάβη που συμβαίνει στην αρχή και στο τέλος ³²⁹.

Η δεύτερη κατηγορία πειραματικών μοντέλων σήψης στα ποντίκια περιλαμβάνει τη χορήγηση ζωντανού παθογόνου παράγοντα ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοφλέβια. Η ενδοφλέβια χορήγηση στελεχών ζωντανών βακτηρίων (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*) δεν αναπαράγει την ανθρώπινη σήψη διότι τα βακτήρια δεν πολλαπλασιάζονται ώστε να δημιουργηθεί η εστία της μόλυνσης ³⁵⁹ και για αυτό απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενοφθαλμισμού. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση προκαλεί μικρότερη φλεγμονώδη απόκριση σε σχέση με την ενδοφλέβια ³²⁸. Η έκταση της βακτηριαιμίας στο μοντέλο αυτό είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη βακτηριαιμική σήψη στους ανθρώπους. Όπως και στη χορήγηση ενδοτοξίνης, η αρχική φλεγμονώδης απόκριση σε δίναι πολύ μεγαλύτερη από την ανθρώπινη σήψη ή από πειραματικά μοντέλα σήψης ποντικών που προκλήθηκαν από εστία μόλυνσης ³⁶⁵. Τα

πειραματικά μοντέλα χορήγησης LPS και ζωντανών βακτηρίων δεν αναπαριστούν την κατάσταση σήψης στους ανθρώπους, στους οποίους υπάρχει σταθερή ροή βακτηρίων στην κυκλοφορία ³⁶¹.

Μία παραλλαγή της βακτηριακής έγχυσης είναι η εμφύτευση ινώδους θρόμβου (fibrin clot) που περιέχει συγκεκριμένη ποσότητα ζωντανών βακτηρίων στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Αυτό δημιουργεί μια συνεχή εστία μόλυνσης, η οποία μεταβαίνει στην κυκλοφορία, αναπαριστώντας την κατάσταση ανθρώπινης σήψης ³⁶². Το πλεονέκτημα του μοντέλου αυτού είναι ότι η ινώδης ουσία καθυστερεί τη διάχυση των βακτηρίων στην κυκλοφορία, με αποτέλεσμα την έναρξη των θανάτων των ποντικών πιο αργά. Το μειονέκτημα είναι ότι διαφέρει από την πολυμικροβιακή σήψη του ανθρώπου, μιας και χρησιμοποιείται ένα μόνο βακτήριο ³²⁹. Το μοντέλο αυτό ανέδειξε τη σημασία της γρήγορης έναρξης χορήγησης αντιβιοτικών στη σήψη ^{366,367}.

Οι δύο κυριότερες πηγές σήψης στους ανθρώπους είναι οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και η πνευμονία. Τα μοντέλα ενδοκοιλιακής σήψης που χρησιμοποιούνται είναι η απολίνωση και νύξη του τυφλού (Cecal Ligation and Punction: CLP), η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση περιεχομένων του τυφλού (Cecal Slurry) και η περιτονίτιδα που προκαλείται στο άνω τμήμα του παχέος εντέρου με ενδοαυλιακή πρόθεση (Colon Ascendens Stent Peritonitis: CASP).

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση περιεχομένων του τυφλού (CL) είναι ένα μοντέλο σήψης της δεύτερης κατηγορίας που κυρίως εφαρμόζεται σε νεογνά ποντικών λόγω του μικρού τους μεγέθους και τη μη ολοκληρωμένη ανάπτυξη του εντέρου. Στο CL συγκεκριμένη ποσότητα περιεχομένων του τυφλού εγχύεται από ένα ποντίκι δότη στο ποντίκι δέκτη. Το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή μολυμικροβιακής σήψης, χωρίς όμως η ανοσολογική απόκριση να έχει μεγάλη διάρκεια. Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται κυρίως στο μοντέλο αυτό είναι της έμφυτης ανοσίας ^{368,369}.

Στην τρίτη κατηγορία πειραματικών μοντέλων σήψης στο ποντίκι περιλαμβάνονται δύο παρεμβατικά μοντέλα, το CLP και το CASP, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στο CLP αρχικά γίνεται μία μικρή τομή στο περιτόναιο, ακολουθεί απολίνωση μέρους του τυφλού, προσπαθώντας να παραμείνουν άθικτα τα αγγεία που το αιματώνουν. Η νύξη του τυφλού γίνεται με τη χρήση βελόνας, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κοπρανώδους υλικού από τον αυλό του τυφλού στην περιτοναϊκή κοιλότητα ³⁷⁰. Το μοντέλο CLP θεωρείται η χρυσή τεχνική για πρόκληση ενδοκοιλιακής σήψης και αναπαριστά καλύτερα την πολυπλοκότητα της ανθρώπινης σήψης, συνδυάζοντας τραύμα του ιστού λόγω λαπαροτομίας, νέκρωση του ιστού λόγω απολίνωσης και μόλυνση λόγω απελευθέρωσης μικροβιακού φορτίου από το έντερο ³⁷¹. Στη συνέχεια, δημιουργείται περιτονίτιδα και μεταφορά των βακτηρίων στην κυκλοφορία. Αυτό το μοντέλο βιοχημική απόκριση στον ξενιστή (αύξηση των DAMPs), με επαγωγή κυρίως της επίκτητης ανοσίας ³⁷². Ένα πλεονέκτημα του CLP είναι ότι με την κατάλληλη ρύθμιση (διάμετρος της βελόνας, μήκος τυφλού που απολινώνεται ή αριθμός διατρήσεων) μπορεί να αλλάξει η σοβαρότητα της σήψης και η επικείμενη θνησιμότητα των ποντικών ^{329,361}.

Στα μειονεκτήματα του CLP συγκαταλέγεται η μεταβλητότητα του αποτελέσματος της τεχνικής λόγω χειρισμού ακόμη και στον ίδιο χειριστή, η διαφοροποίηση ανάλογα με την ηλικία και το στέλεχος του ποντικού ³⁷³, ανάλογα με το περιεχόμενο του τυφλού (σύσταση των κοπράνων) ³⁷⁴, αλλά και τη διατροφική κατάσταση του ποντικού (νηστικό, είδος τροφής) ³⁷⁵. Ένας επιπλέον περιορισμός του μοντέλου CLP είναι ότι συχνά ο ξενιστής τείνει να «απομονώνει» τη μολυσμένη περιοχή δημιουργώντας ένα ενδοκοιλιακό απόστημα, με αποτέλεσμα τα ποντίκια να μην μεταβαίνουν σε σηπτικό σοκ και η κατάσταση από οξεία φλεγμονή να γίνεται χρόνια ³²⁹. Σε μελέτες έχει αναφερθεί ότι η φυσιολογική απόκριση του ξενιστή στο μοντέλο CLP εξαρτάται από το υγρό αναβίωσης, διαφορετικά η θνητότητα των ποντικών είναι μεγάλη, καθώς δεν ανακτούν τη φυσιολογική αιμοδυναμική τους κατάσταση ³⁷⁶. Επιπλέον, στην εφαρμογή του CLP πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το είδος της χρησιμοποιούμενης αναισθησίας, καθώς έχουν παρατηρηθεί διαφορετικές επιδράσεις στους ξενιστές ³⁷⁷.

Το πειραματικό μοντέλο σήψης CASP στα ποντίκια περιλαμβάνει εμφύτευση ενδοαυλιακής πρόθεσης (stent) συγκεκριμένης διαμέτρου στο άνω τμήμα του παχέος εντέρου με λαπαροτομία ³⁷⁸. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συνεχής ροή των περιεχομένων του εντέρου, που περιέχουν εντερικά βακτήρια, στην περιτοναϊκή κοιλότητα με αποτέλεσμα την πρόκληση πολυμικροβιακής σήψης και διάχυτης περιτονίτιδας ³⁵⁹. Στα πλεονεκτήματα του μοντέλου CASP συγκαταλέγεται η συνεπακόλουθη βακτηριαιμία με αυξημένα επίπεδα LPS στην κυκλοφορία καθώς και ότι ο χειριστής μπορεί να ελέγξει – ρυθμίσει την ένταση της ασθένειας και το μέγεθος της φλεγμονής. Το μοντέλο CASP αναπαράγει την οργανική δυσλειτουργία που παρατηρείται στην ανθρώπινη σήψη, μιας κι έχουν αναφερθεί βλάβες σε πνεύμονα, νεφρούς και η δυσκολία εφαρμογής του μοντέλου ³²⁹.

1.6.2. Περιορισμοί των πειραματικών μοντέλων σήψης σε ποντίκια

Παρόλο που η χρήση μοντέλων σήψης σε ποντίκια κρίνεται απαραίτητη για την κατανόηση των μηχανισμών παθοφυσιολογίας της σήψης και την προσπάθεια φαρμακοθεραπευτικής προσέγγισης ³⁷⁶ με στόχο τη μείωση της θνησιμότητας και τη βελτίωση της κατάστασης των ασθενών, είναι σαφές ότι δεν υπάρχει τέλειο πειραματικό μοντέλο σήψης. Παρά τα πολύ μεγάλα ποσά που έχουν δαπανηθεί στην έρευνα για τη σήψη, η θνησιμότητα λόγω σήψης παραμένει υψηλή ³³². Θεραπείες που είχαν θετικό αποτέλεσμα σε προκλινικές μελέτες σε ποντίκια αποδείχθηκαν αναποτελεσματικές στους ανθρώπους και σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, χειροτέρευσαν την κατάσταση των ασθενών ³⁸⁰, εγείροντας ερωτήματα σχετικά με την καταλληλότητα των ζωικών μοντέλων αναφορικά με τη σήψη ³⁸¹.

Οι περιοριστικοί παράγοντες όσον αφορά τη συσχέτιση της βασικής έρευνας για τη σήψη σε ποντίκια με την κλινική εφαρμογή στον άνθρωπο είναι οι διαφορές ανάμεσα σε άνθρωπο και ποντικό, οι διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη ποντικών, η επίδραση του περιβάλλοντος και της ηλικίας, η μεγάλη ετερογένεια στον ανθρώπινο πληθυσμό, οι τυχόν συνυπάρχουσες ασθένειες, η δυνατότητα παροχής υποστηρικτικής φροντίδας, οι διαφορές στην ένταση της ασθένειας ανάμεσα στα δύο είδη, η διαφορετική χρονική και ανοσολογική απόκριση στη σήψη ³²⁹. Στα πειραματικά ζωικά μοντέλα η θεραπεία χορηγείται σε καθορισμένο χρονικό σημείο πριν ή μετά την έναρξη της σήψης, κάτι που είναι αδύνατο να επιτευχθεί στην ανθρώπινη σήψη ³⁴³. Επίσης, άλλοι περιορισμοί σχετικά με τη χρήση πειραματικών μοντέλων σήψης περιλαμβάνουν την ώρα διεξαγωγής του πειράματος, αναλγητικά, αναισθητικά, αντιβιοτικά, καθώς και τον όγκο του υγρού αναβίωσης ³⁶².

Ο κυριότερος περιορισμός των πειραματικών μοντέλων σήψης σε ποντίκια σχετίζεται με τις διαφορές ανθρώπου – ποντικού. Το ανθρώπινο γονιδίωμα όντας κατά 14% μεγαλύτερο (2,9 έναντι 2,5 Gb) από εκείνο του ποντικού, διαθέτει περίπου 300 γονίδια που δεν υπάρχουν αντίστοιχα στο γονιδίωμα του ποντικού. Εκτός από διαφορές σε γονίδια που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή, την ανοσία και την όσφρηση (Mouse Genome Sequencing Consortium) 382, υπάρχουν διαφορές στην έμφυτη και επίκτητη ανοσία. Ο κύριος τύπος λευκοκυττάρων στο αίμα του ανθρώπου είναι τα ουδετερόφιλα (50-70%) τα οποία παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια (defensins), ενώ στο ποντίκι επικρατούν τα λεμφοκύτταρα (75-90%). Η ενεργοποίηση των μακροφάγων του ποντικού με LPS ή IFN-γ επάγει την έκφραση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), σε αντίθεση με τα ανθρώπινα μακροφάγα. Όσον αφορά την επίκτητη ανοσία, είναι σημαντικές οι διαφορές μεταξύ ανθρώπου και ποντικού στην έκφραση των υποδοχέων FcR και των ισοτύπων ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulins), στην αλλαγή τάξης αντισωμάτων, στην ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων που σχετίζεται με τα διαφορετικά σηματοδοτικά μόρια, στην ανάπτυξη, ρύθμιση κι ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα διαφορές στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TCR ³²⁹. Επίσης, διαφέρουν το μέγεθος και ο χρόνος έναρξης της ανοσολογικής απόκρισης από τη μόλυνση ανάμεσα στον άνθρωπο και το ποντίκι ³⁷⁹.

Εκτός από τις διαφορές ανάμεσα στον άνθρωπο και το ποντίκι, οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών στελεχών ποντικών δημιουργούν περαιτέρω πολυπλοκότητα ως προς

την αξιοποίηση των πειραματικών μοντέλων για τη σήψη και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στελέχη inbred ποντικών, που χρησιμοποιούνται κυρίως στην έρευνα για τη σήψη, μπορεί να ποικίλλουν ως προς τα χαρακτηριστικά της ανοσολογικής απόκρισης ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων και πολυμορφισμών, επηρεάζοντας την έμφυτη και την επίκτητη ανοσία (TLR, NLR, παράγοντες του συμπληρώματος κ.λπ.). Η επίκτητη ανοσία ποικίλλει στα διάφορα στελέχη ποντικών ανάλογα με την επιλεκτική πόλωση των Τ βοηθητικών κυττάτων. Για παράδειγμα, τα ποντίκια C57BL/6 δείχνουν κυρίως Τ_{H1}- απόκριση που συνεπάγεται ενεργοποίηση των μακροφάγων και της κυτταρικής ανοσίας, ενώ άλλα στελέχη ποντικών κι ενεργοποίηση των μακροφάγων και της συνέπεια, οι παραπάνω ανοσολογικές διαφοροποιήσεις επηρεάζουν το αποτέλεσμα σε μελέτες ευαισθησίας σε παθογόνους παράγοντες ³⁸³.

Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας στη χρήση πειραματικών μοντέλων σήψης σε ποντίκια είναι το περιβάλλον. Τα εργαστηριακά ποντίκια ζουν σε συγκεκριμένες «καθαρές» συνθήκες απαλλαγμένες από παθογόνους παράγοντες (SPF), με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό τους σύστημα να είναι ανώριμο, παρουσιάζοντας έλλειψη διαφοροποιημένων Τ κυττάρων δράσης και Τ κυττάρων μνήμης, γεγονός που αντιστοιχεί στο ανοσοποιητικό σύστημα ενός νεογνού. Άρα, η πρόκληση ιδιαίτερα πολυμικροβιακής σήψης ενδέχεται να έχει επιπτώσεις στην ανοσολογική απόκριση των ποντικών ^{361,384}.

Η ηλικία και το φύλο των ποντικών είναι δύο παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν πρόκειται για εξαγωγή συμπερασμάτων στην έρευνα για τη σήψη. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η σήψη εμφανίζεται κυρίως σε ανθρώπους ηλικίας άνω των 65 ετών. Ωστόσο, στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα σήψης χρησιμοποιούνται ποντίκια 6-10 εβδομάδων, ηλικία που αντιστοιχεί σε εφήβους και νεαρά άτομα στους ανθρώπους. Η πρόκληση σήψης σε ηλικιωμένα ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα ποσοστά θνητότητας συγκριτικά με τα νεαρότερα σηπτικά ποντίκια και αυξημένη ευαισθησία στο LPS. Επιπλέον, η χρήση γηρασμένων ποντικιών αυξάνει πολύ το κόστος της έρευνας, ενώ η διαθεσιμότητά τους είναι μειωμένη. Όσον αφορά το φύλο, γενικά χρησιμοποιούνται αρσενικά ποντίκια στη μελέτη της σήψης για την αποφυγή διαφοροποιήσεων λόγω ορμονών, μιας κι έχει βρεθεί αυξημένη επιβίωση των θηλυκών με σήψη ^{329,361}.

Από τις μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στα πειραματικά ζωικά μοντέλα σήψης και στη σήψη στον άνθρωπο είναι η ετερογένεια που υπάρχει στους ανθρώπους και οι τυχόν συνυπάρχουσες ασθένειες. Τα inbred ποντίκια παρουσιάζουν γενετική ομοιομορφία, με συνέπεια τα πειραματικά μοντέλα σήψης σε ποντίκια να μην μπορούν να αναπαραστήσουν τη γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται στους ανθρώπους. Επίσης, η μελέτη της σήψης σε υγιή νεαρά ποντίκια δεν αντικατοπτρίζει την κλινική εικόνα στον ανθρώπινο πληθυσμό. Ασθενείς που παθαίνουν σήψη, συχνά νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα κι ενδεχομένως εμφανίζουν επιπλοκές, όπως οξεία νεφρική βλάβη ή πολυοργανική βλάβη ή αδυναμία να επανέλθουν στην πρότερη υγιή κατάσταση. Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις είναι δύσκολο να αναπαραχθούν στα πειραματικά μοντέλα σήψης ³²⁹.

Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα στην αναπαραγωγή της ανθρώπινης σήψης σε ποντίκια είναι η αδυναμία αιμοδυναμικής παρακολούθησης των ποντικών αλλά και παροχής υποστηρικτικής θεραπείας (καρδιαγγειακή και πνευμονική υποστήριξη, θεραπεία νεφρικής αντικατάστασης, έγχυση φαρμάκων για υπόταση, αντιβιοτικών, εντερικής και παρεντερικής θρέψης κ.λπ.) κυρίως λόγω του μικρού τους μεγέθους ³⁸⁰. Παράλληλα, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διαφορά στη χρονική απόκριση στη σήψη ανάμεσα στον άνθρωπο και τα ζωικά πειραματικά μοντέλα. Στον άνθρωπο η σήψη αναπτύσσεται σε χρονικό εύρος ωρών έως ημερών ενώ στο ποντίκι ξεκινά άμεσα εντός λεπτών, με την πολυοργανική βλάβη να καθυστερεί στον άνθρωπο έως και εβδομάδες, σε αντίθεση με το ποντίκι που συμβαίνει μέσα σε ώρες. Τέλος, τα διάφορα πειραματικά μοντέλα σήψης σε ποντίκια προκαλούν διαφορετική ανοσολογική απόκριση στον ξενιστή και παρουσιάζουν διαφορές ως προς το θανατηφόρο αποτέλεσμα. Γενικά δεν υπάρχει συμφωνία σχετικά με το ποιο πειραματικό μοντέλο αναπαριστά καλύτερα τη σήψη στον άνθρωπο ^{329,359}.

Για τη βελτίωση των ζωικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται στη σήψη, σε ένα συνέδριο που διεξήχθη στη Βιέννη το 2017 μια ομάδα ειδικών επί της σήψης επιχείρησαν τη θέσπιση μιας σειράς οδηγιών για την τυποποίηση των προκλινικών μοντέλων σήψης, η οποία ορίστηκε ως MQTiPSS (minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies). Η ανάγκη αυτή ήταν επιτακτική μιας και τόσο οι κλινικοί ορισμοί της σήψης όσο και οι οδηγίες διαχείρισης των σηπτικών ασθενών (surviving sepsis campaign guidelines) έχουν αναβαθμιστεί και τροποποιηθεί 3 φορές, ενώ αντίθετα, δεν υπήρξε καμία προσπάθεια τυποποίησης και διαχείρισης της προκλινικής έρευνας για τη σήψη ³⁸⁵.

Η ετερογένεια των σηπτικών ασθενών πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη, μιας και οι ασθενείς που λαμβάνουν μέρος σε μια κλινική μελέτη παρουσιάζουν διαφορές ως προς την πηγή της σήψης, την εξέλιξη του σηπτικού συνδρόμου, τα επίπεδα φλεγμονής και άρα, ως προς την απόκριση στη θεραπεία. Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσεκτική επιλογή και υποκατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει συγκεκριμένων παραμέτρων ή βιοδεικτών ³⁴³.

1.6.3. Ο ρόλος του LPC στη φλεγμονή

Έχει βρεθεί ότι το LPC -το υπόστρωμα της ΑΤΧ- αυξάνεται στις περιοχές με φλεγμονή. Το LPC επάγει τον προφλεγμονώδη διαμεσολαβητή COX-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και σε μακροφάγα που είχαν δεχθεί LPS. Η COX-2 μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ

(AA), το οποίο παράγεται ταυτόχρονα με το LPA από την PLA₂, σε προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες, που είναι σημαντικά προφλεγμονώδη λιπίδια, υποδεικνύοντας την πιθανή ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης από τα φωσφολιπίδια. Έχει αναφερθεί ότι και το LPA -το προϊόν της ATX- επάγει την έκφραση της COX-2 στα στρωματικά κύτταρα ²².

Το LPC δρα μέσω πολλών μονοπατιών στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους διαδραματίζοντας ρόλο στη φλεγμονή: επάγει την ενεργοποίηση της PKC, η οποία αυξάνει την έκφραση της P-σελεκτίνης στα ενδοθηλιακά και τα αιμοπετάλια, αυξάνοντας έτσι την «κύλιση» των λευκοκυττάρων και την κυτταρική προσκόλληση, ρυθμίζει την έκφραση του NF-κB στα ενδοθηλιακά κύτταρα ανάλογα με τη συγκέντρωσή του στο σημείο της φλεγμονής, ελέγχοντας έτσι τη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού και την εξαγγείωση των μεσολαβητών. Το LPC επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη χημειοταξία των πρωτογενών μακροφάγων, των T λεμφοκυττάρων, των T κυττάρων φυσικών φονιάδων και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ώριμα δενδριτικά κύτταρα. Τέλος, το LPC μπορεί

1.6.3.1. Ο ρόλος του LPC στη σήψη

Μειωμένα επίπεδα LPC σχετίζονται με αυξημένη θνητότητα σε ασθενείς με σήψη, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την ανοσοκατασταλτική δράση του LPC μέσω πρόσδεσής του στον υποδοχέα G2A, ο οποίος εκφράζεται σε ουδετερόφιλα, Τ κύτταρα και μακροφάγα και μειώνει την κυτταρική ανάπτυξη σε συνθήκες στρες ^{386,387}. Επίσης, η συγκέντρωση του LPC στον ορό σηπτικών ασθενών με βακτηριαιμία ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς βακτηριαιμία ³⁸⁸. Η χορήγηση LPC σε 3 σηπτικά μοντέλα ποντικών είχε προστατευτική δράση ενάντια στη σήψη μειώνοντας τη μικροβιακή μόλυνση κι αυξάνοντας τη βακτηριοκτόνο δράση των ουδετερόφιλων ³⁸⁹. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το LPC προστατεύει από την πειραματική σήψη μέσω μείωσης της κυτταροκίνης HMGB1 ³⁹⁰. Το LPC εμπλέκεται στην παραγωγή υπεροξειδίου από τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα, γεγονός που αποτελεί πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή ενάντια στη λοίμωξη και στη δράση αυτή διαδραματίζει ρόλο η ακυλ-αλυσίδα του LPC ²².

Δεδομένου ότι το LPC μπορεί να μετατραπεί σε LPA με τη δράση της ATX *in vivo*, οι παραπάνω δράσεις του LPC θα μπορούσαν τουλάχιστον εν μέρει να αποδοθούν στο LPA. Μία μελέτη έδειξε ότι το LPA έδρασε προστατευτικά σε ένα μοντέλο επαγόμενης από το LPS σήψης σε ποντίκια μέσω αναστολής των προφλεγμονωδών αντιδράσεων λόγω ενδοτοξίνης και ότι έχει αντι-φλεγμονώδη δράση μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών ERK 1/2, των φωσφατασών σερίνης/ θρεονίνης και κινάσης της 3φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης ³⁹¹. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι το παρόμοιο με το LPA λυσοφωσφολιπίδιο S1P αναστέλλει την TLR-διαμεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση από τα ανθρώπινα Τ λεμφοκύτταρα ³⁹². Η διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους το LPC προστατεύει από τη σήψη και το αν το LPA εμπλέκεται στην προστατευτική αυτή δράση, θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις ²².

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Σκοπός

Η έκφραση της ΑΤΧ και η παραγωγή του LPA είναι απαραίτητες στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού, καθώς η καθολική γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ στο έμβρυο οδηγεί στο θάνατο του εμβρύου λόγω βλάβης στα αγγεία και στο νευρικό σωλήνα. Στην ενήλικη ζωή η ΑΤΧ παρουσιάζει ευρεία έκφραση σε όλους τους ιστούς, ενώ έχει βρεθεί αυξημένη σε αρκετές χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις αλλά και στον καρκίνο. Σε ζωικά μοντέλα αρκετών ασθενειών, η υπό όρους στοχευμένη εξάλειψη της ΑΤΧ στην παθογένεια των ασθενειών, η υπό όρους στοχευμένη εξάλειψη της ΑΤΧ στην παθογένεια των ασθενειών. Δεδομένης της εμπλοκής του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, η ΑΤΧ θεωρείται ως πιθανός φαρμακευτικός στόχος για τη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου, της χρόνιας φλεγμονής, ασθενειών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, των αυτοάνοσων νοσημάτων αλλά και του μεταβολικού συνδρόμου.

Η αρχική στοχοθεσία ήταν να ελεγχθεί εάν η θεραπευτική στόχευση της ΑΤΧ στο ενήλικο ποντίκι επιφέρει κάποια τοξικότητα στον οργανισμό, προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα του κατά πόσο η ΑΤΧ είναι ασφαλές να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικός στόχος. Επιπλέον, δεδομένης της εμπλοκής του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA στη χρόνια φλεγμονή, τέθηκε το ερώτημα του ρόλου της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή. Ο σκοπός λοιπόν της παρούσας διατριβής ήταν διττός. Επιχειρήθηκε η διερεύνηση του ρόλου του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA **Α**. στην ενήλικη φυσιολογία του ποντικού και **Β**. στη συστεμική φλεγμονή.

Για την επίτευξη του πρώτου στόχου, η προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν η μελέτη των επιδράσεων α) της καθολικής γενετικής εξάλειψης της ATX στον ενήλικο ποντικό και β) της παρατεταμένης ισχυρής φαρμακολογικής αναστολής της ATX. Με τον τρόπο αυτό, εξετάστηκε η «ασφάλεια» και καταλληλότητα της απαλοιφής της ATX από τον οργανισμό, δεδομένου του σημαντικού φυσιολογικού ρόλου της σηματοδότησης του άξονα ATX/LPA στην επιδιόρθωση και ανάπλαση των ιστών.

Για την επίτευξη του δεύτερου στόχου, η προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν η παρακολούθηση της επιβίωσης-θνησιμότητας έπειτα από πρόκληση πειραματικής συστεμικής φλεγμονής με έγχυση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) σε διαγονιδιακά ποντίκια που A) υπερεξέφραζαν ATX (200%). B) παρουσίαζαν μειωμένα κατά 50% επίπεδα ATX στην κυκλοφορία. Γ) σε ποντίκια με ακόμη χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης της ATX, στα οποία είχε απενεργοποιηθεί γενετικά η ATX και προέκυψαν από τον πρώτο στόχο της παρούσας διατριβής. Σε knockout ποντίκια ως προς Δ) τον υποδοχέα LPA₁ και E) τον υποδοχέα LPA₂. Επίσης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ATX στον ορό και στο πλάσμα σηπτικών ασθενών.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Χημικές ουσίες, αντιδραστήρια, εργαστηριακός εξοπλισμός

3.1.1. Χημικές ουσίες – Αντιδραστήρια

Οι χημικές ουσίες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις εξής εταιρείες: Πρωτεϊνάση K: Roche, 3115879, 100 mg, Tris: Fisher Bioreagents BP 152-5, EDTA: Applichem Panreac A2937, SDS: Fisher Scientific BP166-500, Tamoxifen: Sigma T-5648, LPS: from Escherichia coli O111:B4 Sigma L4130, Οξειδάση της χολίνης από Alcaligenes sp., 0215349290- 500U, MP Biomedicals Santa Ana CA, Αγαρόζη: Sigma. Tri Reagent: Molecular Research Center, Inc, TR118, DNase: Promega (RQ1 RNase-free DNase) M6101, Αντίστροφη μεταγραφάση: M-MLV Promega M170B και peqGOLD M-MuLV PEQLAB V0211, SsoFast[™] EvaGreen Supermix Bio-Rad 172-5205, Αντιδραστήριο Bradford: R1271, OCT: VW-361603E VWR Chemicals, BDH Prolabo, Molecular grade DNase-RNase-free dH₂O: Gibco, dNTPs: R0181 Fermentas, Triton X: Fluka, Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Protran Whatman plc Maidstone, Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL: 32109 Pierce, Thermo Scientific, LPA κι LPC είδη: Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, Ανασυνδυασμένη ΑΤΧβ: R&D Minneapolis, MN, Διαλύτες για HPLC (μεθανόλη, χλωροφόρμιο, εξάνιο, ισοπροπανόλη, αμμωνιακό άλας του φορμικού οξέος): Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Αντιδραστήριο TOOS: TCI Europe Antwerp, Choline chloride, 4-AAP και HRP: Sigma, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine): T2885 Sigma, BSA (Bovine serum albumin): A9647 Sigma, Ab rabbit a-ATX: Cayman, rATX: 6187-EN R&D Systems, ENPP2-8H (AGF06181012): Ascent Gene Inc, Ab a-rabbit 4010-05 Southern Biotech, διηθητικό χαρτί: Whatman 3mm.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα rat a-ATX 4F1 ήταν ευγενική προσφορά από τον Dr. J. Aoki.

3.1.2. Πλαστικός - γυάλινος εργαστηριακός εξοπλισμός

Πλαστικά ακροφύσια και ρύγχη των 1000, 200, 20 και 10 μl (tips): Costar, Sarstedt Αποστειρωμένοι σωλήνες με βιδωτό πώμα των 15 και 20 ml: Corning, Falcon Πλαστικά σωληνάρια των 0.5, 1.5 και 2 ml: Eppendorf, Greiner bio-one, Sarstedt Αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες, γυάλινες πιπέτες Pasteur, τρυβλία Μικροπλάκες 96-θέσεων για Elisa: Nunc, Maxisorp plate Μικροπλάκες 96-θέσεων για TOOS: Costar

3.1.3. Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Πιπέτες: Gilson (P10, P20, P200, P1000), πολυκάναλη πιπέτα Φυγόκεντροι: Biofuge pico, Heraeus Instruments και ThermoScientific Ψυχόμενες φυγόκεντροι: ThermoScientific και Heraeus Fresco17 centrifuge Φωτόμετρα: Molecular devices, Optimax microplate Reader και Tecan Φθορισμόμετρο: Tecan, Επωαστήρες: Memmert, Ανακινούμενοι επωαστήρες: New Brunswick Scientific, C25 Incubator Shaker Ανακινούμενη πλάκα ανάδευσης: Labnet Orbit 1000 Κατάψυξη -20°C και -80°C: Liebherr Comfort, Υδατόλουτρα, Heatblock: VWRScientific Products και Techne Dri-Block DB-3, Ζυγοί: Kern, αναλυτικός ζυγός, PH μετρο: Inolab WTW Συσκευή UV, Σύστημα φωτογράφισης: Geldoc-It Imaging System W/Gel HR Cam Συσκευές ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικά: Bio-Rad, Φούρνος μικροκυμάτων: LG Θερμοκυκλοποιητής DNA: Bio-Rad, PeqGold Θερμοκυκλοποιητής Real-time: Bio-Rad CFX96 Touch[™] Real-time PCR Detection System Θερμαινόμενη πλάκα ανάδευσης: LABINCO Magnetic Stirrer, Model L-71 Συσκευή απιονισμού ύδατος: Milli-Q, Synergy UV, Millipak Express 20 Μικροτόμος, Κρυοτόμος, Συσκευή εμφάνισης western: Chemidoc imaging system, BioRad Μικροσκόπιο: Nikon Eclipse E800, Nikon Corp., Shinagawa-ku Σύστημα φωτογράφισης μικροσκοπίου: Q Imaging EXI Aqua digital camera Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου πρωτεϊνών: Versatile mini-Protean 3 electrophoresis cell, Biorad Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης: Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer system Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules Βιοχημικός αναλυτής: Abbott Architect 8200, Αιματολογικός αναλυτής: Cell-Dyn 3700 Υγρός χρωματογράφος: RSLCnano, Ultimate 3000 Series, Dionex Corporation Χρωματογραφική στήλη Luna Silica Phenomenex, Phenomenex, Torrance, CA Φασματόμετρο μάζας: LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific, Waltham, MA

3.2. Πειραματόζωα

3.2.1. Συνθήκες διαβίωσης και πειραματικού χειρισμού των ποντικών

Η αναπαραγωγή των ποντικών έγινε στις εγκαταστάσεις της μονάδας πειραματοζώων του Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών Αλέξανδρος Φλέμινγκ, σε καθαρό περιβάλλον. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 20–22°C, η υγρασία κυμαινόταν σε επίπεδα 55±5%, η εναλλαγή φωτός-σκότους γινόταν ανά 12 ώρες, ενώ η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα στα ποντίκια κατά βούληση. Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν γενετικό υπόβραθο C57BL/6, εκτός από τα LPAR1 knock-out (ko) ποντίκια που είχαν μικτό γενετικό υπόβαθρο C57BL/6-129Sv, στο οποίο διατηρήθηκαν για πάνω από δέκα γενιές. Η όλη διαδικασία υπόκειτο στους κανόνες του Π.Δ. 160/91, εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής και δεοντολογίας του ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ (#376) και ανταποκρίθηκε στα διεθνή πρότυπα καθώς και στις σχετικές οδηγίες της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης (#5365), προκειμένου να αποφευχθεί ο πόνος, η αγωνία και η ταλαιπωρία των πειραματοζώων.

Ποντίκια ίδιας ηλικίας (8-11 εβδομάδων) και φύλου κατανεμήθηκαν με τυχαίο τρόπο στην πειραματική ομάδα και στις ομάδες ελέγχου. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διατριβής δεν απαιτήθηκε η χρήση αναισθητικού ή αναλγητικού, καθότι δε χρησιμοποιήθηκαν παρεμβατικές ή επίπονες τεχνικές. Η κατάσταση υγείας των ποντικών ελεγχόταν σε καθημερινή βάση ή πιο συχνά (ανά 4-6 ώρες για τις καμπύλες βιωσιμότητας των ζώων). Τα ζώα θανατώνονταν στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία ή πιο νωρίς όταν αυτό κρινόταν απαραίτητο, για παράδειγμα όταν υπήρχε απώλεια βάρους της τάξης του 20%.

3.2.2. Συνθήκες αναπαραγωγής των ποντικών

Το σύνηθες μοντέλο αναπαραγωγής των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν ένας αρσενικός με δύο θηλυκές. Η κύηση στα ποντίκια διαρκεί 20-22 ημέρες. Τις πρώτες 8 ημέρες ζωής των ποντικών πρέπει να αποφεύγεται η άμεση επαφή μαζί τους για την ελάττωση του στρες των νεογέννητων. Μεταξύ των 10-12 ημερών ζωής τους κόβεται δάχτυλο, προκειμένου να γίνεται η αναγνώριση των ζώων, καθώς και ένα μικρό τμήμα της ουράς (2 mm) για τον προσδιορισμό του γενοτύπου. Ο απογαλακτισμός των παιδιών γίνεται στις 25 ημέρες, όπου χωρίζονται από τους γονείς τους, καθώς και τα αρσενικά από τα θηλυκά.

3.2.3. Σειρές ποντικών

Γενότυπος	Γενετικό υπόβαθρο	Αναφορά
Wt	C57BI/6	393
Enpp2 ^{n/n}	C57BI/6	11
Enpp2 ^{dflx/+}	C57BI/6	11
Enpp2 Tg	C57BI/6	189
R26CreER ^{T2}	C57BI/6	394,395
Rosa26	C57BI/6	396

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω σειρές ποντικών

LPAR1 ko	C57BL/6-129Sv	114
LPAR2 ko	C57BL/6-129Sv	165

3.2.4. Θανάτωση των ποντικών και λήψη των ιστών

Η θανάτωση των ποντικών πραγματοποιείται με σταδιακή πλήρωση του θαλάμου με CO₂. Αφού επιβεβαιωθεί ο θάνατος του ζώου, με τη χρήση ψαλιδιού δημιουργείται μία τομή στο δέρμα και στη συνέχεια ανοίγεται προκειμένου να εμφανισθούν τα όργανα. Αρχικά κόβεται το διάφραγμα και με προσοχή, αφαιρείται ένα τμήμα του στέρνου προκειμένου να υπάρχει άμεση οπτική επαφή με την καρδιά του ζώου.

Πρώτα γίνεται λήψη αίματος με σύριγγα του 1 ml 26 G από την κάτω φλέβα στην περιτοναϊκή κοιλότητα του ποντικού (300-800 μl). Το αίμα τοποθετείται σε σωληνάριο των 1.5 ml, στο οποίο προστίθεται 1/10 του όγκου του αίματος 0.5 M EDTA pH 8.0 (τελική συγκέντρωση 50 mM EDTA, pH 8.0) ως αντιπηκτικό. Το μίγμα αναδεύεται ήπια και φυλάσσεται στον πάγο. Για τη λήψη του πλάσματος ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 2000 g για 20 min στους 4°C.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απομάκρυνση του αίματος από τα όργανα και την κυκλοφορία με διάχυση 10-20 ml διαλύματος 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) στην καρδιά (perfusion). Από το κάθε όργανο λαμβάνονται δύο κομμάτια 50-100 mg ιστού έκαστο, για απομόνωση RNA και πρωτεϊνών αντίστοιχα, και τοποθετούνται σε δύο σωληνάρια των 1.5 ml, τα οποία ψύχονται αυθωρεί σε υγρό άζωτο (-196°C ή -320.44°F) (snap frozen). Μετέπειτα, οι ιστοί φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την επεξεργασία τους. Ο υπόλοιπος ιστός λαμβάνεται για ιστολογική παρατήρηση.

Όσον αφορά στον πνεύμονα, γίνεται έγχυση με καθετήρα από την τραχεία 1 ml φορμαλίνης 10% ή διαλύματος OCT/PBS (1:2) ή 4% PFA (ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος) και ο πνεύμονας σταθεροποιείται διογκωμένος με χειρουργικό ράμα στην τραχεία. Κατόπιν αφαιρείται με προσοχή, μαζί με καρδιά, τραχεία και θύμο αδένα. Το έντερο αφαιρείται προσεκτικά από το ποντίκι και από 4 διαφορετικά τμήματα (δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα, ειλεό, κόλον), λαμβάνονται κομμάτια μήκους περίπου 4-5 cm έκαστο. Ακολουθεί έκπλυση του αυλού κάθε τμήματος με 1 x PBS (flashing) για απομάκρυνση του περιεχομένου. Έπειτα, τα τμήματα του εντέρου ευθυγραμμίζονται, τοποθετούνται πάνω σε κομμάτια φελλού, γεμίζονται με φορμαλίνη 10% ή διάλυμα OCT/PBS (1:2) (ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος) και σταθεροποιούνται. Τα υπόλοιπα όργανα δε χρήζουν κάποιας ιδιαίτερης κατεργασίας πριν τη μονιμοποίηση.

Διαλύματα

3.3. Επεξεργασία των ιστών για (ανοσο)ιστολογική εξέταση

3.3.1. Δείγματα για μικροτόμο

- 1. Ο ιστός υπόκειται σε μονιμοποίηση με 10% φορμαλίνη (φορμαλδεΰδη) για 24 h στους +4°C. Η μονιμοποίηση διατηρεί τη μορφολογική και χημική σύσταση του ιστού, χάρη στους δεσμούς που σχηματίζει η φορμαλίνη με τις πρωτεΐνες (κυρίως με τα κατάλοιπα λυσίνης). Η μονιμοποίηση γίνεται αμέσως μετά τη λήψη του ιστού για την αποφυγή της αυτόλυσης ή της επιμόλυνσης.
- Η περαιτέρω επεξεργασία του ιστού περιλαμβάνει σταδιακή αφυδάτωση και διαύγαση, όπου διαλύεται το λίπος του ιστού.
- Ακολουθεί παραφινοποίηση κι εγκλεισμός σε κασέτες σκήνωσης. Η παραφίνη λειτουργεί ως στερεωτικό μέσο. Οι ιστοί εγκλεισμένοι στις κασέτες παραφίνης διατηρούνται για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίου δωματίου.
- 4. Έπειτα, από τα μπλοκ παραφίνης λαμβάνονται οι επιθυμητές τομές των ιστών στο μικροτόμο, πάχους 3-5 μm, οι οποίες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες και αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται χρώση για την παρατήρηση των επιμέρους συστατικών του εκάστοτε ιστού στο μικροσκόπιο.

3.3.2. Δείγματα για κρυοτόμο

Ο ιστός αμέσως μετά τη λήψη του, τοποθετείται σε αυτοσχέδιες θήκες από αλουμινόχαρτο, καλύπτεται προσεκτικά με OCT (στερεωτικό μέσο για κρυοτομές) και ψύχεται πάραυτα σε υγρό άζωτο. Ο πνεύμονας απαιτεί επιπλέον κατεργασία εξαιτίας της αρχιτεκτονικής της δομής του. Πρώτα χρειάζεται μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA) και στη συνέχεια κρυοσυντήρηση σε διάλυμα 30% σουκρόζης για λίγες ώρες στους +4°C πριν την ψύξη σε OCT με ξηρό πάγο. Οι ιστοί σε παγωμένο OCT φυλάσσονται στους -80°C.

3.4. Τεχνολογία ανασυνδυασμού Cre/LoxP γονιδιακής στόχευσης

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνολογία ανασυνδυασμού Cre/LoxP δίνει τη δυνατότητα για επιλεκτική στόχευση ενός γονιδίου, επιτρέποντας την ιστοειδική απενεργοποίηση ή ενεργοποίησή του και πραγματοποιείται από ειδικά ένζυμα ανασυνδυασμού. Η χρήση της Cre ανασυνδυάσης (<u>C</u>auses <u>Re</u>combination) από το βακτηριοφάγο P1 έχει αποτελέσει ένα χρήσιμο γενετικό

εργαλείο για την υπό συνθήκες στόχευση γονιδίων στον ποντικό ³⁹⁷. Στο σύστημα ανασυνδυασμού Cre-*loxP*, η Cre ανασυνδυάση, η οποία είναι μία τύπου Ι τοποϊσομεράση, καταλύει τον τοποειδικό DNA ανασυνδυασμό ανάμεσα στις θέσεις αναγνώρισης *loxP* μεγέθους 34 ζ.β. Μία *loxP* θέση αποτελείται από δύο ανάστροφες επαναλήψεις 13 βάσεων (παλινδρομικές αλληλουχίες) που χωρίζονται από μία ενδιάμεση ασσύμετρη περιοχή 8 βάσεων. Εάν 2 θέσεις *loxP* έχουν εισαχθεί με τον ίδιο προσανατολισμό στον κατάλληλο γενετικό τόπο (για παράδειγμα εκατέρωθεν ενός εξονίου), τότε η έκφραση της Cre έχει ως αποτέλεσμα την απαλοιφή του τμήματος DNA που περιβάλλεται από τις *loxP* θέσεις αποκλειστικά στον ιστό στον οποίο εκφράζεται ³⁹⁸.

Το επαγόμενο σύστημα της προσωρινής γονιδιακής ρύθμισης έχει ως εξής: Η κατασκευή ενός γονιδίου σύντηξης ανάμεσα στην Cre και μία μεταλλαγμένη μορφή της περιοχής πρόσδεσης του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER[™]), εμποδίζει την πρόσδεση του φυσικού προσδέτη (17β-οιστραδιόλη) στον υποδοχέα, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, ενώ αντίθετα προσδένεται το 4-υδροξυ (OH)-Tmx. Η χιμαιρική Cre- ER[™] έχει ως αποτέλεσμα την ER[™]-εξαρτώμενη κυτταροπλασματική δέσμευση της Cre από την Hsp90, αποτρέποντας τον Cre-διαμεσολαβούμενο ανασυνδυασμό. Με την πρόσδεση όμως του Tamoxifen (Tmx) ή του παράγωγού του 4-υδροξυ (OH)-Tmx στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, η Cre απελευθερώνεται από την Hsp90, επιτρέποντας την είσοδο της Cre-ER[™] στον πυρήνα και άρα, την έναρξη του ανασυνδυασμού ^{397,399}.

3.5. Προετοιμασία του Tamoxifen

Η συγκέντρωση stock του Tamoxifen ήταν 45 mg/ml σε 10% αιθανόλη 100% (v/v) και 90% αραβοσιτέλαιο (v/v).

- Αρχικά το Tamoxifen διαλύεται στην αιθανόλη με έντονη ανάδευση (vortex). Στη συνέχεια προστίθεται το αραβοσιτέλαιο και ακολουθεί εκ νέου έντονη ανάδευση. Το σωληνάριο καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί το Tamoxifen είναι φωτοευαίσθητο.
- 2. Το μίγμα θερμαίνεται στους 55°C με επαναλαμβανόμενες έντονες αναδεύσεις.
- 3. Έπειτα, επωάζεται σε ανακινούμενο αερόλουτρο στους 37°C για 12-16 h.

Το διάλυμα του Tamoxifen φυλάσσεται στους +4°C για όσο διάστημα διαρκεί το πείραμα στα ποντίκια, ενώ κάθε φορά πριν τη χορήγησή του, το μίγμα αναδεύεται.

3.6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm.

- Το προς μέτρηση δείγμα πρωτεΐνης αραιώνεται με κατάλληλο όγκο φυσιολογικού ορού (1:20-1:40 για διάλυμα πρωτεΐνης από ιστό ποντικού).
- Ποσότητα 5 μΙ από την αραιωμένη πρωτεΐνη αναμιγνύεται με 245 μΙ αντιδραστηρίου Bradford, το οποίο έχει έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε πλάκα 96-θέσεων.
- Πραγματοποιείται επώαση για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, κατά τη διάρκεια της οποίας η πλάκα ανακινείται προστατευμένη από το φως.
- 4. Μετά το πεντάλεπτο πραγματοποιείται η μέτρηση σε φωτόμετρο στα 595 nm.

Ο προσδιορισμός γίνεται με αναφορά σε πρότυπη καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης προτύπου διαλύματος BSA (0-2 mg πρωτεΐνης).

3.7. Χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης

Αρχή της μεθόδου

Η χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης βασίζεται στο ότι η βασική χρωστική αιματοξυλίνη, χρωματίζει τους πυρήνες των κυττάρων σκούρο μπλε-μωβ, βάφοντας τα όξινα συστατικά, πχ νουκλεοπρωτεΐνες, ενώ η όξινη χρωστική ηωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα ροζ, βάφοντας τα βασικά συστατικά πχ των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

Αρχικά οι τομές, πάχους 3-5 μm, υφίστανται αποπαραφινοποίηση πριν τη χρώση, ως ακολούθως:

- Πραγματοποιείται αποπαραφινοποίηση με εμβάπτιση των τομών σε ξυλένιο για 5 min (x3 φορές).
- Ακολουθεί σταδιακή ενυδάτωση με διαδοχική εμβάπτιση των τομών σε 100 % αιθανόλη για 3 min, 96% αιθανόλη για 2 min (x2 φορές), 70% αιθανόλη για 2 min, 50% αιθανόλη για 2 min και τελική έκπλυση με dH₂O.
- Έπειτα οι τομές βάφονται με αιματοξυλίνη για 2-3 min και ξεπλένεται η περίσσεια της χρωστικής με dH₂O.
- 4. Ακολουθούν 2-3 γρήγορες εμβαπτίσεις σε 1% acid alcohol και μετά σε dH_2O .
- Στη συνέχεια, οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα Scot's για 3 min κι εκπλένονται με dH₂O.
- Ακολουθεί γρήγορη εμβάπτιση σε αιθανόλη 50% κι 70% και χρώση σε διάλυμα ηωσίνης για 3 min.
- Έπειτα, πραγματοποιείται έκπλυση με dH₂O και σταδιακή αφυδάτωση με γρήγορες εμβαπτίσεις σε αιθανόλη 50%, 70%, 96% κι 100%. Τέλος, οι τομές εμβαπτίζονται σε ξυλένιο.
- Ακολουθεί κάλυψη της κάθε τομής με καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας ως στερεωτικό μέσο DPX (συνθετική ρητίνη) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Διαλύματα

Διάλυμα Gills Haematoxylin: Haematoxylin 0.6% (w/v), Aluminum Sulphate 0.42% (w/v), Citric acid 0.14% (w/v), Sodium iodate 0.06% (w/v), Ethylene Glycol 27% (v/v). Διάλυμα Acid Alcohol 1%: Πυκνό HCl 1% (v/v) σε 70% αιθανόλη. Διάλυμα Scot's: Sodium Bicarbonate 2% (w/v), Magnesium Sulphate 0.35% (w/v).

3.8. Χρώση β-γαλακτοσιδάσης (X-gal)

Αρχή της μεθόδου

Η χρώση β-γαλακτοσιδάσης βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου β-gal που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lacZ*, να υδρολύει τα β-γαλακτοσίδια και το σχηματισμό μπλε ιζήματος έπειτα από την υδρόλυση του X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο). Ο πυρηνικός εντοπισμός του *lacZ* σε διαγονιδιακά ζώα που φέρουν το γονίδιο αναφοράς επιτρέπει με τη χρώση της β-γαλακτοσιδάσης τον εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν το γονίδιο λόγω της κυτταροπλασματικής ενδογενούς ενζυμικής δραστικότητας.

Πειραματική διαδικασία

- Ιστοί ποντικών κατεργασμένοι όπως περιγράφτηκε στην ενότητα επεξεργασία των ιστών για (ανοσο)ιστολογική εξέταση Β, υφίστανται τομές πάχους 6 μm στον κρυοτόμο.
- Στη συνέχεια, οι ιστοί μονιμοποιούνται με 2% φορμαλδεΰδη/ 0.2% γλουταραλδεΰδη για 10 min στους +4°C.
- 3. Ακολουθεί έκπλυση 2 φορές σε κρύο μίγμα 1x PBS/ 2 mM MgCl₂ για 10 min.
- 4. Έπειτα, γίνεται η χρώση με διάλυμα X-gal συγκέντρωσης 2 mg/ml σε 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού Na pH 7.3, 0.01% δεοξυχολικό Na, 5 mM K_3 Fe(CN)₆, 5.7 mM K_4 Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂, 0.02% NP-40 στους 37°C στο σκοτάδι για 12-16 h.
- 5. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιείται έκπλυση των τομών 2 φορές σε 1x PBS/ 2 mM MgCl₂ για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρώση για αντίθεση με ηωσίνη και σταδιακή αφυδάτωση σε αιθανόλες και ξυλένιο.
- 6. Ακολουθεί κάλυψη της κάθε τομής με καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας ως στερεωτικό μέσο Mowiol (υδροκολλοειδές βλεννοπροσκολλητικό με βάση την πολυβινυλική αλκοόλη) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Οι τομές μετά τη χρώση διατηρούνται στους +4°C.

3.9. Απομόνωση DNA από βιοψία ουράς ποντικού

Ένα μικρό τμήμα ουράς ποντικού περίπου 2 mm κόβεται από ποντίκι 10-12 ημερών και τοποθετείται σε σωληνάριο 1.5 ml.

- Στο σωληνάριο που περιέχει το τμήμα της ουράς προστίθενται 400 μl διαλύματος λύσης (Tail Buffer), 4 μl πρωτεϊνάσης K και το μίγμα επωάζεται στους 55°C για 12-18 h.
- Την επόμενη μέρα, αφού επιβεβαιωθεί η λύση του ιστού, προστίθενται 400 μΙ φαινόλης και το μίγμα αναδεύεται έντονα για 5 min.
- 3. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η υδατική φάση (~ 350μl) μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωληνάριο 1.5 ml.
- Στο υπερκείμενο προστίθεται ποσότητα παγωμένης ισοπροπανόλης ίση με 0,9 του όγκου του (315 μl) και το μίγμα αναδεύεται ήπια.
- 5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min στους +4°C κι απόχυση του υπερκείμενου.
- Το ίζημα εκπλένεται με 1 ml κρύας αιθανόλης 75% κι επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα.
- Τέλος, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει κι επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο H₂O Gibco (50-100 μl).

Διαλύματα

Διάλυμα λύσης (Tail Buffer): 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 1% SDS. Πρωτεϊνάση Κ: 10 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 8.0

3.10. Καθαρισμός διαλύματος DNA με αιθανολική καταβύθιση

Αρχή της μεθόδου

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη αποτελεί την κύρια μέθοδο ανάκτησης των νουκλεϊκών οξέων από υδατικά διαλύματα. Η αιθανόλη μειώνει το κέλυφος ενυδάτωσης των νουκλεϊκών οξέων, με αποτέλεσμα να ελευθερώνονται οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Κατιόντα, όπως το Na⁺ και το K⁺, δεσμεύονται στις φορτισμένες ομάδες, ελαττώνοντας τις απωθητικές δυνάμεις ανάμεσα στις νουκλεοτιδικές αλυσίδες σε βαθμό τέτοιο που να μπορεί να σχηματιστεί ίζημα ⁴⁰⁰. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει:

- Προσθήκη στο μίγμα CH3COOK 5 M μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.25 M και 2.5 όγκων 100% κρύας (-20°C) αιθανόλης
- 2. Επώαση στους -80°C για 1h

- 3. Φυγοκέντρηση στους +4°C στις 12000 rpm για 10min
- Απόρριψη υπερκείμενου κι έκπλυση του ιζήματος 3 φορές με 70% κρύα (-20°C) αιθανόλη
- 5. Ξήρανση του ιζήματος κι επαναδιαλυτοποίηση σε κατάλληλο όγκο Gibco dH2O

3.11. Παρασκευή διαλύματος φαινόλης για DNA

Αρχικά η φαινόλη, η οποία είναι με τη μορφή κρυστάλλων, επωάζεται στους 65°C για να γίνει ρευστή. Προστίθεται υδροξυκυνολίνη σε τελική συγκέντρωση 0.1%. Η χρωστική αυτή δείχνει το βαθμό οξείδωσης της φαινόλης. Πιο συγκεκριμένα, το κίτρινο χρώμα αντιστοιχεί σε μη οξειδωμένη μορφή, ενώ το πορτοκαλί/κόκκινο/καφέ αντιστοιχεί σε οξειδωμένη μορφή της φαινόλης. Ακολουθεί εξισορρόπηση του διαλύματος με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 και έντονη ανάδευση για 15 min. Το διάλυμα αφήνεται για να διαχωριστούν οι φάσεις. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων, απομακρύνεται η πάνω φάση (υδατική) και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές.

3.12. Απομόνωση RNA

3.12.1. Παρατηρήσεις όσον αφορά το χειρισμό του RNA

Οι ριβονουκλεάσες (RNάσες) είναι πολύ σταθερά κι ενεργά ένζυμα, τα οποία δεν απαιτούν άλλους παράγοντες για να δράσουν. Από τη στιγμή που οι ριβονουκλεάσες είναι δύσκολο να απενεργοποιηθούν, κι ακόμη κι ελάχιστες ποσότητες επαρκούν για να καταστρέψουν το RNA, είναι επιτακτική η χρήση αναλώσιμων τα οποία δεν είναι επιμολυσμένα με ριβονουκλεάσες. Επιπλέον, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με ριβονουκλεάσες τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, όσο και μετά την απομόνωσή του.

Κατά το χειρισμό του RNA επιβάλλεται να ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές. Τα χέρια και η σκόνη αποτελούν πιθανούς φορείς βακτηρίων και μούχλας και είναι οι πιο διαδεδομένες πηγές μολύνσεων με ριβονουκλεάσες. Η χρήση γαντιών κατά το χειρισμό των δειγμάτων, καθώς και ο σχολαστικός καθαρισμός του πάγκου εργασίας είναι επιβεβλημένες διαδικασίες για να αποτραπούν οι ριβονουκλεάσες, οι οποίες πιθανώς να προέρχονται από το δέρμα ή από σκονισμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. Τα γάντια πρέπει να αλλάζονται συχνά και τα φιαλίδια να παραμένουν με τα καπάκια κλειστά όταν δε χρησιμοποιούνται. Το RNA που απομονώνεται πρέπει να διατηρείται πάντα στον πάγο. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιείται δις αποστειρωμένος πλαστικός εργαστηριακός εξοπλισμός μιας χρήσης (tips με φίλτρο, σωληνάρια κτλ). Το νερό που χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση των ιστών υφίσταται κατεργασία με DEPC (diethyl pyrocarbonate), σε συγκέντρωση 0.2% (v/v) και αποστειρώνεται για να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη του DEPC. Το DEPC αποτελεί ισχυρό αναστολέα των ριβονουκλεασών, ενώ είναι πιθανώς καρκινογόνο και γι' αυτό ο χειρισμός του απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, με γάντια, μάσκα και πάντα μέσα σε απαγωγό.

3.12.2. Απομόνωση RNA από ιστό με χρήση του Tri Reagent

Αρχή της μεθόδου

Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η απομόνωση του RNA είναι η απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του Tri Reagent, το οποίο με το συνδυασμό φαινόλης και θειοκυανικού γουανιδίου σε ένα μονοφασικό διάλυμα, παρέχει υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικών ιόντων, τα οποία απενεργοποιούν τις RNάσες. Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος και τη λύση του δημιουργούνται 3 φάσεις. Το RNA παραμένει στην υδατική (ανώτερη) φάση, το DNA στη μεσόφαση και οι πρωτεΐνες στην οργανική (κάτω) φάση.

Αμέσως μετά τη θανάτωση του ποντικού, λαμβάνονται 50-100 mg του ιστού ενδιαφέροντος σε σωληνάριο των 1.5 ml και ψύχονται άμεσα σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την κατεργασία τους.

Πειραματική διαδικασία

- 1 ml Tri Reagent προστίθεται ανά 50-100 mg του ιστού και γίνεται η ομογενοποίηση με τη χρήση ηλεκτρικού ομογενοποιητή.
- 2. Το ομογενοποίημα παραμένει για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 3. Προστίθενται 0.2 ml χλωροφορμίου και το μίγμα αναδεύεται έντονα για 15 sec.
- 4. Ακολουθεί επώαση του μίγματος για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 5. Εν συνεχεία, το μίγμα φυγοκεντρείται στα 12000 g για 15 min στους +4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωληνάριο, ενώ η μεσόφαση και η οργανική φάση φυλάσσονται στους +4°C για επακόλουθη απομόνωση DNA και πρωτεϊνών.
- Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με την προσθήκη 0.5 ml ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση. Το μίγμα αφήνεται για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 8 min στους +4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Έπειτα, το ίζημα εκπλένεται με 1 ml κρύας αιθανόλης 75% με ανάδευση και φυγοκεντρείται στα 12000 g για 5 min στους +4°C.

9. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 3-5 min. Τέλος, επαναιωρείται² σε κατάλληλο όγκο Gibco dH₂O (20-50 μl) και μετράται η συγκέντρωση και η καθαρότητά του στο Nanodrop. Συγκεκριμένα, προσδιορίζονται οι λόγοι 260/280 και 260/230, για τον έλεγχο προσμίξεων με πρωτεΐνες και οργανικές ενώσεις (φαινόλη), αντίστοιχα.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του λευκού λιπώδους ιστού (WAT: White Adipose Tissue), γίνεται λήψη 150-200 mg ιστού, τοποθέτησή του σε σωληνάριο των 2 ml και ομογενοποίηση με προσθήκη 2 ml Tri Reagent. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 10 min στους +4°C και στη συνέχεια, αφαιρείται προσεκτικά ο λευκός αφρός που προκύπτει λόγω λίπους. Έπειτα, τα 2 ml μοιράζονται ισόποσα σε 2 σωληνάρια των 1.5 ml και η διαδικασία συνεχίζεται από το βήμα 2.

3.12.3. Κατεργασία του RNA με DΝάση

Αρχή της μεθόδου

Το απομονωμένο RNA, πριν τη χρήση του σε αντίδραση RT-PCR, υφίσταται κατεργασία με DNάση προκειμένου να απαλλαγεί από πιθανές προσμίξεις με DNA. Η DNάση είναι μία ενδονουκλεάση που καταλύει την αποικοδόμηση του μονόκλωνου και του δίκλωνου DNA σε τυχαίες θέσεις.

Για την κατεργασία του RNA με DNάση χρησιμοποιήθηκαν 10 μg RNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20 μl και η σύστασή της παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1: Πίνακας 3.1: Σύσταση μίγματος αντίδρασης με DNάση

Συστατικό	Όγκος	
RNA (10µg)	έως 16 µl	
Buffer 10x	2 µl	
DNase (1u/µl)	2 µl	
Gibco dH ₂ O	έως τα 20 μΙ	
Συνολικός όγκος	20 µl	

- 1. Η αντίδραση διεξάγεται στους 37°C για 1-1.5 h.
- Κατόπιν, γίνεται καταβύθιση του RNA με φαινόλη/ χλωροφόρμιο, ως εξής: Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 200 μl με Gibco dH₂O και προστίθενται 200 μl φαινόλης/ χλωροφορμίου (1:1).

² Για την επαναιώρηση μεγάλων ποσοτήτων RNA ενδείκνυται η επώαση στους 65°C για 5 min και σύντομη έντονη ανάδευση.
- Το μίγμα αναδεύεται έντονα για 30 sec και φυγοκεντρείται στα 12000 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η πάνω φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωληνάριο του 0.5 ml και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
- Το μίγμα αναδεύεται έντονα για 30 sec και φυγοκεντρείται στα 12000 g για 10 min στους +4°C.
- 6. Η πάνω φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 1.5 ml και προστίθενται 1 μl γλυκογόνου 10 μg/μl, 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και 2.5 του όγκου κρύα αιθανόλη 100%.
- Το μίγμα αναδεύεται επαρκώς και φυλάσσεται στους -80°C για 3 h ή στους -20°C για 12-16 h.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 10 min στους +4°C και απόχυση του υπερκείμενου.
- Έπειτα, γίνεται έκπλυση του ιζήματος με αιθανόλη 75% κι επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- 10. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 3-5 min, επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο Gibco dH₂O (~ 20 μl) και μετράται η συγκέντρωση και η καθαρότητά του στο Nanodrop (λόγοι 260/280 και 260/230). Οι παραπάνω λόγοι δείχνουν πιθανές προσμίξεις του διαλύματος RNA με πρωτεΐνες και οργανικές ενώσεις (φαινόλη), αντίστοιχα.

3.13. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Αρχή της μεθόδου

Το RNA μεταγράφεται αντίστροφα στο συμπληρωματικό του DNA (cDNA) με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση. Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν 2 μg RNA κατεργασμένου με DNάση. Αρχικά, στο σωληνάριο προστίθενται το RNA, το νερό και τα ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδια θυμιδίνης (oligo(dT)₁₈), τα οποία υβριδίζονται στην πολυ(A) ουρά του mRNA, ως ακολούθως:

Συστατικό	Όγκος
RNA (2 µg)	έως 11 µΙ
Oligo(dT) ₁₈ (100 pmol/μl ή 0.5 μg/μl)	1 µl
Gibco dH ₂ O	έως τα 12 μΙ

Πίνακας 3.2.Α: Σύσταση μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής

- Πραγματοποιείται ανάμιξη των συστατικών κι επώαση στους 70°C για 5 min για να καταστραφούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA.
- Αμέσως μετά, το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για να αποτραπεί ο επανασχηματισμός των δευτεροταγών δομών και προστίθενται τα παρακάτω συστατικά:

Συστατικό	Όγκος
Buffer 5x	4 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
Αντίστροφη Μεταγραφάση Μ-MLV (200 u/μl)	2 µl
Συνολικός όγκος	20 µl

Πίνακας 3.2.Β: Σύσταση μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής

- 3. Έπειτα, γίνεται ήπια ανάμιξη κι επώαση στους 42°C για 1 h.
- 4. Τέλος, ακολουθεί επώαση στους 70°C για 10 min για να τερματιστεί η αντίδραση.

3.14. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) στηρίζεται στην ενζυμική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA in vitro, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοσταθερή πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, οι οποίες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του προς ενίσχυση DNA. Έτσι, λοιπόν, για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA, το μίγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει: τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα MgCl₂ που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-35), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95°C
- Σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχο,
 σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών

 Επέκταση, η οποία γίνεται με θέρμανση του μίγματος στους 72°C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, μιας και κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου ⁴⁰¹.

Πειραματική διαδικασία

Η κάθε αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20 μl. Οι συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών: T annealing) επιλέγονται κάθε φορά ανάλογα με τη θερμοκρασία T_m των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Η θερμοκρασία T_m υπολογίζεται από τον κανόνα: 4 x (G-C) + 2 x (A-T). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 0.25 mM, το MgCl₂ σε 1.5 mM, ενώ ο κάθε εκκινητής σε τελική συγκέντρωση 0.25 μM. Σε κάθε PCR χρησιμοποιείται πάντα ένα αρνητικό control (χωρίς DNA) για τον έλεγχο μολύνσεων, καθώς και ένα θετικό control (γνωστό δείγμα DNA) για τον έλεγχο επιτυχούς διεξαγωγής της αντίδρασης. Η προετοιμασία της αντίδρασης διεξάγεται στον πάγο, καθώς και η φύλαξη όλων των αντιδραστηρίων κατά τη διάρκεια προετοιμασίας της αντίδρασης. Μία τυπική σύσταση αντίδρασης PCR παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο DNA	1 µl (5-100ng)
Taq DNA πολυμεράση	0.4µl
10X Buffer	2 µl
dNTPs (2.5 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.2 µl
Εκκινητής F (5 μΜ)	1 µl
Εκκινητής R (5 μΜ)	1 µl
Gibco dH ₂ O	11.4 µl
Συνολικός όγκος	20 µl

Πίνακας 3.3: Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR

Διαλύματα

10Χ ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9 στους 25 °C, 1% Triton X-100

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR προσδιορισμού των γενοτύπων των ποντικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Αλληλουχίες των χρησιμοποιούμενων εκκινητών στην PCR για τον προσδιορισμό των γενοτύπων των ποντικών.

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'
ATX ko	A1- Forward	CGCATTTGACAGGAATTCTT
ATX ko	B1- Reverse	ATTTGTCACGTCCTGCACGA
ATX ko	C1- Reverse	ATCAAAATACTGGGGCTGCC
ATX ko	A2- Forward	CGAATCTCTCCGATCACTAC
ATX ko	B2- Reverse	TACACAACACAGCCGTCTCA
ATX Tg	Forward	GATCCCAGCCAGTGGACTTA
ATX Tg	Reverse	TCTGACACGACTGGAACGAG
Β2Μ β2-μικροσφαιρίνη	Forward	TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA
Β2Μ β2-μικροσφαιρίνη	Reverse	CAGTATGTTCGGCTTCCCATTC
L32	Forward	TTAAGCGAAACTGGCGGAAAC
L32	Reverse	TTGTTGCTCCCATAACCGATG
Col1a1	Forward	CATCCCTGGACAGCCTGGACT
Col1a1	Reverse	GCACGGAAACTCCAGCTGAT
LPAR1 ko	Forward	TATAGGAGTCTTGTGTTGCCTGTCC
LPAR1 ko	Reverse	GCCAATCCAGCGAAGAAGTC
LPAR1 ko	Reverse	GGTATTCTTAATTCTAGAGGATCAGC
HPRT	Forward	GGCCAGACTTTGTTGGATTT
HPRT	Reverse	CAGATTCAACTTGCGCTCAT
R26CreER ^{T2}	Forward	CAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATCAG
R26CreER ^{T2}	Reverse	ATTGCTGTCACTTGGTCGTGGC
Rosa	Forward	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
Rosa	Reverse	GCGAAGAGTTTGTCCTCAACC
Rosa	Reverse	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στα προγράμματα του θερμοκυκλοποιητή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5: Συνθήκες προγραμμάτων στο θερμοκυκλοποιητή για το κάθε ζεύγος εκκινητών

Ζεύγος εκκινητών	Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή		
A1-B1-C1	94°C για 3 min		
A1-B2-C1	94°C για 2 min		
A2-B2	59°C για 1 min, 30 sec x30		
A1-B2	72ºC για 1 min, 30 sec		

	72ºC για 5 min
	98°C για 2 min
	98°C για 2 sec
	60°C για 5 sec 🕺 x39
	65°C 5 sec
	95°C 0.5 C
	98°C για 2 min
122 E 122 P	98°C για 2 sec
	58°C για 5 sec x39
	65°C 5 sec
	95ºC 0.5 C

3.15. Ηλεκτροφόρηση του DNA

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση του DNA είναι μία μέθοδος διαχωρισμού μορίων DNA και προσδιορισμού του μήκους και της καθαρότητάς τους. Για τμήματα DNA μικρότερα από 500 ζ.β., ειδικά σχεδιασμένες πηκτές πολυακρυλαμιδίου επιτρέπουν το διαχωρισμό μορίων που διαφέρουν σε μήκος ακόμη έως και ένα ζ.β. Για το διαχωρισμό μεγαλύτερων τμημάτων DNA χρησιμοποιούνται οι πολύ πιο πορώδεις πηκτές από αραιά διαλύματα αγαρόζης (ενός πολυσακχαρίτη που απομονώνεται από φύκη). Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει και την απομόνωση τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο αρνητικό φορτίο του DNA, χάρη στο οποίο μετακινείται προς το θετικό πόλο όταν βρεθεί υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Η μετακίνηση του DNA επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες:

- Μέγεθος τμήματος DNA: Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους τους.
- 2. Συγκέντρωση αγαρόζης: Ένα τμήμα DNA κινείται ταχύτερα σε πηκτή αγαρόζης με μικρότερη συγκέντρωση από ότι σε πηκτή μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση αγαρόζης δίνεται από τον τύπο: log μ = log μ_o k_r t, όπου μ η κινητικότητα του DNA, μ_o η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, k_r ο συντελεστής καθυστέρησης και t η συγκέντρωση της αγαρόζης.
- Τάση πεδίου: Ο καλύτερος διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται σε τάση ≤ 5 Volt/cm.
- 4. Διαμόρφωση του DNA: Μόρια DNA ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης έχουν διαφορετική κινητικότητα. Τα μόρια του DNA μπορεί να είναι κυκλικά (form-I:

πλασμίδια, βακτηριακό ή ιικό DNA) ή κυκλικά τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια που έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα) ή ευθύγραμμα μόρια (form-III: είναι συνήθως όλα τα μόρια DNA τα οποία έχουν υποστεί πέψη με περιοριστικές νουκλεάσες). Η σειρά αύξησης της κινητικότητας είναι: μόριο ανοιχτού κύκλου (χαλαρωμένο DNA- relaxed), ευθύγραμμο μόριο και μόριο κλειστού υπερσπειρωμένου κύκλου (υπερσπειρωμένο DNA- covalently closed).

Πειραματική διαδικασία

- Αρχικά προετοιμάζονται 2 Ιt ρυθμιστικού διαλύματος 1Χ TBE (Tris-Boric acid-EDTA) από 10Χ TBE σε ποτήρι ζέσεως.
- 2. Για την παρασκευή 1.5% πηκτής αγαρόζης, τοποθετούνται 3.75 g αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 500 ml και προστίθενται 250 ml διαλύματος 1X TBE. Η κωνική καλύπτεται με διάτρητο πάραφιλμ και το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης, αναδεύοντας 2-3 φορές. Το μίγμα πρέπει να είναι διαυγές.
- 3. Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης, συναρμολογούνται τα επιμέρους τμήματα στο «καλούπι» όπου θα γίνει η πηκτή, η επιφάνεια ρυθμίζεται ώστε να είναι εντελώς επίπεδη και τοποθετούνται τα κτένια.
- 4. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος αγαρόζης φθάσει περίπου τους 50°C, προστίθενται στην κωνική 8 μΙ βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) από αρχικό stock 10 mg/ml, με πιπέτα αποκλειστικής για το σκοπό αυτό χρήσης ώστε η τελική συγκέντρωση του EtBr να είναι 0.32 μg/ml.
- 5. Το μίγμα αναδεύεται επαρκώς κι αποχύνεται προσεκτικά στο «καλούπι» προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων. Όταν δημιουργηθεί η πηκτή αγαρόζης, αφαιρούνται με προσοχή τα κτένια κατακόρυφα για τη δημιουργία των φρεατίων.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθενται τα υπόλοιπα 1750 ml διαλύματος 1X TBE και 58µl EtBr.
- 7. Στα δείγματα DNA που προορίζονται για ηλεκτροφόρηση προστίθεται ο κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Orange G) σε αναλογία 1:5 (Orange G: DNA). Το διάλυμα φόρτωσης έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το νερό, με αποτέλεσμα το δείγμα DNA να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου και να εισχωρεί στην πηκτή της αγαρόζης μετά την εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού. Επίσης, το διάλυμα φόρτωσης βοηθάει στην παρακολούθηση της μετακίνησης του DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.
- Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια της πηκτής, καθώς και του μάρτυρα DNA γνωστών μοριακών βαρών (DNA ladder).
- 9. Εφαρμόζεται σταθερή τάση (120 V για 23 min).

 Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm), ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA, οι οποίες φθορίζουν χάρη στο σύμπλοκο DNA – EtBr. Η φωτογράφιση της πηκτής έγινε με το σύστημα Geldoc.

Διαλύματα

Διάλυμα 10X TBE (Tris-Boric acid- EDTA): 0.891 M Tris base, 0.889 M Boric acid, 31.8 mM EDTA pH 8.0

Το διάλυμα 10X TBE φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα 1X ετοιμάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: 15% ficoll 400, 0.25 % χρωστική Orange G Αρχικά 15 g ficoll σε 30 ml ddH₂O θερμαίνονται στους 55°C για 15-20 min με ανάδευση κάθε 5 min, ακολουθεί προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 100 ml και 0.25 g χρωστικής Orange G. Το μίγμα αναδεύεται καλά, χωρίζεται σε σωληνάρια του 1.5 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.

3.16. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RQ-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Με την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction) πραγματοποιείται αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR, ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Για να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται μια μέθοδος για την ανίχνευση του προϊόντος της PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της PCR.

Προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με το υπό μελέτη γονίδιο. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της SYBR Green. Το όριο στο οποίο ο ειδικός φθορισμός υπερβαίνει τον μη ειδικό φθορισμό (background) αποτελεί το διαχωριστικό σημείο (cut-off level). Ο κύκλος της PCR στον οποίο για πρώτη φορά ο φθορισμός υπερβαίνει το cut-off level ονομάζεται κύκλος μετάπτωσης (Ct), ενώ η τιμή των προϊόντων στον κύκλο αυτό είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα.

Η κάθε αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20 μl. Οι συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών: Τ annealing) επιλέγονται κάθε φορά ανάλογα με

τη θερμοκρασία T_m των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Η θερμοκρασία T_m υπολογίζεται από τον κανόνα: 4 x (G-C) + 2 x (A-T). Στην παρούσα διατριβή σε όλες τις RQ-PCR χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο Master Mix SsoFastTM EvaGreen της BioRad, που περιείχε το ένζυμο, τα dNTPs και το MgCl₂. Ο κάθε εκκινητής χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0.25 μΜ. Σε κάθε RQ-PCR χρησιμοποιείται πάντα ένα αρνητικό control (χωρίς DNA) για τον έλεγχο μολύνσεων, καθώς και μία πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις ενός γνωστού ποσοτικοποιημένου δείγματος για τον προσδιορισμό της απόδοσης της αντίδρασης επί τοις εκατό (efficiency %) και της σχετικής ή απόλυτης ποσοτικοποίησης των προς εξέταση δειγμάτων.

Όλα τα δείγματα (προς εξέταση, της πρότυπης καμπύλης και ο αρνητικός μάρτυρας) μπαίνουν εις διπλούν σε πλάκα 96-θέσεων. Η προετοιμασία της αντίδρασης διεξάγεται στον πάγο, καθώς και η φύλαξη όλων των αντιδραστηρίων κατά τη διάρκεια προετοιμασίας της αντίδρασης. Στο τέλος η πλάκα «σφραγίζεται» καλά με την ειδική διάφανη μεμβράνη, αφού έχουν ελεγχθεί όλα τα φρεάτια για αποφυγή ύπαρξης φυσαλίδων. Μία τυπική σύσταση αντίδρασης RQ-PCR παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.6.

Αντιδραστήριο	Όγκος
DNA ή cDNA	1 µl
Εκκινητής F (5 μΜ)	1 µl
Εκκινητής R (5 μΜ)	1 µl
EvaGreen MMix	10 µl
Gibco dH ₂ O	7 µl
Συνολικός όγκος	20 µl

Πίνακας 3.6: Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης RQ-PCR

Ακολουθεί η ρύθμιση του προγράμματος της RT-PCR, η καταγραφή της θέσης των δειγμάτων στον υπολογιστή και η αντίδραση ξεκινά. Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα ενός πειράματος, με τις καμπύλες ενίσχυσης, την πρότυπη καμπύλη και την καμπύλη τήξης των προϊόντων, καθώς και ένα τυπικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα.



Εικόνα 3.1: Ενδεικτικό πείραμα RT-PCR. Καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων, πρότυπη καμπύλη με απόδοση 99.7%, καμπύλη τήξης των προϊόντων, θερμοκρασιακό πρόγραμμα.

3.17. Ανοσοενζυμική μέθοδος (Elisa)

Αρχή της μεθόδου

Η Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay) βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος όταν ένα από τα δύο είναι ακινητοποιημένο. Το παραπάνω σύμπλοκο ανιχνεύεται όταν το αντίσωμα του συμπλόκου ή ένα δεύτερο αντίσωμα που προσδένεται στο αντίσωμα του συμπλόκου είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο, το οποίο με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματός του θα δώσει ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά.

Η Elisa για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της ATX στο πλάσμα των ποντικών που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριό μας είναι μία έμμεση Elisa στην οποία η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση μία πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων μίας ανασυνδυασμένης ATX.

Πειραματική διαδικασία

Στην Elisa χρησιμοποιούνται μικροπλάκες 96-θέσεων από ειδικό υλικό, συνήθως πολυστυρένιο. Τα προς εξέταση δείγματα, οι αρνητικοί μάρτυρες και τα σημεία της πρότυπης καμπύλης εξετάζονται εις διπλούν.

- Αρχικά τοποθετούνται στην πλάκα τα σημεία της πρότυπης καμπύλης, τα δείγματα αναφοράς και τα προς εξέταση δείγματα με την κατάλληλη αραίωση ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο της πλάκας να είναι 100 μl.
- Α) Προετοιμασία της πρότυπης καμπύλης

Η ανασυνδυασμένη ΑΤΧ συγκέντρωσης 1000 μg/ml αραιώνεται αρχικά με διάλυμα επίστρωσης (coating buffer) σε 1000 ng/ml και από εκεί ξανά 1:10 σε τελικό όγκο 450 μl (45 μl και 405 μl διάλυμα επίστρωσης). 200 μl από την rATX συγκέντρωσης 100 ng/ml τοποθετούνται σε δύο φρεάτια, τα οποία αποτελούν το πρώτο σημείο της πρότυπης. Ακολουθούν διαδοχικές σειριακές αραιώσεις 1:2 έως τελική συγκέντρωση 1.563 ng/ml με τελικό όγκο σε κάθε φρεάτιο τα 100 μl.

Β) Προετοιμασία των δειγμάτων

Τα προς εξέταση δείγματα (πλάσμα) αραιώνονται 1:50 σε διάλυμα επίστρωσης με τελικό όγκο 250 μl, από τα οποία 100 μl διανέμονται σε δύο φρεάτια.

- Γ) Σε κάθε πλάκα εξετάζονται δύο αρνητικά κοντρόλ:
 Ένα χωρίς το 1° αντίσωμα, το οποίο περιέχει δείγμα και
 Ένα χωρίς πρωτεΐνη (πλάσμα) το οποίο περιέχει μόνο διάλυμα επίστρωσης.
- 2. Η πλάκα καλύπτεται με πάραφιλμ και καπάκι κι επωάζεται στους +4°C για 12-16 h.
- Την επόμενη μέρα, αδειάζεται το περιεχόμενο της πλάκας με γρήγορο κι απότομο χτύπημα σε απορροφητικό χαρτί.
- Ακολουθεί προσεκτική έκπλυση 5 φορές με διάλυμα 0.05% PBST με αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων και απομακρύνεται το διάλυμα με έντονο χτύπημα της πλάκας σε απορροφητικό χαρτί.
- Στη συνέχεια μπλοκάρονται οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος με 100 μl 2% BSA σε 0.05% PBST κι επώαση για 1.5 h στους 37°C.
- 6. Αδειάζεται το περιεχόμενο της πλάκας και χωρίς έκπλυση προστίθενται σε κάθε φρεάτιο (εκτός από τα δύο φρεάτια του αρνητικού κοντρόλ) 100 μl του πρώτου αντισώματος a-ATX διαλυμένου σε 2% BSA σε 0.05% PBST. Η πλάκα επωάζεται για 2 h στους 37°C, αφού πρώτα έχει αναδευθεί για 1 min στην ανακινούμενη βάση. Το αντίσωμα rabbit a-ATX Cayman χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml.
- 7. Έπειτα, αδειάζεται το περιεχόμενο της πλάκας κι επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
- Ακολουθεί προσθήκη σε κάθε φρεάτιο 100 μl του δεύτερου αντισώματος διαλυμένου σε 2% BSA σε 0.05% PBST. Η πλάκα επωάζεται για 1 h στους 37°C,

αφού πρώτα έχει αναδευθεί για 1 min στην ανακινούμενη βάση. Το 2° αντίσωμα arabbit χρησιμοποιείται με αραίωση 1:2000 και είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase), την υπεροξειδάση του αγριοράπανου.

- Στη συνέχεια, αδειάζεται το περιεχόμενο της πλάκας κι επαναλαμβάνεται το βήμα
 4.
- 10. Η ανάπτυξη του χρώματος γίνεται με την προσθήκη του υποστρώματος TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) της HRP. 100 μΙ φρέσκου διαλύματος TMB προστίθενται σε κάθε φρεάτιο και επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 50 μl 2M H₂SO₄ και το μίγμα αποκτάει κίτρινο χρώμα.
- 12. Η απορρόφηση μετράται στα 450 nm μέσα στα επόμενα 5 min.

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ο μέσος όρος των δύο τιμών των δύο φρεατίων (duplicates). Φτιάχνεται η πρότυπη καμπύλη με βάση τις απορροφήσεις των γνωστών συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης ΑΤΧ και από το μέσο όρο αφαιρείται η τιμή του αρνητικού μάρτυρα. Η γραμμικότητα της καμπύλης ελέγχεται με την τιμή r². Οι αποδεκτές τιμές των δειγμάτων πρέπει να βρίσκονται εντός των ορίων της πρότυπης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ΑΤΧ (ng/ml) των δειγμάτων γίνεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από το γράφημα αφού πολλαπλασιαστεί με την αρχική αραίωση του δείγματος.

Διαλύματα

Διάλυμα επίστρωσης pH 9.6: 0.012 M NaCO₃, 0.028 M NaHCO₃

PBST 0.05%: 0.05% (v/v) Tween σε 1x PBS

Φρέσκο διάλυμα TMB (φωτοευαίσθητο): 0,1 mg/ml TMB σε κιτρικό διάλυμα φωσφορικών (citrate phosphate buffer). Σε 10 ml κιτρικού διαλύματος φωσφορικών προστίθενται 100 μl TMB 10 mg/ml και 3 μl 30% H₂O₂ ακριβώς πριν τη χρήση.

Κιτρικό διάλυμα φωσφορικών pH 5: 0.085 M NaHPO₄.2H₂O, 0.025 M κιτρικό οξύ $(C_6H_8O_7.H_2O)$.

3.18. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστικότητας της ATX (TOOS assay)

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας λυσοφωσφολιπάσης D (LysoPLD) της ATX πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο TOOS.

Αρχή της μεθόδου

Η ΑΤΧ καταλύει τη μετατροπή της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης σε λυσοφωσφατιδικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση της χολίνης. Η απελευθερωμένη χολίνη οξειδώνεται με τη δράση της οξειδάσης της χολίνης προς παραγωγή βεταΐνης και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Το H_2O_2 δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, το οποίο παρουσία της υπεροξειδάσης HRP (horseradish peroxidase), αντιδρά με το αντιδραστήριο TOOS (Nethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline) και το 4-AAP (aminoantipyrene) σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο ροζ χρωστικής κινονεϊμίνης, η οποία απορροφά στα 555 nm.

Πειραματική διαδικασία

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις διπλούν. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται οι εξής μάρτυρες: Αρνητικός μάρτυρας (blank- no sample) ο οποίος δεν περιέχει δείγμα αλλά μόνο διάλυμα+LPC, αρνητικός μάρτυρας χωρίς LPC (no LPC) που περιέχει δείγμα και διάλυμα χωρίς LPC, θετικός μάρτυρας choline chloride για τον έλεγχο διεξαγωγής της δεύτερης αντίδρασης, καθώς και ένα γνωστό θετικό δείγμα.

- Αρχικά παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα 1 x LysoPLD buffer στην επιθυμητή ποσότητα. Για 10 ml 1 x LysoPLD buffer (που αντιστοιχεί σε μία ολόκληρη πλάκα) προστίθενται σε φιαλίδιο τύπου falcon: 1 ml 1 M Tris-HCl pH 9.0, 1.25 ml 4 M NaCl, 0.025 ml 2 M MgCl₂, 0.025 ml 2 M CaCl₂, 0.02 ml 30 mM CoCl₂, 7.68 ml MilliQ-H₂O.
- Από το παραπάνω διάλυμα, 200 μΙ φυλάσσονται σε σωληνάριο 1.5 ml που θα χρησιμεύσουν για τον αρνητικό μάρτυρα μόνο lyso-PLD χωρίς LPC.
- Στο falcon με τα 9.8 ml 1 x LysoPLD buffer προστίθενται 100 μl LPC 16:0 από stock 100 mM ή 50 μl από stock 200 mM LPC, προκειμένου η τελική συγκέντρωση του LPC να είναι 1 mM και το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 30 min.
- 4. Μετά την επώαση, σε πλάκα 96-θέσεων τοποθετούνται 99 μΙ διαλύματος 1 x LysoPLD+LPC σε κάθε φρεάτιο, εκτός από τα 2 φρεάτια για τον αρνητικό μάρτυρα no LPC όπου τοποθετούνται 99 μΙ διαλύματος 1 x LysoPLD (χωρίς LPC). Επιπλέον, στα 2 φρεάτια του αρνητικού μάρτυρα blank -no sample- τοποθετούνται 100 μΙ 1 x LysoPLD+LPC.
- Για κάθε δείγμα, 1 μΙ πλάσματος ποντικού αραιώνεται στα 99 μΙ διαλύματος 1x LysoPLD+LPC (ή LysoPLD χωρίς LPC στην περίπτωση του no LPC αρνητικού μάρτυρα).
- Η πλάκα επωάζεται στους 37°C για 4 h καλυμμένη με πάραφιλμ, καπάκι και αλουμινόχαρτο.
- 15 περίπου λεπτά πριν το πέρας των 4 h, η απαιτούμενη ποσότητα του διαλύματος
 5 mM MgCl₂ σε 50 mM Tris-HCl pH 8.0 θερμαίνεται στους 37°C για 10 min.
- Λίγο πριν το τέλος της επώασης, ετοιμάζεται το διάλυμα color mix ως εξής: Σε φιαλίδιο τύπου falcon προστίθενται τα 9.55 ml του ζεστού διαλύματος 5 mM MgCl₂

σε 50 mM Tris-HCI pH 8.0, 150 μI HRP από stock 530 U/ml, 100 μI 4-AAP από stock 50 mM, 100 μI TOOS από stock 30 mM, 100 μI οξειδάση της χολίνης από stock 200 U/ml και το μίγμα αναδεύεται καλά.

- 9. 100 μl από το color mix προστίθενται σε κάθε φρεάτιο με πολυπιπέτα αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- 10. Ακολουθεί αμέσως μία μέτρηση της απορρόφησης στα 555 nm και στη συνέχεια λαμβάνονται διαδοχικές μετρήσεις της απορρόφησης κάθε 5 λεπτά για χρονικό διάστημα 20 λεπτών, κατά το οποίο η πλάκα εξακολουθεί να επωάζεται στους 37°C καλυμμένη με πάραφιλμ, καπάκι και αλουμινόχαρτο.
- Στη συνέχεια, η απορρόφηση παρουσιάζεται διαγραμματικά έναντι του χρόνου της αντίδρασης (0-20 min) κι επιλέγεται το γραμμικό τμήμα της αντίδρασης, συνήθως 0-10 min ή 0-15 min. Για το γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης υπολογίζεται η κλίση της καμπύλης (dA/min).
- Τέλος, η δραστικότητα της ΑΤΧ υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:
 Δραστικότητα (U/ ml) = (µmol/ min/ ml) = [dA/ min (δείγµατος) dA/ min (blank)] *
 Vt/ (e* Vs* 0.5), όπου
 - Vt: συνολικός όγκος της αντίδρασης σε ml
 - Vs: όγκος του κάθε δείγματος σε ml
 - e: συντελεστής απόσβεσης της χρωστικής κινονεϊμίνης, ο οποίος για τις συγκεκριμένες συνθήκες της τεχνικής είναι 32,8 μmol/ cm²
 - 0.5: τα moles της χρωστικής κινονεϊμίνης που παράγονται από 1 mol H_2O_2 .

Διαλύματα

1 x LysoPLD buffer: 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 60 μ M CoCl₂, 1 mM LPC

Colour mix: 0.5 mM 4-AAP, 7.95 U/ml HRP, 0.3 mM TOOS, 2 U/ml choline oxidase $\sigma\epsilon$ 5 mM MgCl_2/ 50 mM Tris-HCl pH 8.0

Τα stock διαλύματα NaCl, MgCl₂, CaCl₂, CoCl₂, HRP, 4-AAP, TOOS και η οξειδάση της χολίνης φυλάσσονται σε μικρού όγκου υποπολλαπλάσια στους -20°C και πρέπει να προστατεύονται από το φως.

Το διάλυμα 5 mM MgCl₂ σε 50 mM Tris-HCl pH 8.0 διατηρείται στους +4°C προστατευμένο από το φως και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι και ένα μήνα.

3.19. SDS PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους και πραγματοποιείται υπό συνθήκες που διασφαλίζουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Το θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS: sodium dodecyl sulfate) παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα (β-μερκαπτοαιθανόλη) και σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες καταστρέφοντας την τρισδιάστατη δομή τους με τη διάσπαση των μη- ομοιοπολικών δεσμών τους. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αποτρέπει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Το SDS ως ανιονική επιφανειοδραστική ουσία επιφέρει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες όταν το υδρόφοβο τμήμα του συνδεθεί ισχυρά στο υδρόφοβο τμήμα των πεπτιδικών αλυσίδων των πρωτεΐνών. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες (σύμπλοκο SDS-πολυπεπτιδίου) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου θα κινηθούν προς την άνοδο (θετικός πόλος). Η ταχύτητα μετακίνησης στην πρωτεΐνών, το σχήμα και τη σύνδεσή τους με το SDS. Με τη χρήση μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών μπορεί να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των υπολυπεπτιδικών αλυσίδων των υπολυπεπτιδικών αλυσίδων των μοριακών βαρών μπορεί να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των υπολυπεπτιδικών αλυσίδων των σολυπεπτιδικών αλυσίδων των μοριακών βαρών μπορεί να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου δημιουργείται με πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο (cross links). Με την προσθήκη του TEMED (NNN'N'tetramethylethylenediamine) επιταχύνεται ο πολυμερισμός, καταλύοντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες παρέχονται από το υπερθειικό αμμώνιο (APS). Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου περιλαμβάνει την πηκτή διαχωρισμού και την πηκτή επιστοίβαξης.

Πειραματική διαδικασία

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

 Η συγκέντρωση της πηκτής διαχωρισμού επιλέγεται ανάλογα με το μοριακό βάρος της προς εξέταση πρωτεΐνης. Για την ΑΤΧ χρησιμοποιήθηκε 8%. Α. Για την παρασκευή 10 ml 8% πηκτής διαχωρισμού προστέθηκαν σε σωληνάριο 4.6 ml απιονισμένου νερού, 2.7 ml διαλύματος 30% ακρυλαμιδίου, 2.5 ml 1.5 M Tris pH 8.8 (διάλυμα διαχωρισμού), 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% APS, 0.01 ml TEMED. B. Για την παρασκευή 4 ml 4% πηκτής επιστοίβαξης προστέθηκαν σε σωληνάριο 2.7 ml απιονισμένου νερού, 0.67 ml διαλύματος 30% ακρυλαμιδίου, 0.5 ml 1 M Tris pH 6.8 (διάλυμα συμπύκνωσης), 0.04 ml 10% SDS, 0.04 ml 10% APS, 0.004 ml TEMED³.

- Αφού συναρμολογηθεί η συσκευή χύτευσης της πηκτής, εγχύεται εντός των δύο γυάλινων επιφανειών επαρκής ποσότητα μίγματος διαχωρισμού υπολογίζοντας να υπάρχει χώρος για την πηκτή επιστοίβαξης.
- Πάνω από το μίγμα διαχωρισμού εγχύεται ισοπροπανόλη μέχρι να καλυφθεί πλήρως η συσκευή χύτευσης.
- Μετά από περίπου 30 min και αφού έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, αποχύνεται προσεκτικά η ισοπροπανόλη και εγχύεται απιονισμένο νερό.
- Στη συνέχεια αποχύνεται το νερό και απομακρύνεται η περίσσειά του προσεκτικά με διηθητικό χαρτί.
- Ακολουθεί έγχυση του μίγματος επιστοίβαξης πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και άμεση τοποθέτηση των κτενίων αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- Μετά από περίπου 30 min ολοκληρώνεται ο πολυμερισμός. Στο μεταξύ, προετοιμάζονται τα προς εξέταση δείγματα.

Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

- 8. Στα διαλύματα των προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών προστίθεται διάλυμα δειγμάτων που περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη και SDS και θερμαίνονται στους 95°C για 5 min.
- 9. Συναρμολογείται κατάλληλα η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται στην ειδική δεξαμενή η οποία γεμίζεται με περίπου ένα λίτρο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης⁴ με τη στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.
- Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων και του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών αφού έχουν αφαιρεθεί με προσοχή τα κτένια κι έχουν καθαριστεί τα φρεάτια με απιονισμένο νερό.
- Η συσκευή τροφοδοτείται με ηλεκτρικό ρεύμα στα 80-120 V έως ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος την πηκτή.

Χρώση για εμφάνιση των πρωτεϊνών

³ Τα APS και TEMED προστίθενται λίγο πριν γίνει η επιστοίβαξη των δύο διαλυμάτων μιας και τα δύο δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

⁴ Πρώτα γεμίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης ο χώρος ανάμεσα στις δύο πηκτές προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει διαρροή.

- 12. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετείται σε δοχείο με διάλυμα χρωστικής Coomassie και υφίσταται χρώση για περίπου 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ήπια ανάδευση.
- 13. Ακολουθεί έκπλυση της πηκτής με απιονισμένο νερό και αποχρωματισμός της με εμβάπτιση σε διάλυμα αποχρωματισμού για 1-3 h ή για όλη τη νύχτα (O/N) ανάλογα με το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί.

Διαλύματα

Διάλυμα 30% μίγματος ακρυλαμιδίου: 29.2% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.8% (w/v) N,N'methylene-bis-ακρυλαμίδιο

Διάλυμα δειγμάτων (sample buffer) Laemli 5x: 10% SDS, 50% γλυκερόλη, 60 mM Tris pH 6.8, 100 mM DTT, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης ή εναλλακτικά 10% SDS, 30% γλυκερόλη, 62.5 mM Tris pH 6.8, 25% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.01% μπλε της βρωμοφαινόλης. Φυλάσσεται στους -20°C.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer): 25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS Διάλυμα χρώσης της πηκτής Coomassie stain: 50% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 0.1% (w/v) brilliant blue G

Διάλυμα γρήγορου αποχρωματισμού (fast de-staining: 1-3 h): 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ

Διάλυμα αργού αποχρωματισμού (slow de-staining: O/N): 5% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ

3.20. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι μία αναλυτική μέθοδος στην οποία πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε λεπτή μεμβράνη και ανιχνεύονται με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα πρόσδεσης των αντισωμάτων σε ακινητοποιημένες πρωτεΐνες στη μεμβράνη. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύεται με τη χρήση δεύτερου αντισώματος το οποίο προσδένεται στο πρώτο και είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με ένζυμο. Με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο γίνεται αντίδραση, η οποία παράγει ένα έγχρωμο προϊόν που βοηθάει στον εντοπισμό της πρωτεΐνης. Οι χρησιμοποιούμενες μεμβράνες είναι νιτροκυτταρίνης, νάιλον ή PVDF ⁴⁰².

Πειραματική διαδικασία

Η πηκτή εμβαπτίζεται σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς semi-dry για 15-30 min.

- Κόβονται 6 κομμάτια διηθητικού χαρτιού Whatman 3mm και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στις διαστάσεις της πηκτής κι εμβαπτίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
- 3. Στη συσκευή Trans-Blot SD-Dry Transfer Cell cast τοποθετούνται με τη σειρά 3 εμποτισμένα κομμάτια διηθητικού χαρτιού Whatman, η εμποτισμένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και τα υπόλοιπα 3 εμποτισμένα κομμάτια διηθητικού χαρτιού Whatman. Στην πλευρά της συσκευής που είναι η άνοδος πρέπει να βρίσκεται με σειρά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μετά η πηκτή πολυακρυλαμιδίου κι όχι αντίστροφα.
- 4. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 20 V για 20 min ή 11 V για 35 min.
- 5. Έπειτα, ελέγχεται η μεταφορά των πρωτεϊνών με χρώση ponseau για ελάχιστα sec.
- Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης υπό ανάδευση πρώτα με νερό 2-3 φορές και μετά με 1xTBST μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως η χρωστική.
- 7. Πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με διάλυμα 5% (w/v) άπαχου γάλακτος (NFM) σε 1xTBST 0.05% για 1 h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος στη μεμβράνη.
- 8. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο σε 5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBST 0.05% για 12-18 h (overnight) υπό ανάδευση στους +4°C. Χρησιμοποιήθηκε είτε το μονοκλωνικό αντίσωμα 4F1 που έχει παραχθεί σε αρουραίο σε αραίωση 1:1000 είτε το πολυκλωνικό Cayman που έχει παραχθεί σε κουνέλι σε αραίωση 1:250.
- 9. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται έκπλυση της μεμβράνης με 1xTBST 0.05%
 3 φορές για 10 min έκαστη, υπό ανάδευση.
- 10. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε είτε a-rat είτε a-rabbit ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα σε αραίωση 1:2000.
- Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με 1xTBST 0.05% 3 φορές για 10 min έκαστη, υπό ανάδευση.
- 12. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος γίνεται ορατό με τη χρήση του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας ECL (enhanced chemo-luminescence). Αναμιγνύεται ίση ποσότητα αντιδραστηρίων ανίχνευσης Α και Β (1:2) ακριβώς πριν τη χρήση και επωάζεται η μεμβράνη για 1 min στο σκοτάδι.
- Απομακρύνεται η περίσσεια του ECL και ακολουθεί η απεικόνιση των πρωτεϊνών με το σύστημα εμφάνισης Chemidoc της BioRad.

Το αντιδραστήριο ECL αποτελείται από λουμινόλη, κουμαρικό οξύ και H₂O₂. Το συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα ένζυμο της υπεροξειδάσης καταλύει την οξειδοαναγωγική αντίδραση ανάμεσα στη λουμινόλη και το H₂O₂. Το διεγερμένο ενδιάμεσο της παραπάνω αντίδρασης μεταπίπτει σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση εκπέμποντας φως. Το κουμαρικό οξύ ενισχύει έως και 1000 φορές την ένταση του εκπεμπόμενου φωτός.

Η ειδικότητα των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων είχε ελεγχθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας ²²⁰.

Διαλύματα

Διάλυμα TBST 10x: 100 mM Tris pH 8.0, 1.5 M NaCl, 0.5% Tween 20 Διάλυμα μεταφοράς στη μεμβράνη semi-dry: 48 mM Tris base, 39 mM γλυκίνη, 0.0375% SDS, 20% μεθανόλη

3.21. Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας HPLC-MS/ MS

Αρχή της μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια διαχωριστική ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική, στην οποία ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στη συνδυαστική δράση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Με τη βοήθεια αντλίας, ο υγρός διαλύτης που περιέχει το προς ανάλυση δείγμα διέρχεται υπό υψηλή πίεση μέσω μιας στήλης η οποία είναι γεμάτη με ένα στερεό προσροφητικό υλικό ⁴⁰³. Η αρχή της φασματομετρίας μάζας βασίζεται στη δημιουργία ιόντων μιας ένωσης (κυρίως θετικών), το διαχωρισμό τους βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο (m/z) και την ανίχνευσή τους με αποτέλεσμα την παραγωγή φάσματος. Έτσι, δύναται να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους ⁴⁰⁴. Η σύζευξη της ευαισθησίας της MS με την επιλεκτικότητα της LC μπορεί να αναλύσει ποιοτικά ή ποσοτικά άγνωστες ενώσεις ή ενώσεις που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ⁴⁰⁵.

Πειραματική διαδικασία ανάκτησης λιπιδίων

Η εκχύλιση των λιπιδίων από το πλάσμα πραγματοποιήθηκε στον πάγο, σύμφωνα με τη μέθοδο Folch ⁴⁰⁶ με μικρές τροποποιήσεις.

- 50 μΙ πλάσματος αναμιγνύονται με 950 μΙ PBS και εμπλουτίζονται με το μίγμα των εσωτερικών προτύπων λιπιδίων (17:0 LPA/ LPC/ LPS/ LPG/ LPE).
- Πραγματοποιείται εκχύλιση σε ουδέτερο pH δύο φορές με την προσθήκη 4 ml κρύου μίγματος χλωροφορμίου/ μεθανόλης (2/1, v/v) και στη συνέχεια με την προσθήκη 2 ml κρύου μίγματος χλωροφορμίου/ μεθανόλης (2/1, v/v) κορεσμένο με PBS.

- Μετά από κάθε βήμα εκχύλισης πραγματοποιείται έντονη ανάδευση (vortex) για 1 min και φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 1 min στους +4°C.
- 4. Οι κάτω οργανικές φάσεις και από τα δύο στάδια εκχύλισης σε ουδέτερο pH, συνενώνονται σε ένα σωληνάριο και διατηρούνται στον πάγο για την επικείμενη μέτρηση του LPC και του PF8380.
- 5. Η άνω υδατική φάση αφού αφεθεί να κρυώσει στον πάγο για 10 min και μετά από οξίνιση με οξικό οξύ έως την τιμή pH 3.0, υφίσταται εκχύλιση δύο φορές με κρύο μίγμα CHCl3/ CH3OH (2/1, v/v), όπως στο βήμα 2 προηγουμένως.
- 6. Οι κάτω οργανικές φάσεις που προέκυψαν από τις δύο εκχυλίσεις ενώνονται σε ένα σωληνάριο, ουδετεροποιούνται σε pH 6.0-7.0 στον πάγο και προορίζονται για τον προσδιορισμό των λυσοφωσφολιπιδίων LPA, LPS, LPG, LPI και LPE.
- 7. Η φυλαγμένη κάτω οργανική φάση της εκχύλισης σε ουδέτερο pH και η εξουδετερωμένη οξινισμένη κάτω οργανική φάση εξατμίζονται μέχρι ξηρού.
- 8. Τα ιζήματα επαναιωρούνται σε 0.15 ml ισοπροπανόλης καθαρότητας HPLC κατάλληλης για HPLC-ESI/ MS/MS και μετά από σύντομη έντονη ανάδευση μεταφέρονται στα φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη HPLC για ανάλυση.

Η ανάκτηση που επιτεύχθηκε ήταν 90% για τον PF8380, 60–85% για τα είδη του LPA και 80–100% για τα LPC, LPS, LPG, LPI και LPE.

Χρωματογραφική ανάλυση HPLC-MS/MS

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη στήλη πυριτίου Luna Silica column (2–250 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 mm) της Phenomenex (Phenomenex, Torrance, CA, USA) χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα διπλής διαβάθμισης που αποτελείται από ισοπροπανόλη: εξάνιο: 100 mM φορμικό αμμώνιο (NH₄CO₂H(aq)) 58:40:2 (κινητή φάση A) και ισοπροπανόλη: εξάνιο: 100 mM φορμικό αμμώνιο (NH₄CO₂H(aq)) 50:40:10 (κινητή φάση B). Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 0.3 ml/min και ο συνολικός χρόνος ροής ήταν 50 min για κάθε δείγμα. Με βάση αυτή τη μέθοδο τα λιπίδια εκλούσθηκαν από τη στήλη.

Η ανάλυση έγινε με τεχνική ιονισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού (ESI) με θετική φόρτιση SIM (Single Ion Monitoring) στην πηγή ιονισμού για τα είδη του LPC και τον PF8380 που ανακτήθηκαν από το ουδέτερο κλάσμα και με αρνητική φόρτιση στην πηγή ιονισμού για τα είδη του LPA και τα LPS, LPG, LPI, LPE που ανακτήθηκαν στο οξινισμένο κλάσμα. Η ανάλυση είχε διακριτική ικανότητα 100 Κ παρέχοντας υψηλή ακρίβεια για τη μέτρηση των λυσοφωσφολιπιδίων. Η συλλογή και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Xcalibur (Thermo Scientific). Η μάζα του πρόδρομου ιόντος χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση, ενώ η κάθε λιπιδιακή «ταυτότητα» επιβεβαιώθηκε με την κλασματοποίηση του πρόδρομου ιόντος χρησιμοποιώντας την τεχνική CID (Collision

Induced Dissociation), διάσπασης λόγω σύγκρουσης. Οι αναλογίες των περιοχών κορυφής (λιπίδιο/ εσωτερικό πρότυπο) έναντι των μοριακών αναλογιών (λιπίδιο/ εσωτερικό πρότυπο) παρουσιάστηκαν με μορφή γραμμικής παλινδρόμησης και κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες.

3.22. Φαρμακοκινητική και *in vivo* αναστολή της δραστικότητας της ΑΤΧ

Ο αναστολέας PF8380 χορηγήθηκε σε ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων με από του στόματος έγχυση απευθείας στο στομάχι (PO) σε συγκέντρωση 120 mg/kg διαλυμένος σε φορέα (2% υδροξυπροπυλ-κυτταρίνη/ Tween 80 0.1%). Στα ποντίκια της ομάδας ελέγχου χορηγήθηκε μόνο φορέας. Αίμα από τα ποντίκια συλλέχθηκε σε χρονικά διαστήματα έως και 12 ώρες μετά τη χορήγηση του αναστολέα σε σωληνάρια που περιείχαν EDTA σε τελική συγκέντρωση 50 mM. Το πλάσμα αποθηκεύτηκε σε siliconized σωληνάρια στους -20°C για μέτρηση της δραστικότητας της ATX και προσδιορισμό των επιπέδων LPA και PF8380.

3.23. Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το SigmaPlot 11.0 (Systat software Inc., IL, USA). Τα στατιστικά σημαντικά δεδομένα υπολογίστηκαν έπειτα από κατά ζεύγη σύγκριση με τις τιμές των ομάδων ελέγχου χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Student's t-test ή τη Mann-Whitney σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής. Η στατιστική ανάλυση για τις καμπύλες επιβίωσης έγινε με την Kaplan-Meier χρησιμοποιώντας το Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.), ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές των καμπυλών εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Logrank test. Τιμές P<0.05 (*), <0.01 (**) και <0.001 (***) θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Ο αριθμός των εξετασθέντων δειγμάτων (n) και ο αριθμός των διεξαχθέντων πειραμάτων (exp) αναφέρονται στη λεζάντα της κάθε εικόνας.

4. Αποτελέσματα

4.Α. Ο ρόλος της ΑΤΧ στην ενήλικη φυσιολογία

4.Α.1. Επαγόμενη καθολική γενετική απενεργοποίηση της ΑΤΧ στον ενήλικο ποντικό

4.Α.1.1. Γενετικό σύστημα επαγόμενου από το Tmx Cre-διαμεσολαβούμενου ανασυνδυασμού

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ΑΤΧ στην ενήλικη φυσιολογία του ποντικού μελετήθηκε η γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ από όλους τους ιστούς του ζώου. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Cre ανασυνδυάσης (Ενότητα 3.4) και το διαγονιδιακό ποντίκι R26Cre-ER^{T2} (σειρά 2151), το οποίο δημιουργήθηκε από τη Regeneron Pharmaceuticals ^{394,395}.

Το ποντίκι R26Cre-ER^{T2} φέρει ένα γονίδιο σύντηξης ανάμεσα στην Cre ανασυνδυάση και μία μεταλλαγμένη μορφή της περιοχής πρόσδεσης του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER^{T2}) με στόχευση στο γενετικό τόπο ROSA26 (R26) (Εικόνα 4.1A), ο οποίος παρουσιάζει ευρεία έκφραση σε όλους τους ιστούς, χρησιμοποιώντας παρόμοια στρατηγική στόχευσης όπως σε προηγούμενες μελέτες ⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹. Η σύντηξη Cre-ER^{T2} εισήχθη στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου R26 μαζί με την κασέτα επιλογής της υγρομυκίνης. Η μεταγραφική σύντηξη εμποδίζει την πρόσδεση του φυσικού προσδέτη 17β-οιστραδιόλη (E2) στον υποδοχέα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, ενώ αντίθετα προσδένεται το Tamoxifen (Tmx) ή το παράγωγό του 4-υδροξυ (OH)-Tmx (Εικόνα 4.1B)⁴¹⁰. Το Tmx είναι ένας συνθετικός ανταγωνιστής των οιστρογόνων. Η χιμαιρική Cre-ER^{T2} έχει ως αποτέλεσμα την ER^{T2}-εξαρτώμενη κυτταροπλασματική δέσμευση της Cre, αποτρέποντας τον Cre-διαμεσολαβούμενο ανασυνδυασμό. Με τη χορήγηση όμως του Tmx, το οποίο προσδένεται στο μεταλλαγμένο υποδοχέα ER^{T2}, η Cre απελευθερώνεται από το κυτταρόπλασμα, επιτρέποντας την είσοδο της Cre-ER^{T2} στον πυρήνα και άρα, την έναρξη του ανασυνδυασμού στις θέσεις *loxP* ^{397,399}. Τα διαγονιδιακά ετερόζυγα ποντίκια R26Cre-ER^{T2} τα οποία έφεραν τη μεταγραφική σύντηξη στο ένα μόνο αλλήλιο, δεν παρουσίασαν κάποιον εμφανή φαινότυπο και ήταν βιώσιμα και γόνιμα 411,412.



Εικόνα 4.1: Α. Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής κατασκευής της γονιδιακής στόχευσης στο γενετικό τόπο ROSA26. Η μεταγραφική σύντηξη Cre-ER^{T2} εισήχθη στο γενετικό τόπο ROSA26 με ομόλογο ανασυνδυασμό στη θέση που απεικονίζεται. Ε: EcoRI, P: PacI, CreER^{T2}: splice acceptor του αδενοϊού - CreER^{T2} - PMC περιοχή πολυαδενυλίωσης. Β. Δομή του Tamoxifen.

4.Α.1.2. Έλεγχος του επαγόμενου από το Tmx Cre-διαμεσολαβούμενου ανασυνδυασμού

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα και η ιστοειδικότητα της επαγόμενης από το Tmx έκφρασης της Cre ανασυνδυάσης, η οποία είναι στοχευμένη στο γενετικό τόπο Rosa26, προσδιορίστηκε η δραστικότητα της Cre πριν και μετά την επαγωγή με το Tmx. Αυτό επιτεύχθηκε διασταυρώνοντας το διαγονιδιακό ποντίκι R26Cre-ER^{T2} με το διαγονιδιακό ποντίκι αναφοράς Rosa26-lacZ ⁴¹³.

Το ποντίκι Rosa26-lacZ (R26R) φέρει το γονίδιο αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) το οποίο βρίσκεται υπό τη μεταγραφική ρύθμιση της Cre ανασυνδυάσης. Πιο συγκεκριμένα, ανοδικά του γονιδίου *lacZ* το οποίο έχει εισαχθεί στο γενετικό τόπο Rosa26 (R26), βρίσκεται η κασέτα επιλογής της νεομυκίνης με τις *loxP* θέσεις εκατέρωθεν, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η έκφραση του γονιδίου *lacZ*. Με την ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης η έκφραση του γονιδίου *lacZ*.

Για την επαγωγή της έκφρασης της Cre χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (IP) διάλυμα Tmx το οποίο είναι αραιωμένο σε αραβοσιτέλαιο, σε συγκέντρωση 100 mg/kg ζώου για 10 συνεχόμενες ημέρες σε ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/R26R καθώς και σε ποντίκια της ομάδας ελέγχου R26R από τα οποία έλειπε το αλλήλιο R26Cre-ER^{T2}. Ως επιπλέον ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/R26R στα οποία χορηγήθηκε μόνο αραβοσιτέλαιο. Από τα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/R26R στα οποία χορηγήθηκε μόνο αραβοσιτέλαιο. Από τα ποντίκια λήφθησαν 12 ιστοί (νεφροί, ήπαρ, καρδιά, ωοθήκες, όρχεις, εγκέφαλος, σπλήνας, έντερο λεπτό και παχύ, πνεύμονας, νωτιαίος μυελός, θύμος) οι οποίοι υπέστησαν χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Η χορήγηση του Tmx είχε ως αποτέλεσμα την ευρεία και διάσπαρτη δημιουργία μπλε χρώματος που ανιχνεύθηκε με τη χρώση X-gal, σε διαφορετικό βαθμό κι έκταση στον κάθε ιστό των ποντικών R26Cre-ER^{T2}/R26R, γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματική κι ευρεία ενεργοποίηση της έκφρασης της Cre ανασυνδυάσης έπειτα από τη χορήγηση του Tmx. Επίσης επιβεβαιώθηκε ότι η Cre ανασυνδυάση δεν παρουσίαζε καμία δραστικότητα πριν τη χορήγηση. Μόνο στο λεπτό έντερο R26Cre-ER^{T2}/R26R ποντικών που έλαβαν αραβοσιτέλαιο παρατηρήθηκε σε μικρό βαθμό τοπικά ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης. Τα αποτελέσματα της ιστοειδικής επιβεβαίωσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.2.



Εικόνα 4.2: Σποραδική ευρεία έκφραση της επαγόμενης από το Tmx Cre ανασυνδυάσης σε ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/R26R. Ιστοί έπειτα από χρώση β-γαλακτοσιδάσης (X-gal) σε ποντίκια της πειραματικής ομάδας R26Cre-ER^{T2}/R26R που έλαβαν Tmx (ή μόνο αραβοσιτέλαιο) και της ομάδας ελέγχου Rosa26-*LacZ* (R26R) έπειτα από χορήγηση Tmx σε συγκέντρωση 100 mg/kg ζώου για 10 ημέρες. Κλίμακα: 150 μm.

4.Α.1.3. Υπό όρους knockout ποντίκι για την Enpp2

Αφού ελέγχθηκε η λειτουργικότητα, η αποτελεσματικότητα και η ιστοειδικότητα του συστήματος του επαγόμενου από το Tmx Cre-διαμεσολαβούμενου ανασυνδυασμού,

επιχειρήθηκε η επαγόμενη γενετική αποκοπή της ΑΤΧ χρησιμοποιώντας το υπό όρους (conditional) knockout ποντίκι *Enpp2*^{n/n} το οποίο είχε δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας ¹¹.



Εικόνα 4.3: Α. Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής σχεδιασμού της PCR για τον έλεγχο του ανασυνδυασμού έπειτα από ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης, του υπό όρους (conditional) knockout ποντικού για την Enpp2. Με τη σειρά απεικονίζονται τα αλλήλια Wt, *Enpp2*^{n/n} και *Enpp2*^{flx} στο οποίο έχει γίνει ανασυνδυασμός μεταξύ των θέσεων *loxP*1 και *loxP*2 κι έχει αποκοπεί η κασέτα νεομυκίνης. Ο συνήθης ανασυνδυασμός είναι μεταξύ των θέσεων *loxP*1 και *loxP*3, που οδηγεί στο αλλήλιο *Enpp2*^{dflx} (1-3 del), Β. Αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης έκαστου ζεύγους εκκινητών για το κάθε αλλήλιο, Γ. Ανάλυση PCR ανασυνδυασμού για τα ποντίκια *Enpp2*^{flx/flx}, *E*

Περιληπτικά, κατευθείαν ανοδικά του γονιδίου της ΑΤΧ εισήχθη η κασέτα επιλογής της νεομυκίνης, η οποία περιβάλλεται από 2 *loxP* θέσεις, τις *loxP*1 και *loxP*2. Η θέση *loxP*2 βρίσκεται ανοδικά του εξονίου 1 του γονιδίου της ΑΤΧ ενώ η *loxP*3 έπεται του εξονίου 2. Τα εξόνια 1 και 2 εντοπίζονται στην περιοχή "central arm" όπως εμφανίζεται σχηματικά στην Εικόνα 4.3A. Κατά συνέπεια, με την ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης πραγματοποιείται η εκτομή των εξονίων 1 και 2 του γονιδίου *Enpp2*. Στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζονται οι θέσεις των εκκινητών A1, A2, B1, C1, B2 (A), τα αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης έκαστου ζεύγους εκκινητών για το κάθε αλλήλιο (B), οι PCR ανασυνδυασμού για ποντίκι φυσικού τύπου (Wt) και διαγονιδιακό υπό όρους knockout για την ΑΤΧ σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία με όλους τους πιθανούς Cre-διαμεσολαβούμενους ανασυνδυσμούς (Γ και Δ).

4.Α.1.4. Επαγόμενη καθολική γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η μελέτη της τοξικότητας της γενετικής απαλοιφής της ATX, η οποία πραγματοποιήθηκε τόσο σε *in vivo* επίπεδο (επιβίωση-θνησιμότητα του ποντικού), όσο και σε *ex vivo* επίπεδο με βιοχημική και μοριακή ανάλυση των κυτταρικών τύπων που προέρχονται από τους γενετικά τροποποιημένους ποντικούς. Για την *in vivo* επαγόμενη απενεργοποίηση της ATX, διασταυρώθηκε το ποντίκι *Enpp2*^{n/n} με το R26Cre-ER^{T2}. Από τη διασταύρωση προέκυψαν τα R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} ποντίκια, τα οποία αποτέλεσαν την πειραματική ομάδα, καθώς και τα αδέρφια τους τα οποία έφεραν το ένα από τα δύο γονίδια και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδες ελέγχου, ήτοι τα ποντίκια R26Cre-ER^{T2} και *Enpp2*^{n/n}. Σε όλες τις ομάδες χορηγήθηκε Tmx ή μόνο αραβοσιτέλαιο με διαφορετικούς τρόπους χορήγησης και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Tmx.

Αρχικά χορηγήθηκε στα ποντίκια Tmx με ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε συγκέντρωση 50 mg/kg ποντικού την ημέρα για 10 ημέρες. Η θανάτωση των ζώων και η λήψη των ιστών έγινε 2 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης του Tmx. Ωστόσο, η συγκέντρωση αυτή δεν ήταν αρκετή για να επάγει τον επιθυμητό Cre-διαμεσολαβούμενο ανασυνδυασμό ο οποίος ελέγχθηκε με PCR (Πίνακας 4.1) και φυσικά δεν είχε καμία επίδραση στην επιβίωση των ζώων (Εικόνα 4.4Α).

Στη συνέχεια, αυξήθηκε η χορηγούμενη συγκέντρωση του Tmx σε 100 mg/kg ποντικού την ημέρα για 10 ημέρες. Η αύξηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα επιτυχή ειδικό ανασυνδυασμό στο γονίδιο *Enpp2* των R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} ποντικών. Η πιστοποίηση της ιστοειδικής έκφρασης της Cre ελέγχθηκε με PCR ανασυνδυασμού σε όλους τους ιστούς που ελέγχθηκαν. Η ειδικότητα του ανασυνδυασμού έγκειται στο γεγονός ότι συνέβη μόνο στα ποντίκια που έφεραν το αλλήλιο R26Cre-ER^{T2} (Πίνακας 4.1). Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1, ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης παρατηρήθηκε και στους εξετασθέντες ιστούς των R26Cre-ER^{T2}/*Enpp*2^{n/n} ποντικών που έλαβαν αραβοσιτέλαιο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.4B, απεβίωσε ένα ποσοστό της τάξης του 30% των R26Cre-ER^{T2}/*Enpp*2^{n/n} ποντικών που έλαβαν Tmx, χωρίς ωστόσο η παρατηρούμενη διαφορά συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες να είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 4.1: R26CreER^{T2}-διαμεσολαβούμενος ανασυνδυασμός του γονιδίου *Enpp2*, έπειτα από ανάλυση με PCR που διεξήχθη σε διάφορους ιστούς ποντικών της πειραματικής ομάδας R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} (ATXiCre) και των ομάδων ελέγχου *Enpp2*^{n/n} (ATX) και R26Cre-ER^{T2} (iCre). Παρουσιάζονται η χορηγούμενη συγκέντρωση του Tmx, το μοντέλο και η χρονική διάρκεια χορήγησης.

		13					1					
	Genotype	ATXiCre	ATXiCre	ATXiCre	ATX	ATX	ATXiCre	ATXiCre	ATX	ATX	iCre	iCre
	Treatmen t	Tmx	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil
	mg/Kg	50	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-
	Route	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP
	Days	10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5
	Brain	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 1/1	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Heart	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 2/2	+ 1/2	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
s	Lung	- 1/1	+ 6/6	+ 2/2	- 4/4	- 2/2	+ 8/8	+ 4/5	- 6/6	- 4/4	- 6/6	- 5/5
sue	Gut	-1/1	+ 6/6	+ 2/2	- 4/4	- 2/2	+ 11/11	+ 7/7	- 6/6	- 4/4	- 6/6	- 5/5
tis	Spleen	- 1/1	+ 6/6	+ 2/2	- 4/4	- 2/2	+ 11/11	+ 7/7	- 6/6	- 4/4	- 6/6	- 5/5
in	Thymus	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 2/2	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
lation	Spinal cord	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 3/3	+ 2/2	-3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
bin	Kidney	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 1/1	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
n	Liver	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 2/2	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
ece	Ovary	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 3/3	+ 1/2	- 2/2	- 1/1	- 2/2	- 2/2
R	Testis	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 1/1	nd	-1/1	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Lymph nodes	nd	nd	nd	nd	nd	+ 3/3	+ 1/1	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2

	Genotype	ATXiCre	ATXiCre	ATX	ATX	iCre	iCre	ATXiCre*	ATXiCre*
	Treatment	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil
	mg/Kg	180	-	180	-	180	-	180	-
	Route	PO	PO	PO	PO	PO	PO	PO	PO
	Days	6	6	6	6	6	6	6	6
	Brain	+ 9/9	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	+2/2	-2/2
ŝ	Heart	+ 8/8	+ 2/2	- 3/3	- 2/2	- 5/5	- 3/3	nd	nd
sue	Lung	+ 9/9	+ 2/2	- 3/3	- 3/3	- 5/5	- 3/3	+1/1	-2/2
tis	Gut	+ 11/11	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	+1/1	-2/2
in	Spleen	+ 11/11	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 4/4	- 3/3	nd	nd
on	Stomach	+ 8/8	+ 2/2	- 3/3	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd
ati	Spinal cord	+ 9/9	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd
bin	Kidney	+ 9/9	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd
m	Liver	+ 11/11	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 6/6	- 3/3	+1/1	-2/2
ece	Ovary	+1/1	nd	- 2/2	- 2/2	- 1/1	- 1/1	nd	nd
R	Testis	+ 6/6	+ 2/2	- 1/1	- 1/1	- 1/1	- 1/1	nd	nd
	Lymph nodes	+ 10/10	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd

ATX: ομόζυγα *Enpp2*^{n/n}, iCre: ετερόζυγα R26CreER^{T2}.

ΙΡ: ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση; ΡΟ: από του στόματος έγχυση στο στομάχι.

Το + υποδηλώνει πλήρη ανασυνδυασμό των *loxP*1 – *loxP*3 και εκτομή των εξονίων 1 και 2 του *Enpp*2 καθώς και της κασέτας της νεομυκίνης, όπως περιγράφτηκε προηγουμένως (PMID: 20079728).

nd: δεν εξετάστηκε

Το + 1/2 υποδηλώνει επιτυχή ανασυνδυασμό σε ένα από τα δύο ποντίκια που εξετάστηκαν.

Το * υποδηλώνει στέγαση των ποντικών που έλαβαν Tmx σε ξεχωριστά κλουβιά.



Εικόνα 4.4: Η επαγόμενη από το Tmx γενετική απενεργοποίηση της ATX δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των ποντικών. Έλεγχος της επιβίωσης σε ποντίκια της πειραματικής ομάδας R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου R26Cre-ER^{T2} και Enpp2^{n/n} έπειτα από χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων Tmx για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, χρησιμοποιώντας δύο μοντέλα χορήγησης (IP και PO). Χορήγηση Tmx: A. IP, 50 mg/kg/ημέρα για 10 ημέρες, B. IP, 100 mg/kg/ημέρα για 10 ημέρες, C. IP, 100 mg/kg/ημέρα για 5 ημέρες, D. PO, 180 mg/kg/ημέρα για 4 ημέρες, διακοπή για 3 ημέρες και συνέχιση για άλλες 2 ημέρες.

Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με τη δοκιμή Logrank test. Οι αλληλεπικαλυπτόμενες καμπύλες δείχνονται με διαδοχικά σύμβολα. Τα αποτελέσματα και οι αριθμοί των ποντικών είναι αθροιστικά από 1 (A), 3 (B) και 4 (C, D) πειράματα.

Η συγκριτική ιστοπαθολογική εξέταση σε 44 συνολικά ιστούς R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} ποντικών με γενετικά απενεργοποιημένη ATX αλλά και των ομάδων ελέγχου που λήφθησαν 2 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης του Tmx στο μοντέλο των 100 mg/kg IP ανά ημέρα για 10 ημέρες, δε φανέρωσε ιδιαίτερα σημαντικά ευρήματα, με εξαίρεση τον πνεύμονα και το γαστρεντερικό σωλήνα (έντερο λεπτό και παχύ, στομάχι), τα οποία παρουσίασαν ήπια, μέτρια και σε ορισμένες περιπτώσεις σοβαρή φλεγμονώδη βλάβη (Πίνακας 4.2, Εικόνα 4.5). Τα εξετασθέντα όργανα ήταν: καρδιά, θύμος, γλώσσα, στέρνο, πνεύμονας, θυροειδής, τραχεία, σιελογόνοι αδένες, νεφροί, επινεφρίδια, ήπαρ, σπλήνας, πάγκρεας, γαστρεντερικός σωλήνας, αναπαραγωγικά όργανα, ουροδόχος κύστη, δέρμα, μαστικός αδένας στα θηλυκά, κεφαλή (5 κομμάτια), οπίσθιο άκρο, σπόνδυλοι, νωτιαίος μυελός (αυχενικός, θωρακικός, οσφυικός).

	Mouse	Affected tissues	Affected tissues Diagnosis		
	No				
	N295	Lung	Interstitial pneumonia	Moderate	
		Small gut	Enteritis	Mild	
		Colon	Typhlitis	Mild	
		Cecum	Adult helminthes	Mild	
	N1	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
		Small gut	Enteritis	Mild	
XL		Colon	Typhlitis	Moderate	
L L		Cecum	Typhlitis	Moderate	
+		Spleen	Histiocytosis		
2n/r		Stomach	Gastritis	Mild	
dd	N303	Lung	Interstitial pneumonia	Moderate	
En		Small gut	Enteritis	Mild	
12/		Colon	Typhlitis	Moderate	
ER		Cecum	Typhlitis	Moderate	
-e		Spleen	Histiocytosis	N 611 1	
l Ĉ	N305	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
2 2		Small gut	Enteritis	Mild	
		Colon	Typhlitis	Moderate	
		G	Colitis	Mild	
	NIGOO	Cecum	Typhlitis	Moderate	
	N308	Lung	Interstitial pneumonia	Moderate	
		Small gut	Enteritis	Mild	
		Colon	Typhylitis	Moderate	
	NIGOO	T	Colitis	Mild	
	N300	Lung	Interstitial pneumonia	Severe	
		Small gut	Entertus Califia	Milla Same	
	N/201	Luna		Severe	
	N301	Lung Small sut	Interstitial pneumonia	Severe	
		Small gut	Colitia	Milla	
		Cololi	Contritio	Severe	
		Stolliacii	Gastrius Uvistio systemia, neutrombilio	MIId	
×		Spleen	Neutrophilia		
<u> </u>	N204	Lung	Interstitial proumonia	Mild	
+	11304	Small gut	Enteritis	Moderate	
u/u		Colon	Typhylitis	Moderate	
p2		Stomach	Gastritis	Moderate	
du		Spleen	Hystiocytosis	Wioderate	
	N306	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
	11300	Small gut	Enteritis	Mild	
		Colon	Typhylitis	Moderate	
	N307	Ling	Interstitial pneumonia	Mild	
	11307	Small gut	Enteritis	Moderate	
		Colon	Typhylitis	Severe	
		Colon	Colitis	Severe	
		Stomach	Gastritis	Moderate	
	N339	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
		Small gut	Enteritis	Moderate	
		Colon	Typhylitis	Severe	
			Colitis	Severe	
	N341	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
12		Small gut	Enteritis	Moderate	
ER		Colon	Typhylitis	Severe	
L'm_			Colitis	Severe	
S +	N342	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
R2(Colon	Typhylitis	Severe	
			Colitis	Severe	
	N343	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	
		Colon	Typhylitis	Severe	
		-	Colitis	Severe	
	N346	Lung	Interstitial pneumonia	Mild	

Πίνακας 4.2: Ευρήματα ιστοπαθολογικής εξέτασης έπειτα από επαγόμενη από το Tmx γενετική απαλοιφή της ATX σε ποντίκια της πειραματικής ομάδας R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου Enpp2^{n/n} και R26Cre-ER^{T2} (100 mg/kg Tmx για 10 ημέρες, IP).

		Colon	Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
	N250	Lung	Interstitial pneumonia	Mild
		Colon	Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
	N355	Lung	No significant findings	
ų		Small gut	No significant findings	
5.		Colon	No significant findings	
oil Cr		Spleen	No significant findings	
26 + +	N357	Lung	No significant findings	
R R		Small gut	Enteritis	Mild
E		Colon	No significant findings	
		Spleen	No significant findings	



Εικόνα 4.5: Η *in vivo* χορήγηση Tmx έχει ως αποτέλεσμα ήπια φλεγμονή στον πνεύμονα και το έντερο (λεπτό και παχύ). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης (H&E) σε τομές ιστών από ποντίκια R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tmx 100 mg/kg ποντικού την ημέρα ή αραβοσιτέλαιου για 10 ημέρες. Τα ζώα θυσιάστηκαν 2 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης. Κλίμακα: 50 μm.

Παρατηρώντας την Εικόνα 4.5 και τον Πίνακα 4.2 συμπεραίνεται ότι όλα τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε Tmx εμφάνισαν παρόμοιες φλεγμονώδεις αλλαγές ανεξάρτητα από την ομάδα στην οποία ανήκαν (πειραματική ή ελέγχου), σε αντίθεση με τα ποντίκια που έλαβαν αραβοσιτέλαιο στα οποία δεν παρατηρήθηκε καμία εμφανής ιστοπαθολογική βλάβη.

Για τη μελέτη της επίδρασης του Tmx στους ιστούς των ποντικών στο βάθος του χρόνου, η τακτική που ακολουθήθηκε ήταν η θανάτωση των ποντικών και η επακόλουθη λήψη των ιστών 20 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης του Tmx. Η φλεγμονή που είχε παρατηρηθεί στις 2 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της αγωγής με Tmx δεν παρατηρήθηκε όταν οι ιστοί λήφθηκαν από τα ζώα σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το τέλος χορήγησης του Tmx, δηλαδή σε 20 ημέρες (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Η γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ δεν αλλάζει ιστολογικά τη μορφολογία των ιστών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης (H&E) σε τομές ιστών από ποντίκια R26CreER^{τ2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tmx 100 mg/kg ποντικού την ημέρα ή αραβοσιτέλαιου για 10 ημέρες. Τα ζώα θυσιάστηκαν 20 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης. Κλίμακα: 150 μm.

Προκειμένου να μειωθεί η τοξικότητα που δημιουργείται λόγω του Tmx στους ιστούς, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα μόνο που η αγωγή με Tmx διήρκεσε για 5 ημέρες αντί για 10. Οι 5 ημέρες διάρκειας του μοντέλου αγωγής με Tmx ήταν αρκετές για να επιτευχθεί ο επιθυμητός Cre-διαμεσολαβούμενος ανασυνδυασμός στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} που έλαβαν Tmx (Πίνακας 4.1). Ωστόσο, ανασυνδυασμός παρατηρήθηκε και στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} που έλαβαν Tmx (Πίνακας 4.1). Ωστόσο, ανασυνδυασμός παρατηρήθηκε και στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} που έλαβαν Tmx (πίνακας 4.1). Αναφορικά με την επιβίωση των ζώων, απεβίωσε ένα ποσοστό της τάξης του 25% των R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} ποντίκών που έλαβαν Tmx, χωρίς ωστόσο η παρατηρούμενη διαφορά σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 4.4C). Επιπλέον, η ιστολογική παρατήρηση του πνεύμονα, του εντέρου και του σπλήνα δεν έδειξε διαφορές ή βλάβες όταν οι ιστοί λήφθησαν από τα ζώα 10 και 20 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης του Tmx (Εικόνα 4.7).





Εικόνα 4.7: Η γενετική αποκοπή της ΑΤΧ δεν αλλάζει ιστολογικά τη μορφολογία των ιστών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης (H&E) σε τομές ιστών από ποντίκια R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tmx 100 mg/kg ποντικού την ημέρα ή αραβοσιτέλαιου για 5 ημέρες. Τα ζώα θυσιάστηκαν 10 (πνεύμονας, λεπτό έντερο) και 20 ημέρες (κόλον, σπλήνας) μετά το πέρας της χορήγησης Tmx, αντίστοιχα. Κλίμακα: 150 μm.

4.Α.2. Το μεγαλύτερο μέρος της δραστικότητας της ΑΤΧ δεν είναι απαραίτητο στην ενήλικη ζωή

4.Α.2.1. Επιβεβαίωση της γενετικής απενεργοποίησης της ΑΤΧ με διαφορετικό τρόπο χορήγησης του Tmx (PO)

Επόμενος στόχος ήταν η επιβεβαίωση της γενετικής απαλοιφής της ΑΤΧ με το επαγόμενο από το Tmx γενετικό σύστημα αλλά με μία πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη οδό χορήγησης του Tmx. Η αγωγή έγινε με από του στόματος απευθείας έγχυση της ουσίας στο στομάχι των ποντικών (oral gavage, Per Os: PO). Χορηγήθηκε Tmx σε ποντίκια της πειραματικής ομάδας και των ομάδων ελέγχου σε συγκέντρωση 180 mg/kg ποντικού την ημέρα για 4 ημέρες, διακοπή για 3 ημέρες και συνέχιση για άλλες 2 ημέρες. Η θανάτωση των ζώων και η λήψη των ιστών έγινε τη 18ⁿ και την 30ⁿ ημέρα από το τέλος της αγωγής με Tmx (Εικόνα 4.4D). Ο Cre-διαμεσολαβούμενος ανασυνδυασμός στο γονίδιο *Enpp2* ήταν επιτυχής μόνο σε όλους τους ιστούς των ποντικών που έφεραν το R26Cre-ER^{T2} αλλήλιο (Πίνακας 4.1). Η «διαρροή» του συστήματος του Cre ανασυνδυασμού στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} που έλαβαν αραβοσιτέλαιο αποφεύχθηκε με τη στέγαση των ποντικών του παραπάνω γενοτύπου που έλαβαν Tmx σε ξεχωριστά κλουβιά από εκείνα που έλαβαν μόνο αραβοσιτέλαιο (Πίνακας 4.1).

Όσον αφορά την επιβίωση των ποντικών στα οποία απενεργοποιήθηκε η ATX, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.4D, τα ποντίκια της πειραματικής ομάδας R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} στα οποία δόθηκε Tmx παρουσίασαν ίδια ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου R26Cre-ER^{T2} που έλαβαν επίσης Tmx και στα οποία δεν απαλείφθηκε η ATX (Εικόνα 4.4D). Ο έλεγχος του σωματικού βάρους των ποντικών όλων των εξετασθέντων ομάδων από την έναρξη της αγωγής με Tmx έως και τη 16^η ημέρα μετά το πέρας της χορήγησης, έδειξε σταδιακή απώλεια βάρους των R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} και R26Cre-ER^{T2} ποντικών που έλαβαν Tmx έως και την 4^η ημέρα μετά το πέρας της αγωγής, ενώ σταδιακή αύξηση βάρους σημειώθηκε από την 5^η ημέρα μέχρι το τέλος της παρακολούθησης (Εικόνα 4.8). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο παραπάνω ομάδες ποντικιών ήταν αυτές στις οποίες παρατηρήθηκε θνησιμότητα, η οποία ξεκίνησε από την 4^η ημέρα (Εικόνα 4.4D). Η ιστολογική εξέταση των οργάνων (πνεύμονας, λεπτό και παχύ έντερο, σπλήνας, θύμος αδένας, νεφροί, ήπαρ, ωοθήκες) των ποντικών τόσο της πειραματικής ομάδας όσο και των ομάδων ελέγχου που έγινε τη 18^η και την 30^η ημέρα από το τέλος της χορήγησης του Tmx δεν έδειξε κάποια παθολογική βλάβη (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.8: Έλεγχος του σωματικού βάρους των ποντικών κατά τη διάρκεια της PO χορήγησης 180 mg/kg ποντικού Tmx ή αραβοσιτέλαιου την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή και μετά το πέρας της αγωγής.

Για τη μελέτη της επίδρασης της γενετικής απενεργοποίησης της ΑΤΧ στη φυσιολογία των ποντικών πραγματοποιήθηκε βιοχημική κι αιματολογική ανάλυση στα ποντίκια της πειραματικής ομάδας R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από την PO χορήγηση Tmx. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων δεν έδειξαν διαφορές στις ελεγχθείσες παραμέτρους που να υποδεικνύουν κάποια ηπατική, νεφρική ή παγκρεατική βλάβη (Εικόνα 4.10), αλλά ούτε και διαφορά στους κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος (Εικόνα 4.11) των ποντικών με γενετικά αποκομμένη ATX σε σχέση με τα ποντίκια των ομάδων ελέγχου.





Εικόνα 4.9: Η γενετική αποκοπή της ΑΤΧ δεν έχει επίδραση στην ιστολογία των οργάνων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες χρώσης ηωσίνης-αιματοξυλίνης (H&E) σε τομές ιστών πνεύμονα, λεπτού και παχέος εντέρου, σπλήνα, νεφρών, θύμου, ήπατος και ωοθηκών από ποντίκια της ομάδας R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από την PO χορήγηση 180 mg/kg ποντικού Tmx ή αραβοσιτέλαιου την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή. Τα ζώα θυσιάστηκαν 18 και 30 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης Tmx. Κλίμακα: 150 μm



Εικόνα 4.10: Η γενετική απενεργοποίηση της ΑΤΧ δεν επιφέρει αλλαγές στις βιοχημικές λειτουργίες των ποντικών. Βιοχημική ανάλυση του πλάσματος ποντικών της ομάδας R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από την PO χορήγηση 180 mg/kg ποντικού Tmx ή αραβοσιτέλαιου την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 3–8 σε κάθε κατηγορία, αποτελέσματα αθροιστικά από 2 πειράματα. AST: τρανσαμινάση του ασπαραγινικού, ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης, CPK: κινάση της φωσφορικής κρεατίνης; LDH: γαλακτική αφυδρογονάση, γ-GT: γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση.

4.Α.2.2. Επίδραση της γενετικής απαλοιφής του *Enpp*2 στην έκφραση της ΑΤΧ και την παραγωγή του LPA

Από τα έως τώρα δεδομένα είναι γνωστό ότι η ΑΤΧ παρουσιάζει ευρεία έκφραση στο ενήλικο ποντίκι, με τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στον εγκέφαλο, τα αναπαραγωγικά όργανα (όρχεις, ωοθήκες), το έντερο, τους νεφρούς και τον πνεύμονα ⁵³. Επίσης, είναι γνωστή η παραγωγή κι έκκριση της ΑΤΧ στην κυκλοφορία από τα λιποκύτταρα ⁴¹⁴.



Εικόνα 4.11: Η γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ δεν επηρεάζει τους αιμοποιητικούς κυτταρικούς πληθυσμούς ποντικών της ομάδας R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} και των ομάδων ελέγχου έπειτα από την PO χορήγηση 180 mg/kg ποντικού Tmx ή αραβοσιτέλαιου την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 3–6 σε κάθε κατηγορία. WBC: λευκά αιμοσφαίρια, LYMPH: λεμφοκύτταρα, MXD: μονοκύτταρα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, GRA: κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα), RBC: ερυθρά αιμοσφαίρια, HGB: αιμοσφαιρίνη, HCT: αιματοκρίτης, MCV: μέσος όγκος ερυθροκυττάρων, MCH: μέση περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη, MCHC: μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, RDW: εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων, PDW: σχετικό εύρος κατανομής αιμοπεταλίων, PDW: σχετικό εύρος κατανομής αιμοπεταλίων.

Η ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων της ATX σε ποντίκια C57BL/6 φυσικού τύπου (Wt) που πραγματοποιήθηκε με Real Time RT-PCR επιβεβαίωσε τη μεγαλύτερη έκφραση της ATX στον εγκέφαλο και το λιπώδη ιστό (λευκό-WAT και καφέ-BAT), όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.12A. Η επαγόμενη από το Tmx γενετική απενεργοποίηση της ATX στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} έπειτα από χορήγηση Tmx σε συγκέντρωση 180 mg/kg ποντικού την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή, επέφερε μείωση της έκφρασης της ATX σε μεταγραφικό επίπεδο σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80% συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου R26Cre-ER^{T2} σε όλα τα εξετασθέντα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και του λιπώδους ιστού, όπως αυτή ποσοτικοποιήθηκε με Real-Time RT-PCR (Εικόνα 4.12B).



Εικόνα 4.12: Η επαγόμενη από το Tmx (180 mg/kg ποντικού την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή, PO) R26Cre-ER^{T2}-διαμεσολαβούμενη γενετική απαλοιφή της ATX μειώνει την έκφραση της ATX στους ιστούς και το πλάσμα. Α. Έκφραση της ATX στους ιστούς ποντικών Wt με σχετική ποσοτικοποίηση ως προς το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης με Real-Time RT-PCR. B. % μείωση της έκφρασης της ATX σε μεταγραφικό επίπεδο σε διάφορους ιστούς ποντικών έπειτα από επαγωγή με Tmx όπως ποσοτικοποιήθηκε με Real-Time RT-PCR. C. Ανοσοαποτύπωση Western για την ATX στο πλάσμα την ATX στο πλάσμα χρησιμοποιώντας το αντι-ATX αντίσωμα 4F1. D Δραστικότητα της ATX % στο πλάσμα όπως προσδιορίστηκε με την τεχνική TOOS.

Αριθμός εξετασθέντων ποντικών: (Α και Β) 5–10 αθροιστικά από 2 πειράματα, με εξαίρεση το λιπώδη ιστό (BAT, WAT) όπου εξετάστηκαν 4 ζώα από 1 πείραμα, (D) 13–27 αθροιστικά από 3 πειράματα.

Η επαγόμενη από το Tmx γενετική απαλοιφή της ATX στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n}, όπως ήταν αναμενόμενο, επέφερε μείωση των επιπέδων της ATX στην κυκλοφορία των ποντικών όπως φάνηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, μιας και η ATX ήταν ελάχιστα ανιχνεύσιμη με το μονοκλωνικό αντι-ATX αντίσωμα 4F1 (Εικόνα 4.12C). Η πλήρης εικόνα του Western, η χρώση με coomassie ως έλεγχος ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων καθώς και η ανοσοαποτύπωση με ένα δεύτερο εμπορικό αντίσωμα, το πολυκλωνικό αντι-ATX Cayman παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.13 A-C.


Εικόνα 4.13: Α. Ανοσοαποτύπωση Western στο πλάσμα των αναγραφομένων ποντικών με το rat αντι-ΑΤΧ μονοκλωνικό αντίσωμα 4F1, Β. Ανοσοαποτύπωση Western στο πλάσμα των ίδιων ποντικών με το εμπορικό rabbit αντι-ΑΤΧ πολυκλωνικό αντίσωμα Cayman, C. Χρώση με Coomassie brilliant blue ως έλεγχος ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων. D. Δραστικότητα της ATX σε nmol/min/ml στο πλάσμα των ποντικών όλων των ομάδων μετά από λήψη Tmx ή αραβοσιτέλαιου όπως προσδιορίστηκε με την τεχνική TOOS. Ε. Συγκέντρωση της ATX στο πλάσμα των αναγραφομένων ποντικών σε μg/ml όπως προσδιορίστηκε με Elisa. Αριθμός εξετασθέντων ζώων: (D) 5–27, (E) 13-27 αθροιστικά από 3 πειράματα.

Η δραστικότητα της ΑΤΧ στο πλάσμα των R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} ποντικών που έλαβαν Tmx μειώθηκε κατά 80% συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου R26Cre-ER^{T2} που έλαβαν αντίστοιχα Tmx, όπως προσδιορίστηκε με την τεχνική TOOS σε φυσικά υποστρώματα LPC (16:0) (Εικόνα 4.12D, Εικόνα 4.13D). Στην εικόνα 4.13D παρουσιάζονται τα επίπεδα της δραστικότητας της ATX (nmol/min/ml) στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} σε σχέση με όλες τις ομάδες ελέγχου έπειτα από λήψη Tmx ή αραβοσιτέλαιου, ενώ στην εικόνα 4.13E τα επίπεδα της συγκέντρωσης της ATX (μg/ml). Παρόμοια αποτελέσματα μείωσης της δραστικότητας και των επιπέδων της ATX στην κυκλοφορία των ποντικών λήφθησαν με την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tmx ή αραβοσιτέλαιου για 10 ή 5 ημέρες. Η γενετική εξάλειψη της ΑΤΧ στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} πέρα από τη μείωση της δραστικότητας του ενζύμου, επέφερε μείωση των επιπέδων του LPA στην κυκλοφορία, όπως ήταν αναμενόμενο, ενώ τα πιθανά υποστρώματα της ΑΤΧ παρέμειναν σταθερά (Εικόνα 4.14). Τα ακόλουθα είδη LPA (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C22:6) και τα λυσοφωσφολιπίδια-πιθανά υποστρώματα της ΑΤΧ LPI (C16:0, C18:0), LPG (C16:0, C18:0), LPG (C16:0, C18:0), LPG (C16:0, C18:0), LPG (C16:0, C18:0), LPE (C16:0, C18:0), LPS (C16:0, C18:0), LPC (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C24:0) προσδιορίστηκαν στο πλάσμα με HPLC-ESI/MS/MS χρησιμοποιώντας το σύστημα RSLCnano (Ultimate 3000 Series, Dionex Corporation) συζευγμένο με το φασματόμετρο μάζας LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Waltham, MA).



Εικόνα 4.14: Η επαγόμενη από το Tmx (180 mg/kg ποντικού την ημέρα για 6 ημέρες με ενδιάμεση διακοπή, PO) R26Cre-ER^{T2}-διαμεσολαβούμενη γενετική εξάλειψη της ATX έχει ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων του LPA στην κυκλοφορία, παρά τα σταθερά επίπεδα των λυσοφωσφολιπιδίων (πιθανών υποστρωμάτων της ATX), όπως προσδιορίστηκαν με HPLC-MS/MS. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών: 9–13 αθροιστικά από 2 πειράματα.

Το μοντέλο της επαγόμενης γενετικής απαλοιφής της ΑΤΧ στα ποντίκια R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} που περιγράφηκε στις προηγούμενες ενότητες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ΑΤΧ κατά περίπου 80% των φυσιολογικών επιπέδων, ενώ η μείωση αυτή δεν επέφερε καμία τοξική βλάβη στα ποντίκια. Προκειμένου να επιτευχθεί περαιτέρω μείωση των επιπέδων της δραστικότητας του ενζύμου και να εκτιμηθεί τυχόν τοξικότητα στο ενήλικο ποντίκι λόγω μεγαλύτερης μείωσης της ΑΤΧ στην κυκλοφορία, επιχειρήθηκε η γενετική απαλοιφή σε ποντίκια R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/dflx}. Από το dflx αλλήλιο απουσιάζει η ΑΤΧ, όπως παρουσιάστηκε στην Εικόνα 4.3Α, στο οποίο έχει συμβεί ανασυνδυασμός μεταξύ των θέσεων *loxP*1 και *loxP*3. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν οι εξής διασταυρώσεις ποντικών: Αρχικά R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} με Enpp2^{dflx/+} και λήφθησαν οι

γενότυποι *Enpp2*^{n/dflx} και R26CreER^{T2}/*Enpp2*^{n/dflx}. Στη συνέχεια, διασταυρώθηκαν τα R26CreER^{T2}/*Enpp2*^{n/dflx} με *Enpp2*^{n/n} και τα *Enpp2*^{n/dflx} με *Enpp2*^{n/n}/R26CreER^{T2} και προέκυψαν απόγονοι, από τους οποίους επιλέχθηκαν τα ποντίκια με τους επιθυμητούς γενότυπους. Οι ομάδες ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η R26CreER^{T2}/*Enpp2*^{n/dflx} ως πειραματική ομάδα και οι *Enpp2*^{n/n}, *Enpp2*^{n/dflx} και R26CreER^{T2}/*Enpp2*^{n/dflx} ως ομάδες ελέγχου. Η χορήγηση του Tmx έγινε στα ποντίκια σε συγκέντρωση 180 mg/kg/ημέρα για 4 ημέρες, ακολούθησε διακοπή για 3 ημέρες και συνέχιση της χορήγησης για τις επόμενες 2 ημέρες, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ορισμένα ποντίκια από κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες κι έλαβαν μόνο αραβοσιτέλαιο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.15, τα ποντίκια R26CreER^{T2}/*Enpp2*^{n/dflx} που έλαβαν Tmx έζησαν σε ποσοστό 90%, ενώ τα R26CreER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} με Tmx έζησαν σε ποσοστό 80%, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

+180mg/kg/day Tmx orally



Εικόνα 4.15: Η γενετική απενεργοποίηση της ΑΤΧ στα ποντίκια R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/dflx} με από του στόματος χορήγηση 180 mg/kg/ημέρα Tmx για 6 ημέρες βελτίωσε την επιβίωση των ποντικών.

Ωστόσο, η μείωση της δραστικότητας της ATX στα R26CreER^{T2}/*Enpp*2^{n/dfix} ποντίκια που έλαβαν Tmx δεν κυμάνθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% όπως ήταν η αρχική προσδοκία, σε σύγκριση με τα ποντίκια των ομάδων ελέγχου *Enpp*2^{n/dfix} και *Enpp*2^{n/n} που έλαβαν Tmx ή μόνο αραβοσιτέλαιο, γεγονός που ενδεχομένως υποδηλώνει ότι δεν είναι εφικτή μια περαιτέρω ελάττωση της δραστικότητας της ATX.

4.Α.3. Η ισχυρή φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ δεν επιφέρει τοξικότητα στο ποντίκι

4.Α.3.1. Φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ

Για τη διερεύνηση της καταλληλότητας και της «ασφάλειας» της ΑΤΧ ως θεραπευτικού στόχου, πέρα από τη γενετική αναστολή *in vivo* μελετήθηκε και η φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ.

Για το σκοπό αυτό, σε ποντίκια φυσικού τύπου (Wt) χορηγήθηκε ο ισχυρός αναστολέας της ATX PF8380 [6-(3-(piperazin-1-yl)propanoyl)-benzo[d]oxazol-2(3H)-one] όπως περιγράφτηκε στην Ενότητα 3.22). Ο PF8380 είναι ένα μικρό μόριο με γραμμική κι ευέλικτη δομή, καλή από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα και με χαμηλό IC50 της τάξεως των 1.7 nM σε φυσικά υποστρώματα LPC ²⁹³. Η *in vitro* δοκιμή του PF8380 σε φυσικά υποστρώματα LPC επιβεβαίωσε τη δραστικότητά του προσδιορίζοντας το IC50 στα 1.9 nM (Εικόνα 4.16A). Η φαρμακοκινητική ανάλυση του αναστολέα έδειξε επαρκή βιοδιαθεσιμότητα, με τα επίπεδά του να παραμένουν πάνω από τη συγκέντρωση IC50 για τουλάχιστον 12 ώρες (Εικόνα 4.16B). Παρά την παρατεταμένη χορήγηση του PF8380 στα ποντίκια, ήτοι δύο φορές ημερησίως για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων και την υψηλή δόση (120 mg/kg ποντικού), δεν παρατηρήθηκε απώλεια βάρους στα ποντίκια (Εικόνα 4.16C) ή ένδειξη τοξικότητας τουλάχιστον μακροσκοπικά, ενώ η δραστικότητα της ATX και τα επίπεδα του LPA της κυκλοφορίας μειώθηκαν σημαντικά και παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα έως και 9 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση του αναστολέα (Εικόνα 4.16D, Ε, F).



Εικόνα 4.16: Ο αναστολέας PF8380 αναστέλλει τη δραστικότητα της ATX *in vitro* και *in vivo*. A. Καμπύλη δόσης απόκρισης της αναστολής της ATX υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο TOOS χρησιμοποιώντας 50 μM 16:0 LPC ως υπόστρωμα, B. Φαρμακοκινητικό προφίλ του PF8380 στο πλάσμα ποντικών έπειτα από χορήγηση 120 mg/kg PF8380 για 3 εβδομάδες, C. Η ισχυρή φαρμακολογική αναστολή της ATX με τον PF8380 δεν επιφέρει αλλαγές στο σωματικό βάρος των ποντικών, D. Η % δραστικότητα της ATX όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο TOOS χρησιμοποιώντας 1 mM 16:0 LPC ως υπόστρωμα σε διάφορα χρονικά σημεία μετά τη χορήγηση του PF8380 στα ποντίκια ως ανωτέρω, E. Τα % επίπεδα του ολικού LPA και F. της συγκέντρωσης των ειδών του LPA σε διάφορα χρονικά σημεία μετά τη χορήγηση του PF8380 στα ποντίκια ως ανωτέρω. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών: 4–7 αθροιστικά από 2 πειράματα.

Για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της φαρμακολογικής αναστολής της ΑΤΧ στη φυσιολογία του ποντικού, εξετάστηκαν ιστολογικά 13 κύρια όργανα ποντικών στα οποία είχε χορηγηθεί ο PF8380 όπως περιγράφτηκε προηγουμένως. Η ιστολογική παρατήρηση δεν έδειξε κάποια παθολογική αλλαγή (Εικόνα 4.17), αποδεικνύοντας ότι η ΑΤΧ είναι ασφαλές να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικός στόχος.



Εικόνα 4.17: Η ισχυρή φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ δεν αλλάζει την ιστολογία των εξετασθέντων οργάνων (πνεύμονας, λεπτό και παχύ έντερο, νεφροί, ήπαρ, λεμφαδένες, σπλήνας, ωοθήκες, εγκέφαλος, θύμος αδένας, νωτιαίος μυελός, καρδιά, στόμαχος). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές ιστών έπειτα από χρώση H&E σε ποντίκια που έλαβαν τον PF8380 (120 mg/kg, PO), ή μόνο φορέα (vehicle), δύο φορές ημερησίως για 3 εβδομάδες. Κλίμακα: 150 μm.

4.Β. Ο ρόλος της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή

4.Β.1. ΑΤΧ και συστεμική φλεγμονή στο ποντίκι

4.Β.1.1. Μεταβολή των επιπέδων της ΑΤΧ στην επαγόμενη από το LPS συστεμική φλεγμονή

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή της ΑΤΧ στους παθογενετικούς μηχανισμούς που διέπουν τη συστεμική φλεγμονή, αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της δραστικότητας της ΑΤΧ στην κυκλοφορία ποντικών φυσικού τύπου σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα σε πειραματικό μοντέλο συστεμικής φλεγμονής και έγινε μελέτη σε in *vivo* επίπεδο (επιβίωση/θνησιμότητα). Το μοντέλο σήψης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS από E.coli, το οποίο αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή του υποδοχέα TLR4. Τα ποντίκια έπειτα από τη χορήγηση LPS παρουσίασαν κάποια χαρακτηριστικά στη συμπεριφορά και την όψη τους ενδεικτικά της συστεμικής φλεγμονής. Αυτά περιελάμβαναν μεταξύ άλλων ανασηκωμένο τρίχωμα, έλλειψη κινητικότητας, κυρτωμένη στάση σώματος, αλλαγμένο αναπνευστικό ρυθμό, κλειστά μάτια ή/και με εκκρίσεις και απώλεια βάρους.

Έπειτα από δοκιμές ως προς τη χορηγούμενη συγκέντρωση του LPS, δόθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 20 mg/kg ποντικού LPS σε φυσικού τύπου ποντίκια C57Bl/6 και παρακολουθήθηκε η επιβίωσή τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που έλαβε φυσιολογικό ορό. Μια τυπική καμπύλη επιβίωσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.18Α.



Α

Εικόνα 4.18: Η συστεμική φλεγμονή λόγω LPS προκαλεί το θάνατο των ποντικών και μειώνει την ATX 21 ώρες μετά τη χορήγηση. Α. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS σε ποντίκια φυσικού τύπου προκαλεί το θάνατο των ποντικών σε ποσοστό περίπου 88% σε σχέση με τα ποντίκια που έλαβαν φυσιολογικό ορό, Β. Σχετικά επίπεδα δραστικότητας και Γ. συγκέντρωσης της ΑΤΧ στο πλάσμα των ποντικών 21 ώρες μετά τη χορήγηση του LPS. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 11-12, αθροιστικά από 2 πειράματα.

Για τον έλεγχο των επιπέδων της ΑΤΧ ακριβώς πριν τη χρονική στιγμή έναρξης της θνησιμότητας των ποντικών στην LPS-επαγόμενη συστεμική φλεγμονή, τα ποντίκια Wt θυσιάστηκαν 21 ώρες μετά τη χορήγηση του LPS. Τόσο τα επίπεδα της ATX όσο και η δραστικότητα του ενζύμου στο πλάσμα παρουσίασαν μείωση (Εικόνα 4.18B,C). Στη συνέχεια, από τον προσδιορισμό της δραστικότητας της ATX στην κυκλοφορία 2, 4, 8 και 16 ώρες μετά τη χορήγηση του LPS παρατηρήθηκε αύξηση της ATX στις 2 ώρες και ελάττωση από τις 8 ώρες (Εικόνα 4.19).



Εικόνα 4.19: Η δραστικότητα της ΑΤΧ στο πλάσμα ποντικών φυσικού τύπου αυξάνεται στις 2 ώρες μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του LPS και στη συνέχεια μειώνεται. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 4-21.

4.Β.1.2. Διερεύνηση του ρόλου των μειωμένων επιπέδων της ΑΤΧ της κυκλοφορίας στην παθογένεια της σήψης

Ακολούθως, για τη διαλεύκανση του πιθανού ρόλου της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή, ελέγχθηκε εάν τα διαφορετικά επίπεδα της ΑΤΧ στην κυκλοφορία διαγονιδιακών ποντικών εμπλέκονται στην παθογένεση της σήψης και έγινε μελέτη σε *in vivo* επίπεδο.

Αρχικά, ετερόζυγα complete knockout για την ΑΤΧ ποντίκια που υποεκφράζουν ΑΤΧ υποβλήθηκαν σε πειραματική συστεμική φλεγμονή. Για το σκοπό αυτό, 20 mg/kg LPS χορηγήθηκαν στα ετερόζυγα complete knockout ποντίκια *Enpp2*^{dflx/+ 11}, τα οποία παρουσιάζουν κατά 50% μειωμένα επίπεδα ΑΤΧ και LPA στην κυκλοφορία σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια *Enpp2*^{+/+} και παρακολουθήθηκε η βιωσιμότητά τους (Εικόνα 4.20). ATX^{dflx} +20mg/kg LPS



Εικόνα 4.20: Τα μειωμένα κατά 50% επίπεδα της ΑΤΧ στην κυκλοφορία των *Enpp2*^{dflx/+} (ATX^{dflx/+}) ποντικών σε σχέση με τα *Enpp2*^{+/+} (ATX^{+/+}) προστατεύουν από τη συστεμική φλεγμονή λόγω LPS. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 29-31, αθροιστικά από 4 πειράματα. Αριστερά παρουσιάζονται τα επίπεδα δραστικότητας της ΑΤΧ στο πλάσμα των παραπάνω ποντικών.

Από την Εικόνα 4.20 φαίνεται ότι τα μειωμένα κατά 50% επίπεδα της ΑΤΧ στην κυκλοφορία προστατεύουν από τη συστεμική φλεγμονή αυξάνοντας την επιβίωση των ποντικών, υποδεικνύοντας ενδεχομένως έναν επιβλαβή ρόλο της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση ακόμη χαμηλότερων επιπέδων της ATX της κυκλοφορίας σε συνθήκες πειραματικής συστεμικής φλεγμονής, χορηγήθηκε LPS στα ποντίκια R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} στα οποία απενεργοποιήθηκε γενετικά η ATX έπειτα από την PO χορήγηση Tmx και προέκυψαν από τον πρώτο στόχο της παρούσας διατριβής, καθώς και στις ομάδες ελέγχου (Εικόνα 4.4D), 5 εβδομάδες μετά το τέλος της χορήγησης του Tmx/ αραβοσιτέλαιου (Εικόνα 4.21). Παρατηρήθηκε ότι τα μειωμένα κατά 80% επίπεδα της ATX στην κυκλοφορία προστατεύουν από τη συστεμική φλεγμονή αυξάνοντας την επιβίωση των ποντικών σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου, υποδεικνύοντας έναν επιβλαβή ρόλο της ATX στη συστεμική φλεγμονή. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθησαν και στη γενετική απαλοιφή της ATX με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του Tmx για 5 ημέρες.



Εικόνα 4.21: Τα μειωμένα κατά 80% επίπεδα της ΑΤΧ στην κυκλοφορία των R26CreER^{T2}/Enpp2^{n/n} ποντικών σε σχέση με τα R26CreER^{T2} προστατεύουν από τη συστεμική φλεγμονή λόγω LPS. Καμπύλη επιβίωσης έπειτα από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του LPS, 5 εβδομάδες μετά το πέρας της PO χορήγησης Tmx ή αραβοσιτέλαιου. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 4-17.

4.Β.1.3. Η συστηματική υπερέκφραση της ΑΤΧ στην κυκλοφορία δεν παίζει ρόλο στην παθογένεια της σήψης

Στη συνέχεια και προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της πλεονάζουσας ΑΤΧ της κυκλοφορίας στην πειραματική συστεμική φλεγμονή, χορηγήθηκε LPS σε ομόζυγα ποντίκια *Enpp2* Tg^{+/+} τα οποία υπερεκφράζουν ΑΤΧ (150%-200%) από το ήπαρ υπό τη δράση του προαγωγού της ανθρώπινης α1 αντιθρυψίνης (a1t1) ¹⁸⁹ και στα φυσικού τύπου αδέλφια τους ΑΤΧ Tg^{-/-} με φυσιολογικά επίπεδα ΑΤΧ (Εικόνα 4.22). Η επιπλέον ΑΤΧ φαίνεται ότι δεν επιφέρει κάποια αλλαγή ως προς την επιβίωση των ποντικών στην πειραματική συστεμική φλεγμονή και άρα δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της σήψης.



Εικόνα 4.22: Τα αυξημένα συστεμικά επίπεδα της ΑΤΧ δεν εμπλέκονται στην παθογένεια της συστεμικής φλεγμονής. Καμπύλη επιβίωσης έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση LPS σε ποντίκια *Enpp*2 Tg^{+/+} (ATX Tg^{+/+}) που υπερεκφράζουν ATX κατά 150%-200% και στα φυσικού τύπου αδέλφια τους *Enpp*2 Tg^{-/-} (ATX Tg^{-/-}). Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 22-25, αθροιστικά από 2 πειράματα.

4.Β.1.4. Διερεύνηση του ρόλου των υποδοχέων LPA₁ και LPA₂ στην πειραματική συστεμική φλεγμονή

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού ΑΤΧ/LPA και να αναλυθεί η ελαττωματική μεταγωγή σήματος του LPA στη συστεμική φλεγμονή, αρχικά διαγονιδιακοί ποντικοί knockout ως προς τον υποδοχέα LPA₁, οι οποίοι ήταν ομόζυγοι στην εκμηδενιστική μετάλλαξη του γονιδίου *Ipa1*¹¹⁴, υπεβλήθησαν σε πειραματική συστεμική φλεγμονή.

Η αρχική χορήγηση LPS σε συγκέντρωση 20 mg/kg όπως και προηγουμένως δεν επέφερε μεγάλη θνησιμότητα. Η ανθεκτικότητα των ποντικών LPA₁-^{-/-} και LPA₂-^{-/-} στο LPS οφείλεται στο γενετικό τους υπόβαθρο, μιας και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένας γενετικός τόπος στο χρωμόσωμα 9 σχετίζεται με τη διαφοροποιημένη απόκριση και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των στελεχών ποντικών 129S1/SvImJ και FVB/NJ στο LPS που

χορηγείται στην κυκλοφορία ⁴¹⁵. Για την αντιμετώπιση του θέματος αυτού, πραγματοποιήθηκαν αρκετές διασταυρώσεις των ποντικών LPAR με ποντίκια φυσικού τύπου C57Bl/6 προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό του γενετικού υποβάθρου C57Bl/6 και στη συνέχεια χορηγήθηκαν αυξημένες δόσεις του LPS. Για το σκοπό αυτό, 30 mg/kg LPS και στη συνέχεια 50 mg/kg LPS χορηγήθηκαν στα ποντίκια LPAR1^{-/- 114} και τα αδέλφια τους (littermates) LPAR1^{+/+} που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 4.23). Ωστόσο, η επαγόμενη από το LPS συστεμική φλεγμονή δεν είχε αξιοσημείωτη επίδραση στη βιωσιμότητα των ποντικών μιας και τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις LPS, υποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας LPA₁

30 mg/kg LPS



Εικόνα 4.23: Ο υποδοχέας LPA₁ δεν παίζει ρόλο στη συστεμική φλεγμονή λόγω LPS. Καμπύλη επιβίωσης έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 30 mg/kg LPS σε ποντίκια LPAR1^{-/-} και LPAR1^{+/+}. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 11-22, αθροιστικά από 2 πειράματα.

Ακολούθως, το πείραμα επαναλήφθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια ελλειμματικά ως προς τον υποδοχέα LPA₂ (LPA₂-^{-/-}). Στα ποντίκια αυτά, στα οποία έχει αποκοπεί τμήμα του γονιδίου *lpa2* που κωδικοποεί τις διαμεμβρανικές περιοχές IV έως VI ¹⁶⁵, χορηγήθηκε LPS σε συγκέντρωση 30 mg/kg και έγινε η μελέτη σε *in vivo* επίπεδο παρακολουθώντας τη βιωσιμότητά τους (Εικόνα 4.24).



Εικόνα 4.24: Ο υποδοχέας LPA₂ δεν παίζει ρόλο στην παθογένεια της συστεμικής φλεγμονής που επάγεται από LPS. Καμπύλη επιβίωσης έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 30 mg/kg LPS σε ποντίκια LPAR2^{-/-} και LPAR2^{+/+}. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 14-19, αθροιστικά από 2 πειράματα.

Δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως διαφορά ως προς την επιβίωση των ποντικών σε συνθήκες συστεμικής φλεγμονής, υποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας LPA₂ δεν εμπλέκεται στην παθογένεση της σήψης.

4.Β.1.5. Φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ στην πειραματική συστεμική φλεγμονή

Για τη διερεύνηση της θεραπευτικής ικανότητας της ΑΤΧ σε συνθήκες πειραματικής συστεμικής φλεγμονής, μελετήθηκε η φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναστολή της ΑΤΧ και όλων των υποδοχέων του LPA με χορήγηση του αναστολέα BrPLPA [1-bromo-3(S)-hydroxy-4-(palmitoyloxy) butyl-phosphonate] ²³³. Ο BrPLPA είναι ένα ανάλογο του LPA με διπλή λειτουργία ως αναστολέας της ΑΤΧ και ανταγωνιστής όλων των υποδοχέων του LPA. Σε ποντίκια φυσικού τύπου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά BrPLPA σε συγκέντρωση 10mg/kg ή νερό (ο διαλύτης του BrPLPA). Μισή ώρα αργότερα ακολούθησε η χορήγηση του LPS σε συγκέντρωση 20mg/kg και παρακολουθήθηκε η επιβίωση των ποντικών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.25, η φαρμακολογική αναστολή του άξονα ΑΤΧ/LPA προστατεύει από τη συστεμική φλεγμονή μειώνοντας τη θνησιμότητα, υποδεικνύοντας έτσι, έναν δυνητικά επιβλαβή ρόλο της ΑΤΧ και της σηματοδότησης μέσω LPA στη σήψη.



Εικόνα 4.25: Η φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ και όλων των υποδοχέων του LPA προστατεύει από τη συστεμική φλεγμονή λόγω LPS. Καμπύλη επιβίωσης ποντικών Wt έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 20 mg/kg LPS και 10 mg/kg BrPLPA. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 15-17, αθροιστικά από 2 πειράματα.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η φαρμακολογική αναστολή συγκεκριμένα της ΑΤΧ στην επαγόμενη από το LPS συστεμική φλεγμονή με τη χρήση του αναστολέα PF8380²⁹³, με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου έλαβαν μόνο vehicle, το διαλύτη του PF8380. Μισή ώρα μετά την πρώτη χορήγηση του PF8380 χορηγήθηκε το LPS (20 mg/kg), ενώ 12 ώρες μετά την αρχική δόση του αναστολέα, ακολούθησε δεύτερη χορήγηση του PF8380. Η χορήγηση της μεγάλης συγκέντρωσης του PF8380 (120 mg/kg) είχε εν μέρει προστατευτική δράση στη συστεμική φλεγμονή, μιας και παρέτεινε τη ζωή των ποντικών για λίγο, συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου, όπως υποδεικνύεται από τη στατιστική ανάλυση (Εικόνα 4.26).



Εικόνα 4.26: Η φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ παρατείνει την επιβίωση των ποντικών στη συστεμική φλεγμονή λόγω LPS. Καμπύλη επιβίωσης ποντικών Wt έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 20 mg/kg LPS και 120 mg/kg PF8380. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 6-11, αθροιστικά από 2 πειράματα.

Τέλος, για τη διερεύνηση της εμπλοκής της μεταγωγής σήματος συγκεκριμένα μέσω του υποδοχέα LPA₁ στη συστεμική φλεγμονή, χορηγήθηκε από το στόμα ο ανταγωνιστής του υποδοχέα LPA₁ Amira σε ποντίκια φυσικού τύπου, σε δύο συγκεντρώσεις. Μισή ώρα μετά την πρώτη χορήγηση, χορηγήθηκε το LPS (20 mg/kg), ενώ 12 ώρες μετά την αρχική δόση του αναστολέα, ακολούθησε δεύτερη χορήγησή του (Εικόνα 4.27). Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του υποδοχέα LPA₁ δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των ποντικών σε συνθήκες πειραματικής συστεμικής φλεγμονής, γεγονός που συμφωνεί με τα γενετικά δεδομένα (Εικόνα 4.23).



Εικόνα 4.27: Η φαρμακολογική αναστολή του υποδοχέα LPA₁ δε διαδραματίζει ρόλο στην πειραματική συστεμική φλεγμονή. Καμπύλη επιβίωσης ποντικών Wt έπειτα από την IP χορήγηση 20 mg/kg LPS και την PO χορήγηση 100 και 200 mg/kg του ανταγωνιστή του υποδοχέα LPA₁ Amira. Αριθμός εξετασθέντων ποντικών 7 σε κάθε ομάδα.

4.Β.2. ΑΤΧ και συστεμική φλεμονή στον άνθρωπο

4.B.2.1. Μεταβολή των επιπέδων της δραστικότητας της ΑΤΧ στην κυκλοφορία σηπτικών ασθενών

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα που παρουσιάστηκαν, διαφάνηκε μία πιθανή εμπλοκή της ATX στη συστεμική φλεγμονή που προκαλείται από το LPS στο ποντίκι. Προκειμένου να ελεγχθεί ο πιθανός ρόλος της ATX στη σήψη στον άνθρωπο, προσδιορίστηκε η δραστικότητα της ATX σε ανθρώπινα δείγματα πλάσματος και ορού ασθενών με σήψη, σηπτικό σοκ, κατά την είσοδο κι έξοδό τους από το νοσοκομείο (Εικόνα 4.28). Παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας της ATX στο πλάσμα (Εικόνα 4.28A) και τον ορό των ασθενών (Εικόνα 4.28B) που υπέστησαν σηπτικό σοκ. Η παρατηρούμενη αύξηση της ATX στους ασθενείς με σηπτικό σοκ ήταν ανεξάρτητη από το εάν οι ασθενείς τελικά έζησαν ή απεβίωσαν (Εικόνα 4.28C), γεγονός που υποδηλώνει ότι η δραστικότητα της ATX στην κυκλοφορία των σηπτικών ασθενών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης για τη σήψη.



Εικόνα 4.28: Αύξηση της δραστικότητας της ΑΤΧ σε ασθενείς με σηπτικό σοκ. Επίπεδα δραστικότητας της ΑΤΧ σε πλάσμα και ορό ασθενών σε διαφορετικά στάδια της σήψης, κατά την είσοδο κι έξοδο των ασθενών από το νοσοκομείο, όπως προσδιορίστηκε με την τεχνική TOOS.

4.Β.2.2. Λιπιδωμική ανάλυση στην κυκλοφορία σηπτικών ασθενών

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λιπιδωμική ανάλυση στο πλάσμα σηπτικών ασθενών με την τεχνική UPLC/MS/MS όπως περιγράφτηκε στην Ενότητα 3.21. Τα λιπίδια που προσδιορίστηκαν ήταν λιπαρά οξέα, γλυκερολιπίδια (τριγλυκερίδια, διακυλογλυκερόλες, μονοακυλογλυκερόλες), γλυκεροφωσφολιπίδια (φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, λυσοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, λυσοφωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλογλυκερόλη, λυσοφωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλοχολίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδικό οξύ, λυσοφωσφατιδικό οξύ), σφιγγολιπίδια (σφιγγομυελίνη, σφιγγοσυλ-φωσφορυλ-χολίνη, 1-φωσφορική σφιγγοσίνη) κι εστέρες γλυκερόλης.

Όπως εμφανίζεται στην Εικόνα 4.29, η στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των λιπιδίων τριγλυκερίδια, διακυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλογλυκερόλη και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη στο πλάσμα σηπτικών ασθενών, ανεξάρτητα από το στάδιο της σήψης, σε σύγκριση με τα επίπεδα λιπιδίων στην κυκλοφορία μη σηπτικών ασθενών, επιτρέπει το διαχωρισμό των σηπτικών από τους μη σηπτικούς ασθενείς. Η στατιστικά σημαντική διαφορά στην αύξηση των παραπάνω λιπιδίων στους σηπτικούς ασθενείς ήταν εμφανής τόσο στην περίπτωση μελέτης μόνο ασθενών που έλαβαν το αναισθητικό προποφόλη (propofol), όσο και στην περίπτωση που μελετήθηκαν όλοι οι ασθενείς. Αύξηση των επιπέδων στην κυκλοφορία σηπτικών ασθενών παρατηρήθηκε και για τα λιπίδια φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, φωσφατιδυλοσερίνη 38:4, σφιγγομυελίνη και κεραμίδιο 40:0 (Εικόνα 4.30), χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να επιτρέπουν το διαχωρισμό των ασθενών σε σηπτικούς και μη σηπτικούς.



Εικόνα 4.29: Λιπίδια στην κυκλοφορία που διαχωρίζουν σηπτικούς από μη σηπτικούς ασθενείς, όπως προσδιορίστηκαν με την τεχνική UPLC/MS/MS. Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε στη δοκιμή Mann-Whitney συγκρίνοντας τη μέση τιμή των δύο ομάδων. Τέλος, στο θερμικό χάρτη της Εικόνας 4.31 παρουσιάζεται η αύξηση στα επίπεδα των προσδιορισθέντων λιπιδίων στο πλάσμα σηπτικών ασθενών που απεβίωσαν συγκριτικά με τους σηπτικούς ασθενείς που επέζησαν, επιτρέποντας το διαχωρισμό τους.



Εικόνα 4.30: Αύξηση των λιπιδίων στο πλάσμα των σηπτικών ασθενών σε σύγκριση με τους μη σηπτικούς ασθενείς, χωρίς ωστόσο αυτή να επιτρέπει το διαχωρισμό των σηπτικών από τους μη σηπτικούς ασθενείς.



Εικόνα 4.31: Διαχωρισμός σηπτικών ασθενών που επέζησαν από σηπτικούς ασθενείς που απεβίωσαν βάσει του προσδιορισμού των επιπέδων των λιπιδίων στην κυκλοφορία.

5. Συζήτηση

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, η έκφραση της ΑΤΧ είναι απαραίτητη στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθώς το έμβρυο ποντικού στο οποίο η ΑΤΧ είναι γενετικά απενεργοποιημένη δε γεννιέται και πεθαίνει την εμβρυική ημέρα 9.5. Στην ενήλικη ζωή η ΑΤΧ παρουσιάζει ευρεία έκφραση σε όλους τους ιστούς και είναι αυξημένη σε αρκετές χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές και στον καρκίνο^{22,263}. Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας, σε ζωικά μοντέλα ρευματοειδούς αρθρίτιδας, πνευμονικής ίνωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, η υπό όρους στοχευμένη αποκοπή της ΑΤΧ καθυστέρησε την ανάπτυξη των νόσων^{54,70,220}. Αντιθέτως, η διαγονιδιακή υπερέκφραση της ΑΤΧ στο μαστό είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ανάπτυξη spontaneous καρκίνου σε ηλικιωμένα ποντίκια, στα οποία είχε συνήθως προηγηθεί χρόνια φλεγμονή¹⁹⁵.

Η υπερέκφραση της ΑΤΧ σε ιστούς με χρόνια φλεγμονή ή νεοπλασία, η οποία πιθανώς εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω πρόσδεσής της στις ιντεγκρίνες⁴¹, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του LPA τοπικά, το οποίο με τη σειρά του επάγει τις παθολογικές αποκρίσεις του στο μικροπεριβάλλον του ιστού ⁵³. Κατά συνέπεια, η ΑΤΧ μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός φαρμακευτικός στόχος στη χρόνια φλεγμονή και τον καρκίνο. Για να ελεγχθεί η καταλληλότητα της ΑΤΧ ως θεραπευτικού στόχου έπρεπε να απαντηθεί το ερώτημα εάν η θεραπευτική στόχευση της ΑΤΧ στο ενήλικο ποντίκι επιφέρει κάποια τοξικότητα στον οργανισμό. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η γενετική αποκοπή της ΑΤΧ χρησιμοποιώντας το επαγόμενο από το Tmx γενετικό σύστημα R26Cre-ER^{τ2} που βασίζεται στην τεχνολογία της Cre ανασυνδυάσης.

Αρχικά, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας και της ιστοειδικής έκφρασης της Cre ανασυνδυάσης έπειτα από επαγωγή από το Tmx, διασταυρώθηκε το διαγονιδιακό ποντίκι R26Cre-ER^{T2} με το διαγονιδιακό ποντίκι αναφοράς Rosa26/*lacZ* (R26R). Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tmx στο ποντίκι R26Cre-ER^{T2}/R26R έδειξε εκτενή, ευρεία κι αποτελεσματική ενεργοποίηση της Cre σε διαφορετικό βαθμό στον κάθε ιστό (Εικόνα 4.2), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ήδη υπάρχουσες παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών ^{411,412,416}. Η έκφραση της Cre στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/R26R μόνο παρουσία Tmx και αντίστοιχα, η μη ενεργοποίησή της στα R26R ποντίκια που δε φέρουν το R26Cre-ER^{T2} αλλήλιο υποδεικνύει την αυστηρή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μόνο στο λεπτό έντερο των R26Cre-ER^{T2}/R26R ποντικών που έλαβαν αραβοσιτέλαιο παρατηρήθηκε σε μικρό βαθμό τοπικά ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης (Εικόνα 4.2), ήτοι σε ένα μόνο από τα δώδεκα εξετασθέντα όργανα.

Στην επαγόμενη από το Tmx εκτομή του γονιδίου *Enpp2*, ο έλεγχος της έκφρασης της Cre ανασυνδυάσης με PCR έδειξε Cre-διαμεσολαβούμενο ανασυνδυασμό και στα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} που έλαβαν αραβοσιτέλαιο και όχι Tmx (Πίνακας 4.1), αλλά

είχαν στεγαστεί στο ίδιο κλουβί με εκείνα που έλαβαν Tmx. Μιας και η PCR ανασυνδυασμού δεν αποτελεί μέθοδο ποσοτικής ανάλυσης αλλά ποιοτικής, η μικρού βαθμού ενεργοποίηση της Cre ανασυνδυάσης στο λεπτό έντερο του ποντικού αναφοράς R26Cre-ER^{T2}/R26R έπειτα από λήψη αραβοσιτέλαιου (Εικόνα 4.2) υποδεικνύει κάποιου είδους «διαρροή» του επαγόμενου συστήματος του cre ανασυνδυασμού (leaky recombination) απουσία Tmx. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως διασταυρούμενη επιμόλυνση ανάμεσα στα ποντίκια που δεν έλαβαν Tmx και σε εκείνα που έλαβαν. Πρώτον, το Tmx ως ελαιοδιαλυτή ουσία μπορεί να προσληφθεί εύκολα από το δέρμα και δεύτερον, με τη νεφρική ή γαστρική απέκκρισή του μπορεί να επιμολύνει τα ζώα που έλαβαν αραβοσιτέλαιο, μιας κι έχει αναφερθεί κοπροφαγική συμπεριφορά των ποντικών ⁴¹⁷. Το πρόβλημα της διασταυρούμενης επιμόλυνσης επιλύθηκε με τη στέγαση των ποντικών σε διαφορετικά κλουβιά (Πίνακας 4.1).

Ένα άλλο σημείο που αξίζει να τονιστεί είναι ότι ο επαγόμενος από το Tmx Creδιαμεσολαβούμενος ανασυνδυασμός ήταν επιτυχής ακόμη και όταν τα ποντίκια θυσιάστηκαν 30 μέρες μετά το πέρας της χορήγησης του Tmx, γεγονός που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, μιας και είναι γνωστό ότι το Tmx διατηρείται στον οργανισμό και είναι ικανό για επαγωγή της CreER ανασυνδυάσης μέχρι και 4 εβδομάδες μετά το τέλος της αγωγής με Tmx ⁴¹⁸.

Η ιστοπαθολογική εξέταση των 44 οργάνων από τα ποντίκια τόσο της πειραματικής ομάδας όσο και των ομάδων ελέγχου, που θυσιάστηκαν 2 ημέρες μετά το πέρας της ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης του Tmx στο μοντέλο των 100 mg/kg ποντικού την ημέρα για 10 ημέρες, δηλαδή στην αρχή της παρατηρούμενης θνησιμότητας των ποντικών R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} (Εικόνα 4.4B), έδειξε πρόβλημα μόνο στο έντερο και τον πνεύμονα των ποντικών στα οποία χορηγήθηκε Tmx (Εικόνα 4.5, Πίνακας 4.2). Όλα τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε Tmx (Εικόνα 4.5, Πίνακας 4.2). Όλα τα ποντίκια στα οποία στην ομάδα στην οποία ανήκαν (πειραματική ή ελέγχου), που σημαίνει ότι οι παρατηρηθείσες αλλαγές δε σχετίζονται με τη γενετική αποκοπή της ATX. Επίσης, το γεγονός ότι στα ποντίκια που έλαβαν αραβοσιτέλαιο δεν παρουσιάστηκαν ιστοπαθολογικές αλλαγές, υποδεικνύει ότι η παρατηρηθείσα φλεγμονή οφείλεται στη χορήγηση του Tmx.

Ένα επιπλέον στοιχείο που συνηγορεί υπέρ του ότι τα παθολογικά ευρήματα που βρέθηκαν στους ιστούς των ποντικών έπειτα από λήψη Tmx, όταν τα ζώα θυσιάστηκαν τη δεύτερη ημέρα μετά το πέρας της αγωγής με Tmx, οφείλονταν στην τοξικότητα λόγω του Tmx και όχι στη γενετική αποκοπή της ATX, είναι ότι όταν οι ιστοί των ζώων λήφθησαν 20 ημέρες από το τέλος της χορήγησης Tmx, δεν υπήρχαν ιστοπαθολογικές αλλαγές (Εικόνα 4.6). Πράγματι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένα μήνα μετά τη χορήγηση του Tmx ελαττώθηκαν τα φαινόμενα τοξικότητας λόγω Tmx σε ποντίκια R26Cre-ER^{T2} *in vivo*, πιθανώς λόγω πολλαπλασιασμού των κυττάρων που επιβιώνουν ³⁹⁵.

Η τοξικότητα από το Tmx εξαρτάται από τη δοσολογία της χορήγησης ³⁹⁵. Για να μειωθεί η επαγόμενη από το Tmx τοξικότητα στα ποντίκια, τα πειράματα για τη γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ πραγματοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tmx για 5 ημέρες αντί για 10. Ο έλεγχος των ιστών των ζώων 10 και 20 ημέρες από το τέλος της χορήγησης του Tmx δεν έδειξε παθολογικές αλλαγές (Εικόνα 4.7). Ένα πολύ μικρό ποσοστό των ποντικών R26Cre-ER^{T2} που έλαβαν Tmx απεβίωσαν (Εικόνα 4.4C). Με τη χορήγηση του Tmx απευθείας από του στόματος στο στομάχι, παρατηρήθηκαν ίδια ποσοστά θνησιμότητας των R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} ποντικών στα οποία δόθηκε Tmx σε σχέση με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου R26Cre-ER^{T2} που έλαβαν επίσης Tmx και στα οποία δεν απαλείφθηκε η ATX (Εικόνα 4.4D), γεγονός που υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη θνησιμότητα δεν οφείλεται στη γενετική απενεργοποίηση της ΑΤΧ, προτείνοντας ότι το μεγαλύτερο μέρος της δραστικότητας της ΑΤΧ δεν είναι απαραίτητο στο ενήλικο ποντίκι. Επίσης, υποδεικνύει ότι η θνησιμότητα δεν οφείλεται μόνο στο Tmx, αλλά στη συνδυαστική τοξικότητα λόγω Tmx και Cre ⁴¹⁹. Η Cre μπορεί να είναι τοξική για τα κύτταρα, όταν επιτίθεται στο γενωμικό DNA τους, μιας και το γονιδίωμα των θηλαστικών περιέχει κρυφές (cryptic) ή ψευδο-loxP-θέσεις, οι οποίες αποτελούν θέσεις αναγνώρισης από την Cre⁴¹⁹. Η άποψη ότι η τοξικότητα δεν οφείλεται μόνο στο Tmx ενισχύεται από το γεγονός ότι τα ποντίκια της έτερης ομάδας ελέγχου, *Επρρ2^{n/n}*, που έλαβαν Tmx δεν απεβίωσαν. Άλλωστε, δεν πρέπει να παραβλέπεται ότι το Tmx, ως ένας κλινικά χρησιμοποιούμενος θεραπευτικός παράγοντας 420, μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση 421.

Η επαγόμενη από το Tmx τοξικότητα που παρατηρείται στα R26Cre-ER^{T2} ποντίκια έχει αναφερθεί προηγουμένως ^{395,419}. Για αυτό, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η χρήση των ποντικών της ομάδας ελέγχου που φέρουν το R26Cre-ER^{T2} διαγονιδιακό αλλήλιο χωρίς το *Enpp2^{n/n}* για την αποφυγή παρερμήνευσης των αποτελεσμάτων. Γενικά, η χρήση των σωστών ποντικών ελέγχου επιβάλλεται σε πειράματα με το Tmx, για την ορθή διάκριση ανάμεσα στα αποτελέσματα λόγω απενεργοποίησης ενός γονιδίου (gene knockout) ή λόγω της χορήγησης του Tmx ⁴²¹. Η τοξικότητα λόγω Tmx και Cre που σχετίζεται με τη συστεμική ενεργοποίηση και την καθολική έκφραση της Cre-ER^{T2} έχει συσχετισθεί με αιματολογικές ανωμαλίες, αναστολή της ανάπτυξης, μειωμένο πολλαπλασιασμό, απόπτωση και ανεπιθύμητη χρωμοσωμική αναδιάταξη στα αιμοποιητικά κύτταρα ³⁹⁵.

Οι παρατηρηθείσες φλεγμονώδεις αλλαγές στο έντερο των ποντικών που έλαβαν Tmx και θυσιάστηκαν 2 ημέρες μετά το πέρας της χορήγησης του Tmx (Εικόνα 4.5), μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου πολλαπλασιάζονται ταχέως –όπως και τα αιμοποιητικά– και όπως είναι γνωστό, τα κύτταρα με γρήγορο ρυθμό πολλαπλασιασμού είναι πιο ευαίσθητα στην τοξικότητα της συστεμικής ενεργοποίησης της Cre ανασυνδυάσης. Αυτό συμβαίνει διότι το γονιδίωμα των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων είναι πιο εύκολα προσβάσιμο στην Cre συγκριτικά με το σφικτά «πακεταρισμένο» γονιδίωμα των κυττάρων που ηρεμούν. Έχει παρατηρηθεί εντερικό οίδημα σε ποντίκια R26CreER^{T2} μετά τη χορήγηση Tmx ³⁹⁵.

Το γεγονός ότι από τη βιοχημική κι αιματολογική ανάλυση των R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} ποντικών με γενετικά αποκομμένη ATX και των ομάδων ελέγχου, δεν προέκυψαν διαφορές ενδεικτικές ηπατικής, νεφρικής ή παγκρεατικής βλάβης (Εικόνα 4.10), αλλά ούτε και διαφορά στους κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος (Εικόνα 4.11), υποδεικνύει ότι η απαλοιφή της ATX δεν επηρεάζει την ομοιόσταση των ιστών και το αιμοποιητικό σύστημα.

Η ΑΤΧ ως γνωστό, εκφράζεται σε όλους τους ιστούς στο ενήλικο ποντίκι, με μεγαλύτερη έκφραση σε εγκέφαλο, ωοθήκες, πλακούντα, όρχεις, έντερο, πνεύμονα και νεφρό ^{31,36}, ενώ εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα ^{31,37,53}. Η γενετική αποκοπή της ΑΤΧ συγκεκριμένα από το λιπώδη ιστό είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένα επίπεδα LPA στον ορό, της τάξης του 38% ¹⁹, που υποδεικνύει ότι ο λιπώδης ιστός συνεισφέρει σημαντικά στην ΑΤΧ της κυκλοφορίας. Η ανάλυση της έκφρασης της ΑΤΧ σε μεταγραφικό επίπεδο στην παρούσα διατριβή επιβεβαίωσε τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης της ΑΤΧ σε ποντίκια Wt σε εγκέφαλο, λευκό και καφέ λιπώδη ιστό (WAT, BAT) και όρχεις (Εικόνα 4.12), δεδομένα που συμφωνούν γενικά με τη βιβλιογραφία και τις ηλεκτρονικές βάσεις (http://biogps.org/#goto=genereport&id=18606,

http://www.gtexportal.org/home/gene/ENPP2).

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα της δραστικότητας της ΑΤΧ στα ποντίκια της ομάδας ελέγχου *Enpp2*^{n/n}, τα οποία, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 4.1.3, φέρουν την κασέτα επιλογής της νεομυκίνης και έχουν 3 *loxP* θέσεις εκατέρωθεν της κασέτας της νεομυκίνης και των εξονίων 1 και 2 του γονιδίου *Enpp2*, ήταν αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα της ομάδας R26CreER^{T2} τα οποία είναι Wt για την ATX (Εικόνα 4.13D). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο υπομορφικό αλλήλιο του ATX^{neo} γονιδίου (hypomorhic allele), το οποίο εμφανίζει ισοδύναμη λειτουργικότητα με το Wt αλλήλιο, αλλά χαμηλότερα σημαντική η χρήση όλων των ομάδων ποντικών ελέγχου.

Η γενετική απενεργοποίηση ενός ενζύμου δεν αρκεί να επιβεβαιωθεί μόνο με τον προσδιορισμό των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου, διότι έτσι δε λαμβάνεται υπόψη η πολυπλοκότητα της *in vivo* κατάστασης του οργανισμού, η φυσιολογία του, οι μηχανισμοί μετα-μεταγραφικής και μετα-μεταφραστικής ρύθμισης. Μπορεί να παρατηρηθεί διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα των mRNA μεταγράφων ενός γονιδίου και τα επίπεδα του ενζύμου που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό ή της δραστικότητάς του, καθώς και του προϊόντος του. Η γονιδιακή έκφραση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως από το ρυθμό έναρξης της μεταγραφής, τη σταθερότητα της μετάφρασης, το ενδεχόμενο «μπλοκάρισμα» της

περιοχής πρόσδεσης του ριβοσώματος, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τη σταθερότητα της πρωτεΐνης ⁴²³. Έτσι, στην παρούσα διατριβή, πέρα από τη μεταγραφική ανάλυση, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα δραστικότητας της ΑΤΧ, η συγκέντρωσή της, η έκφρασή της στην κυκλοφορία, καθώς και τα επίπεδα του προϊόντος αλλά και των υποστρωμάτων της ΑΤΧ. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως όλες οι μετρήσεις του LPA έγιναν στο πλάσμα των ποντικών διότι ο ορός περιέχει φωσφολιπίδια και αλβουμίνη, τα οποία μειώνουν τη δραστικότητα του LPC, το οποίο προσδένεται στην αλβουμίνη ²².

Όσον αφορά στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ΑΤΧ στο πλάσμα των ποντικών με γενετικά αποκομμένο *Enpp2* σε σχέση με τα ποντίκια R26Cre-ER^{T2}, η μείωση στα επίπεδα του ενζύμου δεν ήταν τόσο μεγάλη της τάξης του 80% όπως παρατηρήθηκε στον προσδιορισμό της δραστικότητας της ΑΤΧ ή της έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο. Αυτή η διαφορά στα αποτελέσματα της Elisa μπορεί να αποδοθεί στην τεχνική, είτε σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η τυχαία παραλλαγή ή σε εσωτερικούς παράγοντες, όπως είναι η συγγένεια του αντισώματος ή η συχνότητα των επιτόπων ⁴²⁴.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η μείωση κατά 50% στα επίπεδα ATX και LPA στο πλάσμα σε διαγονιδιακά ετερόζυγα complete knockout για την ATX ποντίκια (ATX KO) δεν είχε ως αποτέλεσμα κάποιον εμφανή φαινότυπο ⁹⁻¹¹. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επεκτείνουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις, αποδεικνύοντας ότι ακόμη μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της ATX και του LPA στο ενήλικο ποντίκι, της τάξης του 80%, δεν επέφερε κάποια επίπτωση στην ιστοπαθολογία των οργάνων ή στη συνολική επιβίωση των ποντικών και κατά συνέπεια στην ενήλικη φυσιολογία.

Η αφθονία στη σηματοδότηση μέσω LPA και των υποδοχέων του καταδεικνύει τη σημασία του λιπιδιακού αυτού μεσολαβητή στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία ¹⁷¹. Αναφορικά με τη μεγάλη μείωση της ATX στον οργανισμό, η επερχόμενη μείωση των επιπέδων του LPA μπορεί να αντισταθμίζεται από την παραγωγή μικρών ποσοτήτων LPA από άλλα ένζυμα, όπως είναι η PLA1 ή η PLA2. Η παραγωγή αυτή του LPA μπορεί να είναι επαρκής για τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, χωρίς ωστόσο να είναι ικανή να επιφέρει κάποιο παθολογικό αποτέλεσμα ^{425,426}. Έτσι λοιπόν, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι τα εναπομείναντα επίπεδα του LPA επαρκούν για τη διατήρηση των λειτουργιών του σώματος, παρόλο που έχει αναφερθεί ότι το κατώφλι της συγκέντρωσης του LPA για την πρόκληση οποιουδήποτε αποτελέσματος σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο *in vitro* είναι πολύ υψηλό, 1μΜ έως και 10 μΜ ⁵³.

Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες δράσεις του LPA *in vitro* που έχουν αναφερθεί, παρατηρήθηκαν σε μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις αυξημένης συγκέντρωσης LPA τοπικά, σε φλεγμονώδεις περιοχές ή με κακοήθεια, πιθανώς ως απόρροια αυξημένης έκφρασης της ATX. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η κυτταρική δράση του LPA εξαρτάται όχι μόνο από την τοπική

συγκέντρωσή του, η οποία ρυθμίζεται από τα επίπεδα και τη δράση της ATX και των LPPs, αλλά και από την τοπική κυτταροειδική αφθονία των υποδοχέων του LPA και της ενεργοποίησής τους από άλλους παράγοντες ¹⁴⁹ ή τις τοπικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το LPA και ρυθμίζουν τις βιολογικές του δράσεις ¹⁰¹. Το LPA ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, μπορεί να επάγει τη δράση του εκτός από την πρόσδεσή του στους υποδοχείς του LPA και μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού υποδοχέα PPARγ ¹⁴⁷ ή μέσω τροποποίησης μακρομοριακών σηματοδοτικών συμπλόκων με πρόσδεση σε πρωτεΐνες ή αναπροσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού (metabolic rewiring) ⁴²⁷. Κατά συνέπεια, τα τοπικά επίπεδα του βιολογικά δραστικού LPA και η επακόλουθη βιολογική του δράση ρυθμίζονται από μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση των υποδοχέων του LPA, της ATX, των ελεύθερων υποστρωμάτων λυσοφωσφολιπιδίων, των φωσφατασών λιπιδίων, των πρωτεϊνών που προσδένονται στο LPA ¹⁶, του πυρηνικού υποδοχέα PPARγ, υποδεικνύοντας την αυστηρή ρύθμιση στην οποία υπόκειται ο μεταβολισμός του LPA ¹²³.

Για την επιβεβαίωση της καταλληλότητας της ΑΤΧ ως θεραπευτικού στόχου, πέρα από τη γενετική αποκοπή του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε και φαρμακολογική αναστολή με τη χρήση του αναστολέα της ΑΤΧ ΡF8380. Σε προηγούμενη μελέτη είχε δειχθεί ότι η χορήγηση PF8380 σε συγκέντρωση 30 mg/kg περιόρισε τη φλεγμονώδη υπεραλγησία σε ένα μοντέλο φυσαλίδας (air pouch) σε αρουραίο, μειώνοντας πάνω από 95% τα επίπεδα τόσο του τοπικού LPA στο σημείο της φλεγμονής, όσο και του LPA στο πλάσμα εντός 3 ωρών ²⁹³. Στην παρούσα εργασία, η χορήγηση του PF8380 σε συγκέντρωση 120 mg/kg για 3 εβδομάδες, μείωσε τα επίπεδα της ΑΤΧ και του LPA στην κυκλοφορία πάνω από 90% (Εικόνα 4.16), και δεν επέφερε κάποια παθολογική αλλαγή στα 13 εξετασθέντα όργανα όπως προέκυψε από την ιστολογική ανάλυση (Εικόνα 4.17), αποδεικνύοντας ότι η περίσσεια της ΑΤΧ δεν είναι απαραίτητη στην ενήλικη ζωή και άρα, η ΑΤΧ αποτελεί έναν ασφαλή θεραπευτικό στόχο. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν προκύψει από τη χορήγηση του αναστολέα της ΑΤΧ ΟΝΟ-8430506, ο οποίος παρουσίασε IC50 6.4–19 nM ⁴²⁸, για 4 έως 21 ημέρες σε συγκέντρωση 10 ή 100 mg/kg, όπου επίσης δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα ή απώλεια βάρους στα ποντίκια ²⁶⁸.

Λαμβάνοντας υπόψη την εκτενή και σταθερή μείωση των επιπέδων LPA από την επαγόμενη γενετική εξάλειψη της ATX και τη φαρμακοκινητική (PK) και φαρμακοδυναμική (PD) ανάλυση των ισχυρών αναστολέων της ATX που υπάρχουν, θεωρείται απίθανη η διατήρηση των μειωμένων επιπέδων του LPA για 24 ώρες με συνδυασμό της γενετικής και φαρμακολογικής αναστολής. Παρόλα αυτά, ακόμη και αυτή η υποθετική σταθερή αναστολή της ATX κατά 100%, θα αποδείκνυε ότι το σύνολο της έκφρασης και της δραστικότητας της ATX, σε σχέση με το 80% που αποδεικνύει η παρούσα εργασία, δεν είναι απαραίτητη στην ενήλικη φυσιολογία και θα έδειχνε ότι στη διατήρηση των επιπέδων του LPA της

κυκλοφορίας συνεισφέρουν εναλλακτικά συνθετικά μονοπάτια, πιθανώς μέσω των ενζύμων τύπου φωσφολιπάσης A (PLA1, PLA2)¹⁷.

Λόγω του σημαντικού ρόλου της ΑΤΧ στη χρόνια φλεγμονή και τον καρκίνο ⁹⁰, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός αναστολέων της ΑΤΧ ^{53,281,284}, ενώ ορισμένοι από αυτούς παρουσίασαν θετικά θεραπευτικά αποτελέσματα σε air pouch φλεγμονή ²⁹³, ρευματοειδή αρθρίτιδα ²³³, πνευμονική φλεγμονή και ίνωση λόγω μπλεομυκίνης ^{54,297}, αλλεργικό άσθμα ²⁴⁷, μετάσταση μελανώματος και καρκίνου του μαστού ^{265,318,48,267,429}. Επιπλέον, η αναστολή της ΑΤΧ έχει προταθεί ως βοηθητική θεραπεία ενάντια στον καρκίνο, λόγω του προτεινόμενου ρόλου της στη χημειοθεραπεία και την αντίσταση στην ακτινοβολία ^{301,302}.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η θετική δράση της αναστολής της ΑΤΧ στις περισσότερες φαρμακολογικές μελέτες δε συσχετιζόταν πάντοτε με το φαρμακοκινητικό/ φαρμακοδυναμικό προφίλ του αναστολέα, στις περιπτώσεις που αυτό ήταν διαθέσιμο, ενώ δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του LPA πάνω από 80% για περισσότερες από 3 ώρες. Παρόλο που η διεισδυτική ικανότητα του αναστολέα στον ιστό, η διατήρησή του στον ιστό και τα τοπικά επίπεδα του LPA στον ιστό μετά τη θεραπεία δεν είναι γνωστά, είναι ασφαλές να συμπεράνουμε ότι ακόμη και ο πιο ισχυρός αναστολέας δεν είναι δυνατόν να διατηρήσει σταθερά τα ελαττωμένα κατά πάνω από 80% επίπεδα του LPA για 24 ώρες.

Από την άλλη, η παρούσα εργασία αποδεικνύει ότι η σταθερή μείωση του LPA κατά 80% στην κυκλοφορία είναι καλά ανεκτή από τον οργανισμό. Κατά συνέπεια, η αναστολή της ATX μπορεί να επάγει τις ευεργετικές της δράσεις πιθανώς με μείωση των αυξημένων επιπέδων και της αυξημένης δραστικότητας της ATX τοπικά στα σημεία της φλεγμονής και κακοήθειας, χωρίς ωστόσο να προκαλεί τοξικές παρενέργειες στην κυκλοφορία. Πάντως, σε κάθε περίπτωση κρίνεται αναγκαία η μελέτη διαφορετικών ειδών LPA προκειμένου να γίνει κατανοητός ο τρόπος που το LPA δρα *in vivo* ¹²³.

Αναφορικά με τα πειράματα της επαγόμενης από το LPS συστεμικής φλεγμονής σε ποντίκια, η παρατηρηθείσα αύξηση της ATX στο πλάσμα 2 μόλις ώρες μετά τη χορήγηση του LPS και η σταδιακή μείωσή της από τις 4 ώρες έως τα επόμενα χρονικά σημεία που ελέγχθηκαν (8, 16, 21 ώρες), ενδεχομένως υποδεικνύει ένα ρόλο της ATX στην έναρξη της συστεμικής φλεγμονής (Εικ. 4.18, 4.19). Η μείωση των επιπέδων της ATX και της δραστικότητάς της στις 21 ώρες μετά την πρόκληση πειραματικής σήψης συμφωνεί με τη μελέτη των Ahn et al. (2017), οι οποίοι παρατήρησαν μείωση της ATX στο πλάσμα ποντικών 24 ώρες μετά το μοντέλο σήψης CLP ⁴³⁰. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη εργασία βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα LPA στο πλάσμα, γεγονός που δε συνάδει με την παρατηρηθείσα μείωση της ATX και της sPLA₂, των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων του LPA, στην κυκλοφορία. Παρόλα αυτά, βρήκαν αυξημένη δραστικότητα της ATX στο ήπαρ, στην οποία απέδωσαν την αύξηση του LPA στο πλάσμα προτείνοντας ότι η μείωση της δραστικότητας της ATX στην κυκλοφορία είναι αποτέλεσμα αναστολής από το προϊόν ⁴³⁰.

Τα κατά 50% συστηματικά ελαττωμένα επίπεδα της ΑΤΧ στην κυκλοφορία των ποντικών προσέφεραν μειωμένη θνησιμότητα σε συνθήκες συστεμικής φλεγμονής σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου αδέλφια τους, παρέχοντας προστασία έναντι στη σήψη (Εικόνα 4.20). Το αποτέλεσμα αυτό επεκτάθηκε από τη μεγαλύτερη % επιβίωση που παρατηρήθηκε στα ποντίκια με 80% ελαττωμένη ΑΤΧ στην κυκλοφορία σε σχέση με τα φυσικού τύπου αδέλφια τους (Εικόνα 4.21). Οι παρατηρήσεις αυτές ενδεχομένως υποδεικνύουν έναν επιβλαβή ρόλο της ΑΤΧ στη συστεμική φλεγμονή. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε, τουλάχιστον εν μέρει, να εξηγηθεί και να συμβαδίσει με την παρατήρηση ότι σε σηπτικά μοντέλα ποντικών το LPC είχε προστατευτική δράση ενάντια στη σήψη με διάφορους μηχανισμούς ^{389 390}. Κατά συνέπεια, το ένζυμο που υδρολύει το LPC σε LPA μπορεί να έχει βλαβερή δράση στη σήψη.

Παρατηρώντας την Εικόνα 4.21, συμπεραίνεται ότι τα ποντίκια των ομάδων ελέγχου που είχαν λάβει μόνο αραβοσιτέλαιο, υπό την επίδραση του LPS, εμφάνισαν 100% θνησιμότητα, σε αντίθεση με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου που είχαν λάβει Tmx, τα οποία υπό συνθήκες συστεμικής φλεγμονής παρουσίασαν ένα ποσοστό επιβίωσης της τάξης του 25%. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την αντιμικροβιακή δράση του Tmx, το οποίο τροποποιεί την ανοσολογική απόκριση, ενισχύοντας την ανοσολογική λειτουργία των ουδετερόφιλων μέσω τροποποιήσης των ενδοκυττάριων κεραμιδίων ^{431 432}

Αν και, όπως τονίστηκε παραπάνω, τα μειωμένα επίπεδα της ΑΤΧ προστάτευσαν τα ποντίκια από τη θνησιμότητα λόγω LPS, τα χρόνια αυξημένα επίπεδα της ΑΤΧ στην κυκλοφορία στα Tga1t1*Enpp2* ποντίκια¹⁸⁹ δεν είχαν καμία επίδραση στη θνησιμότητα λόγω σήψης (Εικόνα 4.22), υποδεικνύοντας ότι η επιπλέον ΑΤΧ της κυκλοφορίας δε χειροτερεύει τη συστεμική φλεγμονή και ότι ενδεχομένως η τοπική έκφραση της ΑΤΧ είναι εκείνη που παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της συστεμικής φλεγμονής. Η παρατήρηση αυτή για το ρόλο των επιπλέον επιπέδων της ΑΤΧ της κυκλοφορίας συνάδει με προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας, οι οποίες έδειξαν ότι τα χρόνια αυξημένα συστεμικά επίπεδα της ΑΤΧ δεν παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα²²⁰ και η πνευμονική ίνωση ⁵⁴, ενώ έρχεται σε αντίθεση με την επίδραση της πλεονάζουσας ΑΤΧ στην οξεία φλεγμονή και το ALI ²⁴⁷. Από τα παραπάνω προτείνεται ένας διαφορετικός ρόλος της εμπλοκής του άξονα ΑΤΧ/LPA στη συστεμική φλεγμονή λόγω LPS από ότι στην οξεία πνευμονική βλάβη λόγω LPS.

Από τη διερεύνηση του ρόλου του άξονα σηματοδότησης ΑΤΧ/LPA στη συστεμική φλεγμονή με τη χορήγηση LPS σε διαγονιδιακά ομόζυγα knockout ποντίκια LPA₁-- και LPA₂---, φάνηκε ότι ο υποδοχέας LPA₂ δεν εμπλέκεται στην παθογένεση της συστεμικής φλεγμονής μιας και δεν είχε καμία επίδραση στη θνησιμότητα των ποντικών λόγω του LPS (Εικόνα 4.24). Όσον αφορά τον LPA₁, φάνηκε ότι ο υποδοχέας LPA₁ ενδεχομένως δε διαδραματίζει ρόλο στη συστεμική φλεγμονή μιας και η διαφορά στη βιωσιμότητα των ποντικών δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 4.23). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με το αποτέλεσμα από τη φαρμακολογική αναστολή συγκεκριμένα του υποδοχέα LPA₁, επιβεβαιώνοντας τη μη εμπλοκή του LPA₁ στην πειραματική συστεμική φλεγμονή. Τα παραπάνω οδηγούν στην υπόθεση ότι η μεταγωγή της σηματοδότησης μέσω του άξονα ATX/LPA στη συστεμική φλεγμονή μεσολαβείται από τους υπόλοιπους υποδοχείς του LPA

Η ταυτόχρονη φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ και όλων των υποδοχέων του LPA με τον αναστολέα-ανταγωνιστή BrPLPA in vivo (Εικόνα 4.25), υπέδειξε ότι προστατεύει τα ποντίκια από τη συστεμική φλεγμονή μειώνοντας τη θνησιμότητά τους, προτείνοντας έτσι, έναν δυνητικά επιβλαβή ρόλο της σηματοδότησης μέσω LPA στην πειραματική σήψη λόγω LPS, παρατήρηση που συνάδει με τον προστατευτικό ρόλο των μειωμένων επιπέδων της ATX κατά 50% και 80% στα ποντίκια Enpp2dflx/+ και R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n}, αντίστοιχα (Εικ. 4.20, 4.21). Η φαρμακευτική στόχευση μόνο της ΑΤΧ με τον αναστολέα PF8380 επέφερε μία εν μέρει προστατευτική δράση από τη σήψη λόγω LPS, μόνο στην πολύ μεγάλη συγκέντρωση του PF8380 (120 mg/kg) όταν αυτός χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά, μιας και παρέτεινε την επιβίωση των ποντικών για λίγο μέχρι να καταλήξουν, συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 4.26). Από τα παραπάνω δεδομένα της φαρμακολογικής αναστολής εικάζεται ότι ο υποδοχέας LPA1 δεν εμπλέκεται στην παθογένεση της συστεμικής φλεγμονής, γεγονός που συνάδει με τα γενετικά αποτελέσματα των LPA1-- ποντικών (Εικόνα 4.23). Το γεγονός ότι η αναστολή αποκλειστικά της ΑΤΧ δεν επέφερε τα ίδια θεαματικά αποτελέσματα με την ταυτόχρονη αναστολή της ATX και όλων των LPARs, αλλά απλά καθυστέρησε για λίγο το θάνατο των ποντικών και μόνο στην πολύ μεγάλη συγκέντρωση του PF8380, ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί στο LPA της κυκλοφορίας που παράγεται από άλλες οδούς, όπως για παράδειγμα από την sPLA₂ και είναι ανεξάρτητο από την ATX. Κατά συνέπεια, η συνδυαστική αναστολή της ΑΤΧ και το καθολικό μπλοκάρισμα όλων των υποδοχέων του LPA, προκειμένου να διακοπεί η μεταγωγή του σήματος μέσω LPA, μπορεί να προστατεύσει από τη συστεμική φλεγμονή.

Σε κάθε περίπτωση, το βιολογικό αποτέλεσμα της αύξησης της ΑΤΧ στην αρχή της συστεμικής φλεγμονής, η οποία συμβαδίζει με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και τον TNF, και της μείωσης της δραστικότητας της ΑΤΧ στην πορεία της συστεμικής φλεγμονής, εξαρτάται πάντοτε από την αφθονία και τη δραστικότητα των υποδοχέων του LPA στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που λαμβάνουν μέρος στα διάφορα στάδια εξέλιξης της συστεμικής φλεγμονής και τον προτεινόμενο ρόλο του LPA στη ρύθμιση της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης ⁴³⁴. Έτσι, η πλήρης κατανόηση της εμπλοκής του άξονα ATX/LPA στη συστεμική φλεγμονή θα απαιτήσει την ακριβή γνώση της χωροχρονικής ρύθμισης της έκφρασης της ATX και των υποδοχέων του LPA, καθώς και την κυτταροειδική δράση του LPA στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στη συστεμική φλεγμονή ²⁴⁷.

Η εμπλοκή του άξονα μεταγωγής σήματος ΑΤΧ/LPA στην πειραματική συστεμική φλεγμονή, οδήγησε στη μελέτη του πιθανού ρόλου του άξονα ΑΤΧ/LPA στην ανθρώπινη σήψη. Όσον αφορά στους σηπτικούς ασθενείς, η αύξηση της δραστικότητας της ΑΤΧ στο σηπτικό σοκ και η επερχόμενη μείωσή της κατά την έξοδο των ασθενών από το νοσοκομείο δείχνει την εμπλοκή της στην παθογένεση της σήψης και του σηπτικού σοκ. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί τουλάχιστον εν μέρει με τη μείωση των επιπέδων του LPC σε ασθενείς με σήψη και το συσχετισμό με τη θνησιμότητα των ασθενών ^{386,}. Η αύξηση της ΑΤΧ στους ασθενείς κατά το σηπτικό σοκ δε συμφωνεί με την παρατηρηθείσα αύξηση της ΑΤΧ μόνο στην έναρξη της σήψης στο ποντίκι, γεγονός που οφείλεται στις διαφορές ανάμεσα στην ανθρώπινη σήψη και τη σήψη στο ποντίκι ³²⁸, καθώς και στο ότι το μοντέλο πειραματικής συστεμικής φλεγμονής με LPS δεν μπορεί να αναπαραστήσει πλήρως την ανθρώπινη σήψης και στη σήψης ατο τοντική ετερογένεια που υπάρχει στους ανθρώπους και οι τυχόν συνυπάρχουσες ασθένεις, οι οποίες δεν μπορούν να αποδοθούν πλήρως με τα ζωικά πειραματικά μοντέλα σήψης ³²⁹.

Η στατιστικά σημαντική αύξηση των λιπιδίων τριγλυκερίδια, διακυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλογλυκερόλη και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη στην κυκλοφορία των σηπτικών ασθενών σε σχέση με τους μη σηπτικούς ασθενείς, όπως αυτή προέκυψε από τη λιπιδωμική ανάλυση των ασθενών, ενδεχομένως αναδεικνύει τη χρησιμότητα των λιπιδίων ως ένας πιθανός διαγνωστικός βιοδείκτης στη σήψη. Ο διαχωρισμός των επιπέδων των λιπιδίων στην κυκλοφορία σηπτικών ασθενών που επέζησαν από εκείνους που απεβίωσαν ενδεχομένως δείχνει τη χρησιμότητα των λιπιδίων ως ένας προγνωστικός δείκτης έκβασης της σήψης ως προς τη θνητότητα των σηπτικών ασθενών. Επειδή η λιπιδωμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μικρό αριθμό ασθενών, απαιτείται μελέτη και προσδιορισμός των λιπιδίων σε μεγαλύτερο αριθμό σηπτικών ασθενών.

Η διερεύνηση της σηματοδότησης του άξονα ATX/LPA στη συστεμική φλεγμονή με απώτερο στόχο την εξαγωγή χρήσιμων δεδομένων σχετικά με τους μηχανισμούς παθοφυσιολογίας της σήψης, υπέδειξε έναν πιθανώς επιβλαβή ρόλο της ATX στην παθογένεια της συστεμικής φλεγμονής. Ωστόσο, είναι δύσκολη η εξαγωγή συμπερασμάτων δεδομένης της πολυπλοκότητας των μηχανισμών της σήψης. Η σήψη αποτελεί μία πολύπλοκη κατάσταση, χωρίς να υπάρχει ομοιομορφία στο μέγεθος της μόλυνσης ή την κατανομή της. Η ανοσολογική απόκριση χαρακτηρίζεται από μία «γενωμική θύελλα» με αλληλεπίδραση χιλιάδων γονιδίων που καθιστά τη μελέτη τους ιδιαίτερα περίπλοκη ⁴³⁵.

Το πολύπλοκο και άμεσα αλληλορυθμιζόμενο δίκτυο των φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεση της σήψης υποδεικνύει τη δυσκολία εξαγωγής συμπεράσματος στη μελέτη της σήψης με την αναστολή ενός μόνο μονοπατιού ³⁴¹. Η σήψη μπορεί να προέλθει από εισβολή διαφορετικών παθογόνων, η ευαισθησία έναντι των οποίων μπορεί να επηρεαστεί από το φύλο, την ηλικία, περιβαλλοντικούς παράγοντες, γενετικές κι επιγενετικές αλλαγές στους PRRs, στους μεσολαβητές της φλεγμονής ή τους υποδοχείς τους ³⁴² ³⁵². Η σήψη χαρακτηρίζεται ως μία διαμεσολαβούμενη από τους PRRs δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, έπειτα από εισβολή παθογόνου παράγοντα. Για αυτό, η διατήρηση της λεπτής ισορροπίας ανάμεσα στις προ- και αντι-φλεγμονώδεις αποκρίσεις είναι κρίσιμη προκειμένου να επιτευχθεί η επιτυχής απόκριση του ξενιστή στη σήψη ^{436,437}.

Η χρησιμοποίηση πειραματοζώων στη σήψη που είναι πιο κοντά γενετικά στον άνθρωπο, όπως τα πρωτεύοντα, δεν είναι ηθικά αποδεκτή. Κατά συνέπεια, πρέπει να βελτιωθούν τα υπάρχοντα πειραματικά μοντέλα³²⁹. Κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η δοκιμή μιας υπό μελέτη θεραπευτικής προσέγγισης σε διάφορα πειραματικά μοντέλα σήψης πριν την εφαρμογή σε κλινικές μελέτες στον άνθρωπο. Απαιτείται η τυποποίηση – κανονικοποίηση των μοντέλων πειραματοζώων για τη σήψη προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ των διαφορετικών εργαστηρίων και σταδιακή αύξηση στο βαθμό περιπλοκότητας του κάθε μοντέλου. Τα πειραματικά μοντέλα σήψης πρέπει να αναπαράγουν τις συνθήκες που επικρατούν στις κλινικές δοκιμές, για παράδειγμα να συμπεριλαμβάνουν τη χορήγηση αντιβιοτικών και επαρκούς υγρού αναβίωσης, ώστε να ακολουθούν τα πρότυπα της φροντίδας των ασθενών³⁶¹.

Επιπλέον, απαιτείται η βελτιστοποίηση της αιμοδυναμικής υποστήριξης σε καταστάσεις σήψης και σηπτικού σοκ, σχετικά με τον όγκο, το είδος και τη θερμοκρασία του υγρού αναβίωσης και τις στρατηγικές αναπλήρωσης υγρών όπως η άμεση χορήγηση αγγειοδραστικών και ινοτροπικών παραγόντων. Επίσης, πρέπει να προσδιοριστούν οι πιθανές διαφοροποιήσεις που αποδίδονται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά του παθογόνου και του ξενιστή τα οποία επηρεάζουν την έκβαση του αποτελέσματος ³³⁰.

Λόγω της δυσκολίας διεξαγωγής μελετών σε ετερογενή πληθυσμό σηπτικών ασθενών, πρέπει να προσδιοριστούν κλινικά τελικά σημεία διαφορετικά από το θάνατο των σηπτικών ασθενών, όπως για παράδειγμα η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης οργανικής ανεπάρκειας ή/ και να διαχωριστούν πιο ομοιογενείς υποκατηγορίες ασθενών για τη μελέτη συγκεκριμένων στόχων ³⁴¹. Ιδανικά, ο κάθε ασθενής πρέπει να παρακολουθείται για αλλαγές σε χαρακτηριστικούς δείκτες της ανοσολογικής απόκρισης και να υπόκειται σε προσωποποιημένη ανοσορρυθμιστική θεραπεία ³⁴².

Η διερεύνηση της σηματοδότησης του άξονα ΑΤΧ/LPA στη συστεμική φλεγμονή μπορεί να δώσει χρήσιμα δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς παθοφυσιολογίας της σήψης και να εξηγήσει πώς η ρύθμιση των επιπέδων LPC/ATX/LPA μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη κι εξέλιξη της συστεμικής φλεγμονής.

Πέρα από την παρούσα διδακτορική διατριβή, στα πλαίσια της συνεργασίας της εργαστηριακής ομάδας του κ. Αϊδίνη, από τη συμμετοχή μου στις μελέτες διερεύνησης του ρόλου της ATX στην οξεία πνευμονική βλάβη (acute lung injury) και σε παθήσεις του ήπατος (ίνωση και καρκίνος) προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Στην οξεία πνευμονική βλάβη (ALI), η οποία προκλήθηκε από εισπνοή LPS σε ποντίκια φυσικού τύπου, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα δραστικότητας της ATX στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ποντικών, και όπως ήταν αναμενόμενο, αυξημένα επίπεδα LPA. Παρατηρήθηκε πάχυνση του κυψελιδικού τοιχώματος, εισροή ουδετερόφιλων στο διάμεσο χώρο του πνεύμονα, μικροαγγειακή διαρροή και οίδημα. Η αύξηση της ATX πιθανώς ήταν αποτέλεσμα της χαλάρωσης του ενδοθηλιακού φραγμού, υποδεικνύοντας την προσέλευση της ATX από την κυκλοφορία. Τα αυξημένα έως και 200% επίπεδα της ATX στην κυκλοφορία ποντικών που την υπερεκφράζουν, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διατριβή, επιδείνωσαν την οξεία φλεγμονή και το ALI, σε αντίθεση με τη συστεμική φλεγμονή και τις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις. Ωστόσο, η γενετική αποκοπή της ATX συγκεκριμένα από τα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου και τα μακροφάγα, που είναι οι κύριοι εκφραστές της ATX στον πνεύμονα, όπως και η φαρμακολογική αναστολή της ATX με τον GWJ-A-23 δεν είχαν αποτέλεσμα στη σοβαρότητα του ALI. Από τα παραπάνω προκύπτει μία διαφοροποιημένη εμπλοκή του άξονα ATX/LPA στην οξεία σ χέση με τη χρόνια φλεγμονή.

Όσον αφορά στη μελέτη της ΑΤΧ στο ήπαρ, βρέθηκε αυξημένη έκφραση της ΑΤΧ στο ήπαρ και στην κυκλοφορία ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες (CLD) διαφόρων αιτιολογιών, η οποία συσχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση των ασθενών, προτείνοντας την ΑΤΧ ως βιοδείκτη. Στα ποντίκια, σε διάφορα μοντέλα ασθενειών του ήπατος βρέθηκε αυξημένη έκφραση της ΑΤΧ στα ηπατοκύτταρα και όπως αναμενόταν, αυτή συνοδεύτηκε από αυξημένα επίπεδα LPA. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων του ήπατος (HSCs) και αύξηση προϊνωτικών παραγόντων. Η γενετική εξάλειψη της ΑΤΧ από τα ηπατοκύτταρα ή η υπερέκφρασή της έδειξαν έναν προϊνωτικό ρόλο του άξονα ΑΤΧ/LPA στο ήπαρ, ενώ η φαρμακολογική αναστολή της ΑΤΧ με PF8380 υπέδειξε την ΑΤΧ ως καλό φαρμακευτικό στόχο για τις χρόνιες ασθένειες του ήπατος. Επιπλέον, η γενετική απαλοιφή της ΑΤΧ από τα ηπατοκύτταρα εξασθένησε την ανάπτυξη του ηπατοκυταρικού καρκινώματος, ορίζοντας την εμπλοκή του άξονα ΑΤΧ/LPA στο ηπατικού καρκίνου.

6. Αναφορές

- 1 Stracke, M. L., Clair, T. & Liotta, L. A. Autotaxin, tumor motility-stimulating exophosphodiesterase. *Advances in enzyme regulation* **37**, 135-144 (1997).
- Jansen, S. *et al.* Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *Journal of cell science* **118**, 3081-3089, doi:10.1242/jcs.02438 (2005).
- 3 Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T. & Masu, M. The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **11**, 133-142, doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00924.x (2006).
- 4 Lyu, L. *et al.* Selective export of autotaxin from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **292**, 7011-7022, doi:10.1074/jbc.M116.774356 (2017).
- 5 van Meeteren, L. A. *et al.* Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *The Journal of biological chemistry* **280**, 21155-21161, doi:10.1074/jbc.M413183200 (2005).
- 6 Jansen, S. *et al.* An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-D. *The Journal of biological chemistry* 282, 11084-11091, doi:10.1074/jbc.M611503200 (2007).
- 7 Nakanaga, K., Hama, K. & Aoki, J. Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *Journal of biochemistry* **148**, 13-24, doi:10.1093/jb/mvq052 (2010).
- 8 Xie, Y. & Meier, K. E. Lysophospholipase D and its role in LPA production. *Cell Signal.* **16**, 975-981. (2004).
- 9 van Meeteren, L. A. *et al.* Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.* **26**, 5015-5022. (2006).
- 10 Tanaka, M. *et al.* Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.* **281**, 25822-25830. Epub 22006 Jul 25826. (2006).
- 11 Fotopoulou, S. *et al.* ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental biology* **339**, 451-464, doi:10.1016/j.ydbio.2010.01.007 (2010).
- Tokumura, A., Harada, K., Fukuzawa, K. & Tsukatani, H. Involvement of lysophospholipase
 D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochimica et biophysica acta* 875, 31-38 (1986).
- 13 Umezu-Goto, M. *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *The Journal of cell biology* **158**, 227-233, doi:10.1083/jcb.200204026 (2002).
- 14 Tokumura, A. *et al.* Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* 277, 39436-39442, doi:10.1074/jbc.M205623200 (2002).

- 15 Benesch, M. G. K., MacIntyre, I. T. K., McMullen, T. P. W. & Brindley, D. N. Coming of Age for Autotaxin and Lysophosphatidate Signaling: Clinical Applications for Preventing, Detecting and Targeting Tumor-Promoting Inflammation. *Cancers* **10**, doi:10.3390/cancers10030073 (2018).
- 16 Perrakis, A. & Moolenaar, W. H. Autotaxin: structure-function and signaling. *J Lipid Res* **55**, 1010-1018, doi:10.1194/jlr.R046391 (2014).
- Aoki, J. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Molecular and Cell Biology of Lipids* **1781**, 513-518, doi:10.1016/j.bbalip.2008.06.005 (2008).
- 18 Jansen, S. *et al.* Rapid clearance of the circulating metastatic factor autotaxin by the scavenger receptors of liver sinusoidal endothelial cells. *Cancer letters* 284, 216-221, doi:10.1016/j.canlet.2009.04.029 (2009).
- 19 Dusaulcy, R. *et al.* Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* **52**, 1247-1255, doi:10.1194/jlr.M014985 (2011).
- 20 Kanda, H. *et al.* Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nature immunology* 9, 415-423, doi:10.1038/ni1573 (2008).
- 21 Croset, M., Brossard, N., Polette, A. & Lagarde, M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *The Biochemical journal* **345 Pt 1**, 61-67 (2000).
- 22 Sevastou, I., Kaffe, E., Mouratis, M. A. & Aidinis, V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 42-60, doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.019 (2013).
- 23 Bollen, M., Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W. & Stefan, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **35**, 393-432, doi:10.1080/10409230091169249 (2000).
- 24 Stefan, C., Jansen, S. & Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* **30**, 542-550, doi:10.1016/j.tibs.2005.08.005 (2005).
- Zimmermann, H., Zebisch, M. & Strater, N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic signalling* 8, 437-502, doi:10.1007/s11302-012-9309-4 (2012).
- 26 Bhamra, Dale, Masse, K., S., Allsop, G., N. & Jones. Ε. Α. Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. The International journal of developmental biology 54, 181-193, doi:10.1387/ijdb.092879km (2010).
- 27 Okudaira, S., Yukiura, H. & Aoki, J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie.* **92**, 698-706. doi: 610.1016/j.biochi.2010.1004.1015. Epub 2010 Apr 1022. (2010).
- 28 Jansen, S., Andries, M., Derua, R., Waelkens, E. & Bollen, M. Domain interplay mediated by an essential disulfide linkage is critical for the activity and secretion of the metastasis-

promoting enzyme autotaxin. *The Journal of biological chemistry* **284**, 14296-14302, doi:10.1074/jbc.M900790200 (2009).

- 29 Ninou, I., Magkrioti, C. & Aidinis, V. Autotaxin in Pathophysiology and Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in medicine* **5**, 180, doi:10.3389/fmed.2018.00180 (2018).
- 30 Pradere, J. P., Tarnus, E., Gres, S., Valet, P. & Saulnier-Blache, J. S. Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochimica et biophysica acta* **1771**, 93-102, doi:10.1016/j.bbalip.2006.11.010 (2007).
- 31 van Meeteren, L. A. & Moolenaar, W. H. Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res.* 46, 145-160. Epub 2007 Mar 2016. (2007).
- 32 Federico, L., Jeong, K. J., Vellano, C. P. & Mills, G. B. Autotaxin, a lysophospholipase D with pleomorphic effects in oncogenesis and cancer progression. *J Lipid Res* 57, 25-35, doi:10.1194/jlr.R060020 (2016).
- 33 Lee, H. Y. *et al.* Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **218**, 714-719, doi:10.1006/bbrc.1996.0127 (1996).
- 34 Hashimoto, T. *et al.* Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATXdelta, with a four-amino acid deletion. *Journal of biochemistry* **151**, 89-97, doi:10.1093/jb/mvr126 (2012).
- 35 Stracke, M. L. *et al.* Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *The Journal of biological chemistry* **267**, 2524-2529 (1992).
- Houben, A. J. *et al.* The polybasic insertion in autotaxin alpha confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* 288, 510-519, doi:10.1074/jbc.M112.358416 (2013).
- 37 Giganti, A. *et al.* Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *The Journal of biological chemistry* 283, 7776-7789, doi:10.1074/jbc.M708705200 (2008).
- 38 Fuss, B., Baba, H., Phan, T., Tuohy, V. K. & Macklin, W. B. Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 9095-9103 (1997).
- 39 Kawagoe, H. *et al.* Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase l/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2). *Genomics* **30**, 380-384, doi:10.1006/geno.1995.0036 (1995).
- 40 Murata, J. *et al.* cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *The Journal of biological chemistry* **269**, 30479-30484 (1994).
- Hausmann, J. *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 198-204. doi: 110.1038/nsmb.1980. Epub 2011 Jan 1016. (2011).

- 42 Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol.* **18**, 205-212. doi: 210.1038/nsmb.1998. Epub 2011 Jan 1016. (2011).
- 43 Jansen, S. *et al.* Structure of NPP1, an ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase involved in tissue calcification. *Structure (London, England : 1993)* **20**, 1948-1959, doi:10.1016/j.str.2012.09.001 (2012).
- 44 Kato, K. *et al.* Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 16876-16881, doi:10.1073/pnas.1208017109 (2012).
- 45 North, E. J., Osborne, D. A., Bridson, P. K., Baker, D. L. & Parrill, A. L. Autotaxin structureactivity relationships revealed through lysophosphatidylcholine analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry* **17**, 3433-3442, doi:10.1016/j.bmc.2009.03.030 (2009).
- Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K. & Aoki, J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem.* **157**, 81-89. doi: 10.1093/jb/mvu1077. Epub 2014 Dec 1011. (2015).
- 47 Fulkerson, Z. *et al.* Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 34654-34663, doi:10.1074/jbc.M111.276725 (2011).
- 48 Leblanc, R. *et al.* Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin alphaVbeta3 controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood* **124**, 3141-3150, doi:10.1182/blood-2014-04-568683 (2014).
- 49 Bai, Z. *et al.* Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J Immunol.* 190, 2036-2048. doi: 2010.4049/jimmunol.1202025. Epub 1202013 Jan 1202030. (2013).
- 50 Zhang, Y., Chen, Y. C., Krummel, M. F. & Rosen, S. D. Autotaxin through lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells. *J Immunol.* **189**, 3914-3924. doi: 3910.4049/jimmunol.1201604. Epub 1202012 Sep 1201607. (2012).
- 51 Nakasaki, T. *et al.* Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *The American journal of pathology* **173**, 1566-1576, doi:10.2353/ajpath.2008.071153 (2008).
- 52 Nakamura, K. *et al.* Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **388**, 51-58, doi:10.1016/j.cca.2007.10.005 (2008).
- Barbayianni, E., Kaffe, E., Aidinis, V. & Kokotos, G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase
 D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Prog Lipid Res.*58:76-96., 10.1016/j.plipres.2015.1002.1001. Epub 2015 Feb 1020. (2015).
- 54 Oikonomou, N. *et al.* Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **47**, 566-574, doi:10.1165/rcmb.2012-0004OC (2012).

- 55 Yuelling, L. M. & Fuss, B. Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochimica et biophysica acta* **1781**, 525-530, doi:10.1016/j.bbalip.2008.04.009 (2008).
- 56 Jethwa, S. A. *et al.* Exosomes bind to autotaxin and act as a physiological delivery mechanism to stimulate LPA receptor signalling in cells. **129**, 3948-3957 (2016).
- 57 Grisanzio, C. & Freedman, M. L. Chromosome 8q24-Associated Cancers and MYC. *Genes* & cancer **1**, 555-559, doi:10.1177/1947601910381380 (2010).
- 58 Brisbin, A. G. *et al.* Meta-analysis of 8q24 for seven cancers reveals a locus between NOV and ENPP2 associated with cancer development. *BMC medical genetics* **12**, 156, doi:10.1186/1471-2350-12-156 (2011).
- 59 Parris, T. Z. *et al.* Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas. *Oncogenesis* 3, e95, doi:10.1038/oncsis.2014.8 (2014).
- Li, S., Wang, B., Xu, Y. & Zhang, J. Autotaxin is induced by TSA through HDAC3 and HDAC7 inhibition and antagonizes the TSA-induced cell apoptosis. *Molecular cancer* 10, 18, doi:10.1186/1476-4598-10-18 (2011).
- 61 Williams, T. M. *et al.* Candidate downstream regulated genes of HOX group 13 transcription factors with and without monomeric DNA binding capability. *Developmental biology* 279, 462-480, doi:10.1016/j.ydbio.2004.12.015 (2005).
- 62 Black, E. J., Clair, T., Delrow, J., Neiman, P. & Gillespie, D. A. Microarray analysis identifies Autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun. *Oncogene* 23, 2357-2366, doi:10.1038/sj.onc.1207377 (2004).
- 63 Sioletic, S. *et al.* c-Jun promotes cell migration and drives expression of the motility factor ENPP2 in soft tissue sarcomas. *The Journal of pathology* 234, 190-202, doi:10.1002/path.4379 (2014).
- 64 Azare, J. *et al.* Stat3 mediates expression of autotaxin in breast cancer. *PLoS One* **6**, e27851, doi:10.1371/journal.pone.0027851 (2011).
- Farina, A. R. *et al.* Constitutive autotaxin transcription by Nmyc-amplified and non-amplified neuroblastoma cells is regulated by a novel AP-1 and SP-mediated mechanism and abrogated by curcumin. *FEBS letters* **586**, 3681-3691, doi:10.1016/j.febslet.2012.08.026 (2012).
- 66 Ryborg, A. K., Johansen, C., Iversen, L. & Kragballe, K. Lysophosphatidylcholine induces keratinocyte differentiation and upregulation of AP-1- and NF-kappaB DNA-binding activity. *Acta dermato-venereologica* 84, 433-438 (2004).
- 67 Braeuer, R. R. *et al.* Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. *Cancer research* **72**, 5757-5766, doi:10.1158/0008-5472.can-12-2424 (2012).

- 68 Sun, S. *et al.* Autotaxin Expression Is Regulated at the Post-transcriptional Level by the RNA-binding Proteins HuR and AUF1. *The Journal of biological chemistry* **291**, 25823-25836, doi:10.1074/jbc.M116.756908 (2016).
- 69 Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. & Giepmans, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **26**, 870-881, doi:10.1002/bies.20081 (2004).
- Kaffe, E. *et al.* Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. 65, 1369-1383, doi:10.1002/hep.28973 (2017).
- 71 Wu, J. M. *et al.* Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer* **9**, 71, doi:10.1186/1476-4598-9-71 (2010).
- Li, S., Xiong, C. & Zhang, J. ATX and LPA receptor 3 are coordinately up-regulated in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells through PKR and SPK1-mediated pathways. *FEBS letters* 586, 792-797, doi:10.1016/j.febslet.2012.01.044 (2012).
- 73 Song, J., Guan, M., Zhao, Z. & Zhang, J. Type I Interferons Function as Autocrine and Paracrine Factors to Induce Autotaxin in Response to TLR Activation. *PLoS One* 10, e0136629, doi:10.1371/journal.pone.0136629 (2015).
- 74 Tsuda, S. *et al.* Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *The Journal of biological chemistry* **281**, 26081-26088, doi:10.1074/jbc.M602925200 (2006).
- 75 Endo, T. *et al.* Lysophosphatidylmethanol is a pan lysophosphatidic acid receptor agonist and is produced by autotaxin in blood. *Journal of biochemistry* **146**, 283-293, doi:10.1093/jb/mvp068 (2009).
- 76 Tigyi, G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol.* **161**, 241-270. doi: 210.1111/j.1476-5381.2010.00815.x. (2010).
- 77 Benesch, M. G., Zhao, Y. Y., Curtis, J. M., McMullen, T. P. & Brindley, D. N. Regulation of autotaxin expression and secretion by lysophosphatidate and sphingosine-1-phosphate. J Lipid Res 20 (2015).
- 78 Saunders, L. P. *et al.* Kinetic analysis of autotaxin reveals substrate-specific catalytic pathways and a mechanism for lysophosphatidic acid distribution. *The Journal of biological chemistry* **286**, 30130-30141, doi:10.1074/jbc.M111.246884 (2011).
- 79 Moolenaar, W. H., Houben, A. J., Lee, S. J. & van Meeteren, L. A. Autotaxin in embryonic development. *Biochim Biophys Acta.* **1831**, 13-19. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.1009.1013. Epub 2012 Sep 1028. (2013).
- 80 Greenman, R. *et al.* Non-cell autonomous and non-catalytic activities of ATX in the developing brain. *Frontiers in neuroscience* **9**, 53, doi:10.3389/fnins.2015.00053 (2015).
- 81 Ferry, G. *et al.* Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *The Journal of biological chemistry* **278**, 18162-18169, doi:10.1074/jbc.M301158200 (2003).

- Willier, S., Butt, E. & Grunewald, T. G. Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biology of the cell* **105**, 317-333, doi:10.1111/boc.201300011 (2013).
- 83 Leblanc, R. & Peyruchaud, O. New insights into the autotaxin/LPA axis in cancer development and metastasis. *Exp Cell Res.* 333, 183-189. doi: 110.1016/j.yexcr.2014.1011.1010. Epub 2014 Nov 1025. (2015).
- Peyruchaud, O., Leblanc, R. & David, M. Pleiotropic activity of lysophosphatidic acid in bone metastasis. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 99-104, doi:10.1016/j.bbalip.2012.06.004 (2013).
- 85 Yang, S. Y. *et al.* Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis* **19**, 603-608 (2002).
- 86 Stassar, M. J. *et al.* Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *British journal of cancer* 85, 1372-1382, doi:10.1054/bjoc.2001.2074 (2001).
- 87 Baumforth, K. R. *et al.* Induction of autotaxin by the Epstein-Barr virus promotes the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* **106**, 2138-2146, doi:10.1182/blood-2005-02-0471 (2005).
- 88 Zhang, G., Zhao, Z., Xu, S., Ni, L. & Wang, X. Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chinese medical journal* **112**, 330-332 (1999).
- Kishi, Y. *et al.* Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 281, 17492-17500, doi:10.1074/jbc.M601803200 (2006).
- 90 Magkrioti, C. *et al.* The Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Axis Promotes Lung Carcinogenesis. **78**, 3634-3644, doi:10.1158/0008-5472.can-17-3797 (2018).
- 91 Van Leeuwen, F. N. *et al.* Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *The Journal of biological chemistry* 278, 400-406, doi:10.1074/jbc.M210151200 (2003).
- 92 Ohta, H. *et al.* Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* **64**, 994-1005, doi:10.1124/mol.64.4.994 (2003).
- 93 Shida, D. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. *Cancer research* **63**, 1706-1711 (2003).
- 94 Yamada, T. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1. *The Journal of biological chemistry* 279, 6595-6605, doi:10.1074/jbc.M308133200 (2004).
- Velasco, M., O'Sullivan, C. & Sheridan, G. K. Lysophosphatidic acid receptors (LPARs):
 Potential targets for the treatment of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 113, 608-617, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.04.002 (2017).

- 96 McDougall, J. J. *et al.* Lysophosphatidic acid provides a missing link between osteoarthritis and joint neuropathic pain. *Osteoarthritis and cartilage* **25**, 926-934, doi:10.1016/j.joca.2016.08.016 (2017).
- 97 Herr, D. R., Ong, J. H. & Ong, W. Y. Potential Therapeutic Applications for Inhibitors of Autotaxin, a Bioactive Lipid-Producing Lysophospholipase D, in Disorders Affecting the Nervous System. ACS chemical neuroscience 9, 398-400, doi:10.1021/acschemneuro.8b00057 (2018).
- 98 Tokumura, A. *et al.* Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life sciences* 80, 1641-1649, doi:10.1016/j.lfs.2006.12.041 (2007).
- 99 Umemura, K. *et al.* Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neuroscience letters* **400**, 97-100, doi:10.1016/j.neulet.2006.02.008 (2006).
- Hammack, B. N. *et al.* Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 10, 245-260, doi:10.1191/1352458504ms1023oa (2004).
- 101 Tigyi, G. & Parrill, A. L. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in lipid research* **42**, 498-526 (2003).
- 102 Moolenaar, W. H. Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. Annals of the New York Academy of Sciences **905**, 1-10 (2000).
- 103 Bandoh, K. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS letters* 478, 159-165 (2000).
- 104 Valdes-Rives, S. A. & Gonzalez-Arenas, A. Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development. **2017**, 9173090, doi:10.1155/2017/9173090 (2017).
- 105 Mills, G. B. & Moolenaar, W. H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**, 582-591, doi:10.1038/nrc1143 (2003).
- Sugiura, T. *et al.* Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res* 43, 2049-2055 (2002).
- 107 Hama, K., Bandoh, K., Kakehi, Y., Aoki, J. & Arai, H. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS letters* **523**, 187-192 (2002).
- 108 Tokumura, A. *et al.* Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biology of reproduction* **61**, 195-199 (1999).
- 109 Aoki, J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 477-489, doi:10.1016/j.semcdb.2004.05.001 (2004).
- 110 Sedlakova, I., Vavrova, J., Tosner, J. & Hanousek, L. Lysophosphatidic acid (LPA)-a perspective marker in ovarian cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **32**, 311-316, doi:10.1007/s13277-010-0123-8 (2011).

- 111 Gerrard, J. M. & Robinson, P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochimica et biophysica acta* **1001**, 282-285 (1989).
- 112 Baker, D. L., Desiderio, D. M., Miller, D. D., Tolley, B. & Tigyi, G. J. Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical biochemistry* **292**, 287-295, doi:10.1006/abio.2001.5063 (2001).
- 113 Sano, T. *et al.* Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *The Journal of biological chemistry* 277, 21197-21206, doi:10.1074/jbc.M201289200 (2002).
- 114 Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D. & Chun, J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13384-13389, doi:10.1073/pnas.97.24.13384 (2000).
- 115 Choi, J. W. & Chun, J. Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. Biochimica et biophysica acta **1831**, 20-32, doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.015 (2013).
- 116 Inoue, M. *et al.* Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nature medicine* **10**, 712-718, doi:10.1038/nm1060 (2004).
- 117 Ye, X. *et al.* LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* **435**, 104-108, doi:10.1038/nature03505 (2005).
- 118 Pasternack, S. M. *et al.* G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics* **40**, 329-334, doi:10.1038/ng.84 (2008).
- 119 Brindley, D. N., Benesch, M. G. K. & Murph, M. M. Autotaxin–an enzymatic augmenter of malignant progression linked to inflammation. *Melanoma - Current Clinical Management* and Future Therapeutics M. Murph, Ed., 12 (2015).
- 120 Mazereeuw-Hautier, J. *et al.* Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity. *The Journal of investigative dermatology* **125**, 421-427, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23855.x (2005).
- 121 Jongsma, M., Matas-Rico, E., Rzadkowski, A., Jalink, K. & Moolenaar, W. H. LPA is a chemorepellent for B16 melanoma cells: action through the cAMP-elevating LPA5 receptor. *PLoS One* 6, e29260, doi:10.1371/journal.pone.0029260 (2011).
- 122 Oda, S. K. *et al.* Lysophosphatidic acid inhibits CD8 T cell activation and control of tumor progression. *Cancer immunology research* 1, 245-255, doi:10.1158/2326-6066.cir-13-0043t (2013).
- 123 Georas, S. N. Lysophosphatidic acid and autotaxin: emerging roles in innate and adaptive immunity. *Immunol Res.* 45, 229-238. doi: 210.1007/s12026-12009-18104-y. Epub 12009 Jan 12030. (2009).
- 124 Murakami, M. & Kudo, I. Phospholipase A2. *Journal of biochemistry* **131**, 285-292, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101 (2002).
- 125 Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G. I., Inoue, K. & Kudo, I. Regulatory Functions of Phospholipase A2. *Critical reviews in immunology* **37**, 121-179, doi:10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20 (2017).
- 126 Sonoda, H. *et al.* A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* **277**, 34254-34263, doi:10.1074/jbc.M201659200 (2002).
- 127 Quan, M., Cui, J. J., Feng, X. & Huang, Q. The critical role and potential target of the autotaxin/lysophosphatidate axis in pancreatic cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **39**, 1010428317694544, doi:10.1177/1010428317694544 (2017).
- 128 Inoue, A. *et al.* LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *The EMBO journal* **30**, 4248-4260, doi:10.1038/emboj.2011.296 (2011).
- 129 Kazantseva, A. *et al.* Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH. *Science (New York, N.Y.)* **314**, 982-985, doi:10.1126/science.1133276 (2006).
- 130 Grisanti, L., Rezza, A., Clavel, C., Sennett, R. & Rendl, M. Enpp2/Autotaxin in dermal papilla precursors is dispensable for hair follicle morphogenesis. *The Journal of investigative dermatology* **133**, 2332-2339, doi:10.1038/jid.2013.140 (2013).
- 131 Pasternack, S. M. *et al.* In vitro analysis of LIPH mutations causing hypotrichosis simplex: evidence confirming the role of lipase H and lysophosphatidic acid in hair growth. *The Journal of investigative dermatology* **129**, 2772-2776, doi:10.1038/jid.2009.154 (2009).
- 132 Shimomura, Y., Wajid, M., Petukhova, L., Shapiro, L. & Christiano, A. M. Mutations in the lipase H gene underlie autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. *The Journal of investigative dermatology* **129**, 622-628, doi:10.1038/jid.2008.290 (2009).
- 133 Bektas, M. *et al.* A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *The Journal of cell biology* **169**, 801-811, doi:10.1083/jcb.200407123 (2005).
- 134 Tokumura, A., Nishioka, Y., Yoshimoto, O., Shinomiya, J. & Fukuzawa, K. Substrate specificity of lysophospholipase D which produces bioactive lysophosphatidic acids in rat plasma. *Biochimica et biophysica acta* **1437**, 235-245 (1999).
- 135 Ojala, P. J. *et al.* Identification of alpha-1 acid glycoprotein as a lysophospholipid binding protein: a complementary role to albumin in the scavenging of lysophosphatidylcholine. *Biochemistry* **45**, 14021-14031, doi:10.1021/bi061657I (2006).
- Brindley, D. N. & Pilquil, C. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res* 50
 Suppl, S225-230, doi:10.1194/jlr.R800055-JLR200 (2009).
- 137 Ren, H. *et al.* Lipid phosphate phosphatase (LPP3) and vascular development. *Biochimica et biophysica acta* **1831**, 126-132, doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.012 (2013).

- 138 Tomsig, J. L. *et al.* Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *The Biochemical journal* **419**, 611-618, doi:10.1042/bj20081888 (2009).
- 139 Tang, X., Benesch, M. G. & Brindley, D. N. Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *J Lipid Res* 56, 2048-2060, doi:10.1194/jlr.R058362 (2015).
- 140 Salous, A. K. *et al.* Mechanism of rapid elimination of lysophosphatidic acid and related lipids from the circulation of mice. *J Lipid Res* 54, 2775-2784, doi:10.1194/jlr.M039685 (2013).
- 141 Albers, H. M. et al. Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 7257-7262, doi:10.1073/pnas.1001529107 (2010).
- 142 Pages, C., Simon, M. F., Valet, P. & Saulnier-Blache, J. S. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & other lipid mediators* **64**, 1-10 (2001).
- 143 Kok, B. P., Venkatraman, G., Capatos, D. & Brindley, D. N. Unlike two peas in a pod: lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases. *Chemical reviews* **112**, 5121-5146, doi:10.1021/cr200433m (2012).
- 144 Goetzl, E. J. *et al.* Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* **275**, 14573-14578 (2000).
- 145 Osborn, T. M., Dahlgren, C., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**, C1323-1330, doi:10.1152/ajpcell.00510.2006 (2007).
- 146 Choi, J. W. *et al.* LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual review of pharmacology and toxicology* **50**, 157-186, doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753 (2010).
- 147 McIntyre, T. M. et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America **100**, 131-136, doi:10.1073/pnas.0135855100 (2003).
- 148 Rai, V. et al.
- 149 Rai, V. *et al.* Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *The Journal of experimental medicine* **209**, 2339-2350, doi:10.1084/jem.20120873 (2012).
- 150 Murakami, M., Shiraishi, A., Tabata, K. & Fujita, N. Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **371**, 707-712, doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.145 (2008).
- 151 Tabata, K., Baba, K., Shiraishi, A., Ito, M. & Fujita, N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and*

biophysical research communications **363**, 861-866, doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.063 (2007).

- 152 Kihara, Y., Maceyka, M., Spiegel, S. & Chun, J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol* **171**, 3575-3594, doi:10.1111/bph.12678 (2014).
- 153 Yung, Y. C., Stoddard, N. C. & Chun, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* **55**, 1192-1214, doi:10.1194/jlr.R046458 (2014).
- 154 Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R. & Chun, J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of cell biology* **135**, 1071-1083 (1996).
- 155 An, S., Bleu, T., Hallmark, O. G. & Goetzl, E. J. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7906-7910 (1998).
- 156 Bandoh, K. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel human G-proteincoupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 274, 27776-27785 (1999).
- 157 Takuwa, Y., Takuwa, N. & Sugimoto, N. The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *Journal of biochemistry* 131, 767-771 (2002).
- 158 Im, D. S. *et al.* Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Molecular pharmacology* **57**, 753-759 (2000).
- 159 Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S. & Moolenaar, W. H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological reviews* 62, 579-587, doi:10.1124/pr.110.003111 (2010).
- 160 Noguchi, K., Ishii, S. & Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G proteincoupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *The Journal of biological chemistry* 278, 25600-25606, doi:10.1074/jbc.M302648200 (2003).
- 161 Lee, C. W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E. & Chun, J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *The Journal of biological chemistry* 281, 23589-23597, doi:10.1074/jbc.M603670200 (2006).
- Ishii, S., Noguchi, K. & Yanagida, K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors.
 Prostaglandins & other lipid mediators 89, 57-65, doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.06.001 (2009).
- 163 Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T. & Ishii, S. Current progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 33-41, doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.003 (2013).
- 164 Stoddard, N. C. & Chun, J. Promising pharmacological directions in the world of lysophosphatidic Acid signaling. *Biomolecules & therapeutics* 23, 1-11, doi:10.4062/biomolther.2014.109 (2015).

- 165 Contos, J. J. *et al.* Characterization of Ipa(2) (Edg4) and Ipa(1)/Ipa(2) (Edg2/Edg4) Iysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to Ipa(2). *Mol Cell Biol.* **22**, 6921-6929. (2002).
- 166 Contos, J. J., Ishii, I. & Chun, J. Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* 58, 1188-1196 (2000).
- 167 Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N. & Chun, J. Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Molecular pharmacology* 58, 895-902 (2000).
- 168 Lee, C. W., Rivera, R., Dubin, A. E. & Chun, J. LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 4310-4317, doi:10.1074/jbc.M610826200 (2007).
- 169 Yanagida, K. *et al.* Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *The Journal of biological chemistry* **284**, 17731-17741, doi:10.1074/jbc.M808506200 (2009).
- 170 Lee, M. et al. P2Y5 is a G(alpha)i, G(alpha)12/13 G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 297, G641-654, doi:10.1152/ajpgi.00191.2009 (2009).
- 171 Tigyi, G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* **161**, 241-270, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00815.x (2010).
- 172 Williams, J. R. *et al.* Unique ligand selectivity of the GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor indicates role in human platelet activation. *The Journal of biological chemistry* 284, 17304-17319, doi:10.1074/jbc.M109.003194 (2009).
- 173 Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H. & Chun, J. Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron* **85**, 669-682, doi:10.1016/j.neuron.2015.01.009 (2015).
- 174 Ohuchi, H. *et al.* Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**, 3280-3294, doi:10.1002/dvdy.21736 (2008).
- 175 Kotarsky, K. *et al.* Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **318**, 619-628, doi:10.1124/jpet.105.098848 (2006).
- Shida, D. *et al.* Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84, 1352-1362, doi:10.1038/labinvest.3700146 (2004).
- 177 Funke, M. et al. Lysophosphatidic Acid Signaling through the Lysophosphatidic Acid-1 Receptor Is Required for Alveolarization. American journal of respiratory cell and molecular biology 55, 105-116, doi:10.1165/rcmb.2015-0152OC (2016).

- 178 Ueda, H., Matsunaga, H., Olaposi, O. I. & Nagai, J. Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain. *Biochimica et biophysica acta* **1831**, 61-73, doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.014 (2013).
- 179 Tager, A. M. *et al.* The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature medicine* **14**, 45-54, doi:10.1038/nm1685 (2008).
- 180 Pradere, J. P. *et al.* LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**, 3110-3118, doi:10.1681/asn.2007020196 (2007).
- 181 Rancoule, C. *et al.* Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert opinion on investigational drugs* **20**, 657-667, doi:10.1517/13543784.2011.566864 (2011).
- 182 Deng, W. *et al.* The lysophosphatidic acid type 2 receptor is required for protection against radiation-induced intestinal injury. *Gastroenterology* **132**, 1834-1851, doi:10.1053/j.gastro.2007.03.038 (2007).
- 183 Lin, S. *et al.*
- 184 Hama, K. *et al.* Lysophosphatidic receptor, LPA3, is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life sciences* **79**, 1736-1740, doi:10.1016/j.lfs.2006.06.002 (2006).
- 185 Ye, X., Skinner, M. K., Kennedy, G. & Chun, J. Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biology of reproduction* **79**, 328-336, doi:10.1095/biolreprod.108.068783 (2008).
- 186 Sumida, H. *et al.* LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* **116**, 5060-5070, doi:10.1182/blood-2010-03-272443 (2010).
- 187 Kazlauskas, A. Lysophosphatidic acid contributes to angiogenic homeostasis. *Experimental cell research* **333**, 166-170, doi:10.1016/j.yexcr.2014.11.012 (2015).
- 188 Chen, Y., Ramakrishnan, D. P. & Ren, B. Regulation of angiogenesis by phospholipid lysophosphatidic acid. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **18**, 852-861 (2013).
- 189 Pamuklar, Z. et al. Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. The Journal of biological chemistry 284, 7385-7394, doi:10.1074/jbc.M807820200 (2009).
- 190 Hui, W., Zhao, C. & Bourgoin, S. G. LPA Promotes T Cell Recruitment through Synthesis of CXCL13. *Mediators of inflammation* **2015**, 248492, doi:10.1155/2015/248492 (2015).
- Schober, A. & Siess, W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol* 167, 465-482, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02021.x (2012).
- 192 Wheeler, N. A., Lister, J. A. & Fuss, B. The Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Axis Modulates Histone Acetylation and Gene Expression during Oligodendrocyte Differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**, 11399-11414, doi:10.1523/jneurosci.0345-15.2015 (2015).
- 193 Smyth, S. S., Mueller, P., Yang, F., Brandon, J. A. & Morris, A. J. Arguing the case for the autotaxin-lysophosphatidic acid-lipid phosphate phosphatase 3-signaling nexus in the

development and complications of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **34**, 479-486, doi:10.1161/atvbaha.113.302737 (2014).

- 194 Kremer, A. E. *et al.* Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. *Gastroenterology* **139**, 1008-1018, 1018.e1001, doi:10.1053/j.gastro.2010.05.009 (2010).
- 195 Liu, S. *et al.* Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer cell* **15**, 539-550, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.027 (2009).
- 196 Marshall, J. C. *et al.* Effect of inhibition of the lysophosphatidic acid receptor 1 on metastasis and metastatic dormancy in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **104**, 1306-1319, doi:10.1093/jnci/djs319 (2012).
- 197 Houben, A. J. & Moolenaar, W. H. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer* metastasis reviews **30**, 557-565, doi:10.1007/s10555-011-9319-7 (2011).
- 198 Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K. & Aoki, J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *Journal of biochemistry* **157**, 81-89, doi:10.1093/jb/mvu077 (2015).
- 199 Diao, H. *et al.* Altered spatiotemporal expression of collagen types I, III, IV, and VI in Lpar3deficient peri-implantation mouse uterus. *Biology of reproduction* 84, 255-265, doi:10.1095/biolreprod.110.086942 (2011).
- 200 Aikawa, S., Kano, K., Inoue, A. & Aoki, J. Proliferation of mouse endometrial stromal cells in culture is highly sensitive to lysophosphatidic acid signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 484, 202-208, doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.154 (2017).
- 201 Sinderewicz, E. *et al.* Bovine ovarian follicular growth and development correlate with lysophosphatidic acid expression. *Theriogenology* **106**, 1-14, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.09.027 (2018).
- 202 Tokumura, A. *et al.* Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. *Biology of reproduction* **67**, 1386-1392 (2002).
- 203 Ichikawa, M. et al. Placental autotaxin expression is diminished in women with preeclampsia. The journal of obstetrics and gynaecology research 41, 1406-1411, doi:10.1111/jog.12742 (2015).
- 204 Erenel, H., Yilmaz, N., Cift, T. & Bulut, B. Maternal serum autotaxin levels in early- and lateonset preeclampsia. 36, 310-314, doi:10.1080/10641955.2017.1388389 (2017).
- 205 Masuda, A. *et al.* Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **412**, 1944-1950, doi:10.1016/j.cca.2011.06.039 (2011).
- 206 Tokumura, A., Kume, T., Taira, S., Yasuda, K. & Kanzaki, H. Altered activity of lysophospholipase D, which produces bioactive lysophosphatidic acid and choline, in serum from women with pathological pregnancy. *Molecular human reproduction* **15**, 301-310, doi:10.1093/molehr/gap017 (2009).

- 207 Ferry, G. *et al.* Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS letters* **581**, 3572-3578, doi:10.1016/j.febslet.2007.06.064 (2007).
- 208 Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J. P. & Simon, M. I. Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science (New York, N.Y.)* 275, 533-536 (1997).
- 209 Ruppel, K. M. et al. Essential role for Galpha13 in endothelial cells during embryonic development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 8281-8286, doi:10.1073/pnas.0503326102 (2005).
- 210 Yukiura, H., Kano, K., Kise, R., Inoue, A. & Aoki, J. Autotaxin overexpression causes embryonic lethality and vascular defects. *PLoS One* **10**, e0126734, doi:10.1371/journal.pone.0126734 (2015).
- 211 Chatterjee, I., Baruah, J., Lurie, E. E. & Wary, K. K. Endothelial lipid phosphate phosphatase-3 deficiency that disrupts the endothelial barrier function is a modifier of cardiovascular development. *Cardiovascular research* **111**, 105-118, doi:10.1093/cvr/cvw090 (2016).
- 212 Escalante-Alcalde, D. *et al.* The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development (Cambridge, England)* **130**, 4623-4637, doi:10.1242/dev.00635 (2003).
- 213 Ray, R. & Rai, V. Lysophosphatidic acid converts monocytes into macrophages in both mice and humans. **129**, 1177-1183, doi:10.1182/blood-2016-10-743757 (2017).
- 214 Knowlden, S. A. *et al.* Regulation of T cell motility in vitro and in vivo by LPA and LPA2. *PLoS One* **9**, e101655, doi:10.1371/journal.pone.0101655 (2014).
- 215 Takeda, A. *et al.* Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *eLife* **5**, e10561, doi:10.7554/eLife.10561 (2016).
- 216 Kime, C. *et al.* Autotaxin-mediated lipid signaling intersects with LIF and BMP signaling to promote the naive pluripotency transcription factor program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 12478-12483, doi:10.1073/pnas.1608564113 (2016).
- 217 Nishioka, T. *et al.* ATX-LPA1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation. *Scientific reports* 6, 23433, doi:10.1038/srep23433 (2016).
- 218 Cerutis, D. R., Weston, M. D., Ogunleye, A. O., McVaney, T. P. & Miyamoto, T. Lysophosphatidic acid (LPA) 18:1 transcriptional regulation of primary human gingival fibroblasts. *Genomics data* 2, 375-377, doi:10.1016/j.gdata.2014.10.014 (2014).
- 219 Cerutis, D. R. *et al.* A Major Human Oral Lysophosphatidic Acid Species, LPA 18:1, Regulates Novel Genes in Human Gingival Fibroblasts. *Journal of periodontology* 86, 713-725, doi:10.1902/jop.2015.140592 (2015).
- 220 Nikitopoulou, I. *et al.* Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *The Journal of experimental medicine* **209**, 925-933, doi:10.1084/jem.20112012 (2012).

- 221 Rancoule, C. *et al.* Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue. *Journal of physiology and biochemistry* **68**, 635-644, doi:10.1007/s13105-012-0181-z (2012).
- 222 Nakamura, R. *et al.* Serum fatty acid-binding protein 4 (FABP4) concentration is associated with insulin resistance in peripheral tissues, A clinical study. *PLoS One* **12**, e0179737, doi:10.1371/journal.pone.0179737 (2017).
- 223 D'Souza, K. *et al.* Autotaxin Is Regulated by Glucose and Insulin in Adipocytes. *Endocrinology* **158**, 791-803, doi:10.1210/en.2017-00035 (2017).
- 224 Lopez-Jaramillo, P. *et al.* The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Hormone molecular biology and clinical investigation* **18**, 37-45, doi:10.1515/hmbci-2013-0053 (2014).
- 225 D'Souza, K., Paramel, G. V. & Kienesberger, P. C. Lysophosphatidic Acid Signaling in Obesity and Insulin Resistance. *Nutrients* **10**, doi:10.3390/nu10040399 (2018).
- Fruhbeck, G. *et al.* Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome. *Scientific reports* 7, 6619, doi:10.1038/s41598-017-06997-0 (2017).
- 227 Reeves, V. L. *et al.* Serum Autotaxin/ENPP2 correlates with insulin resistance in older humans with obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **23**, 2371-2376, doi:10.1002/oby.21232 (2015).
- 228 Nishimura, S. *et al.* ENPP2 contributes to adipose tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity. *Diabetes* **63**, 4154-4164, doi:10.2337/db13-1694 (2014).
- 229 Sun, S. *et al.* Blocking gp130 signaling suppresses autotaxin expression in adipocytes and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity. **58**, 2102-2113, doi:10.1194/jlr.M075655 (2017).
- 230 Parimisetty, A. *et al.* Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *Journal of neuroinflammation* **13**, 67, doi:10.1186/s12974-016-0530-x (2016).
- 231 McLimans, K. E. & Willette, A. A. Autotaxin is Related to Metabolic Dysfunction and Predicts Alzheimer's Disease Outcomes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 56, 403-413, doi:10.3233/jad-160891 (2017).
- 232 Bourgoin, S. G. & Zhao, C. Autotaxin and lysophospholipids in rheumatoid arthritis. *Current* opinion in investigational drugs (London, England : 2000) **11**, 515-526 (2010).
- 233 Nikitopoulou, I. *et al.* A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis. *PLoS One* 8, e70941, doi:10.1371/journal.pone.0070941 (2013).
- 234 Orosa, B., Garcia, S. & Conde, C. The autotaxin-lysophosphatidic acid pathway in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *European journal of pharmacology* **765**, 228-233, doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.028 (2015).
- 235 Mabey, T., Taleongpong, P., Udomsinprasert, W., Jirathanathornnukul, N. & Honsawek, S. Plasma and synovial fluid autotaxin correlate with severity in knee osteoarthritis. *Clinica*

chimica acta; international journal of clinical chemistry **444**, 72-77, doi:10.1016/j.cca.2015.01.032 (2015).

- 236 Datta, P. *et al.* High-fat diet-induced acceleration of osteoarthritis is associated with a distinct and sustained plasma metabolite signature. *Scientific reports* 7, 8205, doi:10.1038/s41598-017-07963-6 (2017).
- 237 Chu, X., Wei, X., Lu, S. & He, P. Autotaxin-LPA receptor axis in the pathogenesis of lung diseases. *International journal of clinical and experimental medicine* **8**, 17117-17122 (2015).
- 238 Black, K. E. *et al.* Autotaxin activity increases locally following lung injury, but is not required for pulmonary lysophosphatidic acid production or fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **30**, 2435-2450, doi:10.1096/fj.201500197R (2016).
- 239 Martinez, F. J. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature reviews. Disease primers* **3**, 17074, doi:10.1038/nrdp.2017.74 (2017).
- 240 Kato, K. *et al.* Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. **23**, 395-401, doi:10.1038/nsmb.3200 (2016).
- 241 Desroy, N. *et al.* Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methyli midazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of medicinal chemistry* **60**, 3580-3590, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00032 (2017).
- 242 Huang, L. S. *et al.* Lysophosphatidic acid receptor-2 deficiency confers protection against bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **49**, 912-922, doi:10.1165/rcmb.2013-0070OC (2013).
- 243 Swaney, J. S. *et al.* A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol* **160**, 1699-1713, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00828.x (2010).
- 244 Funke, M., Zhao, Z., Xu, Y., Chun, J. & Tager, A. M. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. *American journal of respiratory cell* and molecular biology 46, 355-364, doi:10.1165/rcmb.2010-0155OC (2012).
- 245 Oikonomou, N. *et al.* Soluble TNF mediates the transition from pulmonary inflammation to fibrosis. *PLoS One* **1**, e108, doi:10.1371/journal.pone.0000108 (2006).
- 246 Cao, P. *et al.* Autocrine lysophosphatidic acid signaling activates beta-catenin and promotes lung allograft fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **127**, 1517-1530, doi:10.1172/jci88896 (2017).
- 247 Mouratis, M. A. *et al.* Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *PLoS One* **10**, e0133619, doi:10.1371/journal.pone.0133619 (2015).
- 248 Georas, S. N. *et al.* Lysophosphatidic acid is detectable in human bronchoalveolar lavage fluids at baseline and increased after segmental allergen challenge. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37, 311-322, doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02626.x (2007).

- 249 Ackerman, S. J. *et al.* Polyunsaturated lysophosphatidic acid as a potential asthma biomarker. *Biomarkers in medicine* **10**, 123-135, doi:10.2217/bmm.15.93 (2016).
- 250 Park, G. Y. *et al.* Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* **188**, 928-940, doi:10.1164/rccm.201306-1014OC (2013).
- 251 Udomsinprasert, W. *et al.* Association between Promoter Hypomethylation and Overexpression of Autotaxin with Outcome Parameters in Biliary Atresia. *PLoS One* **12**, e0169306, doi:10.1371/journal.pone.0169306 (2017).
- 252 Erstad, D. J., Tager, A. M., Hoshida, Y. & Fuchs, B. C. The autotaxin-lysophosphatidic acid pathway emerges as a therapeutic target to prevent liver cancer. *Molecular & cellular oncology* **4**, e1311827, doi:10.1080/23723556.2017.1311827 (2017).
- 253 Ikeda, H. & Yatomi, Y. Autotaxin in liver fibrosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **413**, 1817-1821, doi:10.1016/j.cca.2012.07.014 (2012).
- 254 Rachakonda, V. P. *et al.* Serum autotaxin is independently associated with hepatic steatosis in women with severe obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 23, 965-972, doi:10.1002/oby.20960 (2015).
- 255 Wunsch, E. *et al.* Serum Autotaxin is a Marker of the Severity of Liver Injury and Overall Survival in Patients with Cholestatic Liver Diseases. *Scientific reports* 6, 30847, doi:10.1038/srep30847 (2016).
- Farquhar, M. J. *et al.* Autotaxin-lysophosphatidic acid receptor signalling regulates hepatitis
 C virus replication. *Journal of hepatology* 66, 919-929, doi:10.1016/j.jhep.2017.01.009 (2017).
- 257 Fujiwara, N., Friedman, S. L., Goossens, N. & Hoshida, Y. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *Journal of hepatology* 68, 526-549, doi:10.1016/j.jhep.2017.09.016 (2018).
- 258 Wu, T. *et al.* Integrin-mediated cell surface recruitment of autotaxin promotes persistent directional cell migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**, 861-870, doi:10.1096/fj.13-232868 (2014).
- 259 Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-1081, doi:10.1093/carcin/bgp127 (2009).
- 260 Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London, England)* **357**, 539-545, doi:10.1016/s0140-6736(00)04046-0 (2001).
- 261 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 262 Tsujiuchi, T., Araki, M., Hirane, M., Dong, Y. & Fukushima, N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histology and histopathology* 29, 313-321, doi:10.14670/hh-29.313 (2014).

- 263 Benesch, M. G., Ko, Y. M., McMullen, T. P. & Brindley, D. N. Autotaxin in the crosshairs: taking aim at cancer and other inflammatory conditions. *FEBS letters* 588, 2712-2727, doi:10.1016/j.febslet.2014.02.009 (2014).
- 264 Samadi, N. *et al.* Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemoresistance. *Biochimie* **93**, 61-70, doi:10.1016/j.biochi.2010.08.002 (2011).
- 265 Boucharaba, A. *et al.* The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9643-9648, doi:10.1073/pnas.0600979103 (2006).
- 266 Zheng, H., Hogberg, J. & Stenius, U. ATM-activated autotaxin (ATX) propagates inflammation and DNA damage in lung epithelial cells: a new mode of action for silicainduced DNA damage? *Carcinogenesis* **38**, 1196-1206, doi:10.1093/carcin/bgx100 (2017).
- 267 Benesch, M. G. *et al.* Tumor-induced inflammation in mammary adipose tissue stimulates a vicious cycle of autotaxin expression and breast cancer progression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29, 3990-4000, doi:10.1096/fj.15-274480 (2015).
- 268 Benesch, M. G. et al. Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 28, 2655-2666, doi:10.1096/fj.13-248641 (2014).
- 269 Memet, I. *et al.* Autotaxin Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 1-7, doi:10.1080/08941939.2017.1331280 (2017).
- 270 Enooku, K. *et al.* Higher LPA2 and LPA6 mRNA Levels in Hepatocellular Carcinoma Are Associated with Poorer Differentiation, Microvascular Invasion and Earlier Recurrence with Higher Serum Autotaxin Levels. *PLoS One* **11**, e0161825, doi:10.1371/journal.pone.0161825 (2016).
- 271 Lopane, C., Agosti, P., Gigante, I., Sabba, C. & Mazzocca, A. Implications of the lysophosphatidic acid signaling axis in liver cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1868**, 277-282, doi:10.1016/j.bbcan.2017.06.002 (2017).
- 272 Nakagawa, S. *et al.* Molecular Liver Cancer Prevention in Cirrhosis by Organ Transcriptome Analysis and Lysophosphatidic Acid Pathway Inhibition. *Cancer cell* **30**, 879-890, doi:10.1016/j.ccell.2016.11.004 (2016).
- 273 Nakai, Y. *et al.* Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clinical biochemistry* **44**, 576-581, doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.03.128 (2011).
- 274 Emoto, S. *et al.* Analysis of glycero-lysophospholipids in gastric cancerous ascites. *J Lipid Res* **58**, 763-771, doi:10.1194/jlr.P072090 (2017).
- 275 Fukushima, K. *et al.* Lysophosphatidic acid signaling via LPA1 and LPA3 regulates cellular functions during tumor progression in pancreatic cancer cells. *Experimental cell research* 352, 139-145, doi:10.1016/j.yexcr.2017.02.007 (2017).

- 276 Seo, E. J. *et al.* Autotaxin Regulates Maintenance of Ovarian Cancer Stem Cells through Lysophosphatidic Acid-Mediated Autocrine Mechanism. **34**, 551-564, doi:10.1002/stem.2279 (2016).
- 277 Yu, X., Zhang, Y. & Chen, H. LPA receptor 1 mediates LPA-induced ovarian cancer metastasis: an in vitro and in vivo study. *BMC cancer* 16, 846, doi:10.1186/s12885-016-2865-1 (2016).
- 278 Wasniewski, T. *et al.* The significance of the altered expression of lysophosphatidic acid receptors, autotaxin and phospholipase A2 as the potential biomarkers in type 1 endometrial cancer biology. *Oncology reports* **34**, 2760-2767, doi:10.3892/or.2015.4216 (2015).
- 279 Tang, X. *et al.* Lipid phosphate phosphatase-1 expression in cancer cells attenuates tumor growth and metastasis in mice. *J Lipid Res* **55**, 2389-2400, doi:10.1194/jlr.M053462 (2014).
- 280 Mao, X. Y. *et al.* Genome-wide screen identifies a novel prognostic signature for breast cancer survival. *Oncotarget* **8**, 14003-14016, doi:10.18632/oncotarget.14776 (2017).
- 281 Nikolaou, A., Kokotou, M. G., Limnios, D., Psarra, A. & Kokotos, G. Autotaxin inhibitors: a patent review (2012-2016). *Expert opinion on therapeutic patents* 27, 815-829, doi:10.1080/13543776.2017.1323331 (2017).
- Shah, P. *et al.* Discovery of potent inhibitors of the lysophospholipase autotaxin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26, 5403-5410, doi:10.1016/j.bmcl.2016.10.036 (2016).
- Matralis, A. N., Afantitis, A. & Aidinis, V. Development and therapeutic potential of autotaxin small molecule inhibitors: From bench to advanced clinical trials. *Medicinal research reviews* 39, 976-1013, doi:10.1002/med.21551 (2019).
- Barbayianni, E., Magrioti, V., Moutevelis-Minakakis, P. & Kokotos, G. Autotaxin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 23, 1123-1132. doi: 1110.1517/13543776.13542013.13796364. Epub 13542013 May 13543776. (2013).
- Albers, H. M. & Ovaa, H. Chemical evolution of autotaxin inhibitors. *Chem Rev.* 112, 2593-2603. doi: 2510.1021/cr2003213. Epub 2002012 Feb 2003215. (2012).
- 286 Castagna, D., Budd, D. C., Macdonald, S. J., Jamieson, C. & Watson, A. J. Development of Autotaxin Inhibitors: An Overview of the Patent and Primary Literature. *Journal of medicinal chemistry* 59, 5604-5621, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01599 (2016).
- 287 Im, D.-S.
- 288 Im, D.-S. Translational research on autotaxin-LPA-LPA receptors and drug discovery. *Clinical Lipidology* **10**, 177-190, doi:10.2217/clp.15.4 (2015).
- 289 Llona-Minguez, S., Ghassemian, A. & Helleday, T. Lysophosphatidic acid receptor (LPAR) modulators: The current pharmacological toolbox. *Progress in lipid research* 58, 51-75, doi:10.1016/j.plipres.2015.01.004 (2015).
- 290 Norman, D. D. *et al.* Autotaxin inhibition: development and application of computational tools to identify site-selective lead compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21, 5548-5560, doi:10.1016/j.bmc.2013.05.061 (2013).

- 291 Fells, J. I. *et al.* Hits of a high-throughput screen identify the hydrophobic pocket of autotaxin/lysophospholipase D as an inhibitory surface. *Molecular pharmacology* **84**, 415-424, doi:10.1124/mol.113.087080 (2013).
- 292 Kawaguchi, M. *et al.* Screening and X-ray crystal structure-based optimization of autotaxin (ENPP2) inhibitors, using a newly developed fluorescence probe. ACS chemical biology 8, 1713-1721, doi:10.1021/cb400150c (2013).
- 293 Gierse, J. *et al.* A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 334, 310-317, doi:10.1124/jpet.110.165845 (2010).
- 294 Keune, W. J. *et al.* Steroid binding to Autotaxin links bile salts and lysophosphatidic acid signalling. *Nature communications* **7**, 11248, doi:10.1038/ncomms11248 (2016).
- 295 Castelino, F. V. *et al.* An Autotaxin/Lysophosphatidic Acid/Interleukin-6 Amplification Loop Drives Scleroderma Fibrosis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68, 2964-2974, doi:10.1002/art.39797 (2016).
- 296 Bain, G. et al. Selective Inhibition of Autotaxin Is Efficacious in Mouse Models of Liver Fibrosis. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 360, 1-13, doi:10.1124/jpet.116.237156 (2017).
- 297 Ninou, I. *et al.* Pharmacologic targeting of the ATX/LPA axis attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 52, 32-40, doi:10.1016/j.pupt.2018.08.003 (2018).
- 298 Thirunavukkarasu, K. *et al.* Identification and pharmacological characterization of a novel inhibitor of autotaxin in rodent models of joint pain. *Osteoarthritis and cartilage* **25**, 935-942, doi:10.1016/j.joca.2016.09.006 (2017).
- 299 Thirunavukkarasu, K. et al. Pharmacological Characterization of a Potent Inhibitor of Autotaxin in Animal Models of Inflammatory Bowel Disease and Multiple Sclerosis. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 359, 207-214, doi:10.1124/jpet.116.234013 (2016).
- 300 Banerjee, S. et al. Highly Potent Non-Carboxylic Acid Autotaxin Inhibitors Reduce Melanoma Metastasis and Chemotherapeutic Resistance of Breast Cancer Stem Cells. 60, 1309-1324, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01270 (2017).
- 301 Venkatraman, G. et al. Lysophosphatidate signaling stabilizes Nrf2 and increases the expression of genes involved in drug resistance and oxidative stress responses: implications for cancer treatment. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 29, 772-785, doi:10.1096/fj.14-262659 (2015).
- 302 Brindley, D. N., Lin, F. T. & Tigyi, G. J. Role of the autotaxin-lysophosphatidate axis in cancer resistance to chemotherapy and radiotherapy. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 74-85, doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.015 (2013).
- 303 Bekele, R. T. *et al.* Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. *Scientific reports* 6, 21164, doi:10.1038/srep21164 (2016).

- 304 Balogh, A. *et al.* The autotaxin-LPA2 GPCR axis is modulated by gamma-irradiation and facilitates DNA damage repair. *Cellular signalling* 27, 1751-1762, doi:10.1016/j.cellsig.2015.05.015 (2015).
- 305 Jayakumar, S., Pal, D. & Sandur, S. K. Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutation research* 779, 33-45, doi:10.1016/j.mrfmmm.2015.06.007 (2015).
- 306 Gkretsi, V., Zacharia, L. C. & Stylianopoulos, T. Targeting Inflammation to Improve Tumor Drug Delivery. *Trends in cancer* 3, 621-630, doi:10.1016/j.trecan.2017.07.006 (2017).
- 307 Meng, G. *et al.* Implications for breast cancer treatment from increased autotaxin production in adipose tissue after radiotherapy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **31**, 4064-4077, doi:10.1096/fj.201700159R (2017).
- 308 Gan, L. *et al.* Blockade of lysophosphatidic acid receptors LPAR1/3 ameliorates lung fibrosis induced by irradiation. *Biochemical and biophysical research communications* **409**, 7-13, doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.084 (2011).
- 309 Rancoule, C. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) as a pro-fibrotic and pro-oncogenic factor: a pivotal target to improve the radiotherapy therapeutic index. *Oncotarget* 8, 43543-43554, doi:10.18632/oncotarget.16672 (2017).
- 310 Sanofi. Proof of Biological Activity of SAR100842 in Systemic Sclerosis. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01651143 (2014).
- 311 Castelino, F. V. *et al.* Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma. *Arthritis and rheumatism* **63**, 1405-1415, doi:10.1002/art.30262 (2011).
- 312 Swaney, J. S. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **336**, 693-700, doi:10.1124/jpet.110.175901 (2011).
- 313 Orosa, B. *et al.* Lysophosphatidic acid receptor inhibition as a new multipronged treatment for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **73**, 298-305, doi:10.1136/annrheumdis-2012-202832 (2014).
- 314 Yung, Y. C. *et al.* Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Science translational medicine* **3**, 99ra87, doi:10.1126/scitranslmed.3002095 (2011).
- 315 Nogueira, E. S. & Vales, R. L. Methods for treating spinal cord injury with lpa receptor antagonists. *International patent: WO/2013/070879 A1. Bristol-Myers Squibb, International.* , Access Date: 2014/2009/2015 (2013).
- 316 Hama, K. *et al.* Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *The Journal of biological chemistry* 279, 17634-17639, doi:10.1074/jbc.M313927200 (2004).
- Schleicher, S. M. *et al.* Autotaxin and LPA receptors represent potential molecular targets for the radiosensitization of murine glioma through effects on tumor vasculature. *PLoS One* 6, e22182, doi:10.1371/journal.pone.0022182 (2011).

- 318 Liao, Y. *et al.* Lysophosphatidic acid stimulates activation of focal adhesion kinase and paxillin and promotes cell motility, via LPA1-3, in human pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences* **58**, 3524-3533, doi:10.1007/s10620-013-2878-4 (2013).
- 319 Su, S. C. *et al.* Autotaxin-lysophosphatidic acid signaling axis mediates tumorigenesis and development of acquired resistance to sunitinib in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 6461-6472, doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-1284 (2013).
- 320 Beck, H. P. et al. Discovery of potent LPA2 (EDG4) antagonists as potential anticancer agents. Bioorganic & medicinal chemistry letters 18, 1037-1041, doi:10.1016/j.bmcl.2007.12.024 (2008).
- 321 Bhave, S. R. *et al.* Autotaxin Inhibition with PF-8380 Enhances the Radiosensitivity of Human and Murine Glioblastoma Cell Lines. *Frontiers in oncology* 3, 236, doi:10.3389/fonc.2013.00236 (2013).
- 322 St-Coeur, P. D., Ferguson, D., Morin, P., Jr. & Touaibia, M. PF-8380 and closely related analogs: synthesis and structure-activity relationship towards autotaxin inhibition and glioma cell viability. *Archiv der Pharmazie* **346**, 91-97, doi:10.1002/ardp.201200395 (2013).
- 323 Zhang, H. *et al.* Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo. *Cancer research* 69, 5441-5449, doi:10.1158/0008-5472.can-09-0302 (2009).
- 324 Komachi, M. *et al.* Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. *Cancer science* **103**, 1099-1104, doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02246.x (2012).
- 325 Benesch, M. G. K., Yang, Z., Tang, X., Meng, G. & Brindley, D. N. Lysophosphatidate Signaling: The Tumor Microenvironment's New Nemesis. *Trends in cancer* 3, 748-752, doi:10.1016/j.trecan.2017.09.004 (2017).
- 326 Kihara, Y., Mizuno, H. & Chun, J. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Experimental cell research* **333**, 171-177, doi:10.1016/j.yexcr.2014.11.020 (2015).
- 327 Crack, P. J. *et al.* Anti-lysophosphatidic acid antibodies improve traumatic brain injury outcomes. *Journal of neuroinflammation* **11**, 37, doi:10.1186/1742-2094-11-37 (2014).
- Chen, P., Stanojcic, M. & Jeschke, M. G. Differences between murine and human sepsis.
 The Surgical clinics of North America 94, 1135-1149, doi:10.1016/j.suc.2014.08.001 (2014).
- 329 Stortz, J. A. *et al.* Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR journal* **58**, 90-105, doi:10.1093/ilar/ilx007 (2017).
- 330 Obonyo, N. G., Schlapbach, L. J. & Fraser, J. F. Sepsis: Changing Definitions, Unchanging Treatment. *Frontiers in pediatrics* 6, 425, doi:10.3389/fped.2018.00425 (2018).
- 331 Laszlo, I., Trasy, D., Molnar, Z. & Fazakas, J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. *Journal of immunology research* 2015, 510436, doi:10.1155/2015/510436 (2015).

- 332 Gentile, L. F. *et al.* Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *The journal of trauma and acute care surgery* 72, 1491-1501, doi:10.1097/TA.0b013e318256e000 (2012).
- 333 Yamamoto, N., Nakamura, K. & Kanemitsu, K. Sepsis and Inflammasome. SMGroup (<u>www.smgebooks.com</u>) (2016).
- 334 Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644-1655 (1992).
- 335 Bullock, B. & Benham, M. D. in StatPearls (StatPearls Publishing

StatPearls Publishing LLC., 2018).

- 336 Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **315**, 801-810, doi:10.1001/jama.2016.0287 (2016).
- 337 Pop-Began, V., Paunescu, V., Grigorean, V., Pop-Began, D. & Popescu, C. Molecular mechanisms in the pathogenesis of sepsis. *Journal of medicine and life* **7 Spec No. 2**, 38-41 (2014).
- 338 Vincent, J. L. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive care medicine* 22, 707-710 (1996).
- 339 Vincent, J. L. *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Critical care medicine* **26**, 1793-1800 (1998).
- 340 Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Validation of the new Sepsis-3 definitions: proposal for improvement in early risk identification. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23, 104-109, doi:10.1016/j.cmi.2016.11.003 (2017).
- Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* **420**, 885-891. (2002).
- 342 Rittirsch, D., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature reviews. Immunology* 8, 776-787, doi:10.1038/nri2402 (2008).
- 343 Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. Seminars in immunopathology **39**, 517-528, doi:10.1007/s00281-017-0639-8 (2017).
- 344 Dunkelberger, J. R. & Song, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research* **20**, 34-50, doi:10.1038/cr.2009.139 (2010).
- Kumar, V. Inflammasomes: Pandora's box for sepsis. *Journal of inflammation research* 11, 477-502, doi:10.2147/jir.s178084 (2018).

- 346 Halbgebauer, R., Schmidt, C. Q., Karsten, C. M., Ignatius, A. & Huber-Lang, M. Janus face of complement-driven neutrophil activation during sepsis. *Seminars in immunology* **37**, 12-20, doi:10.1016/j.smim.2018.02.004 (2018).
- 347 Chousterman, B. G. & Arnaud, M. Is There a Role for Hematopoietic Growth Factors During Sepsis? *Frontiers in immunology* **9**, 1015, doi:10.3389/fimmu.2018.01015 (2018).
- 348 Cinel, I. & Opal, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Critical care medicine* 37, 291-304, doi:10.1097/CCM.0b013e31819267fb (2009).
- Zanoni, I. *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 147, 868-880, doi:10.1016/j.cell.2011.09.051 (2011).
- Liu, J. & Cao, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular & molecular immunology* **13**, 711-721, doi:10.1038/cmi.2016.58 (2016).
- 351 Lipinska-Gediga, M. Neutrophils, NETs, NETosis old or new factors in sepsis and septic shock? Anaesthesiology intensive therapy 49, 235-240, doi:10.5603/ait.2017.0041 (2017).
- Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.*348, 138-150. (2003).
- 353 Sen, A. & Yende, S. Towards personalized medicine in sepsis: Quest for Shangri-La? *Critical care (London, England)* **17**, 303, doi:10.1186/cc12485 (2013).
- 354 Pool, R., Gomez, H. & Kellum, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Critical care clinics* 34, 63-80, doi:10.1016/j.ccc.2017.08.003 (2018).
- 355 van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P. & Netea, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature reviews. Immunology* 17, 407-420, doi:10.1038/nri.2017.36 (2017).
- 356 Alves-Filho, J. C. *et al.* Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nature medicine* **16**, 708-712, doi:10.1038/nm.2156 (2010).
- 357 Pearson, T., Greiner, D. L. & Shultz, L. D. Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Current protocols in immunology* Chapter 15, Unit 15.21, doi:10.1002/0471142735.im1521s81 (2008).
- 358 Malaney, P., Nicosia, S. V. & Dave, V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer letters* 344, 1-12, doi:10.1016/j.canlet.2013.10.010 (2014).
- 359 Buras, J. A., Holzmann, B. & Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 854-865, doi:10.1038/nrd1854 (2005).
- 360 Sudhir, V. Laboratory Animal Models to Mimic Human Sepsis: A Review. Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences 4, 34-39 (2016).
- 361 Lewis, A. J., Seymour, C. W. & Rosengart, M. R. Current Murine Models of Sepsis. Surgical infections 17, 385-393, doi:10.1089/sur.2016.021 (2016).
- 362 van der Poll, T. Preclinical sepsis models. *Surgical infections* **13**, 287-292, doi:10.1089/sur.2012.105 (2012).

- 363 Warren, H. S. *et al.* Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *The Journal of infectious diseases* **201**, 223-232, doi:10.1086/649557 (2010).
- 364 Rittirsch, D. *et al.* Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 7664-7672 (2008).
- 365 Cross, A. S., Opal, S. M., Sadoff, J. C. & Gemski, P. Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infection and immunity* 61, 2741-2747 (1993).
- 366 Kumar, A. *et al.* The duration of hypotension before the initiation of antibiotic treatment is a critical determinant of survival in a murine model of Escherichia coli septic shock: association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. *The Journal of infectious diseases* **193**, 251-258, doi:10.1086/498909 (2006).
- 367 Shapira, L., Barak, V., Soskolne, W. A., Halabi, A. & Stabholz, A. Effects of tetracyclines on the pathologic activity of endotoxin: in vitro and in vivo studies. *Advances in dental research* 12, 119-122, doi:10.1177/08959374980120010401 (1998).
- 368 Gentile, L. F. *et al.* Host responses to sepsis vary in different low-lethality murine models. *PLoS One* **9**, e94404, doi:10.1371/journal.pone.0094404 (2014).
- Wynn, J. L. *et al.* Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. *Shock (Augusta, Ga.)* 28, 675-683, doi:10.1097/SHK.0b013e3180556d09 (2007).
- Iskander, K. N. *et al.* Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury. *Crit Care Med.* 41, 159-170. doi: 110.1097/CCM.1090b1013e3182676322. (2013).
- 371 Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology* **19**, 198-208, doi:10.1016/j.tim.2011.01.001 (2011).
- 372 Shelley, O., Murphy, T., Paterson, H., Mannick, J. A. & Lederer, J. A. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock (Augusta, Ga.)* 20, 123-129, doi:10.1097/01.shk.0000079426.52617.00 (2003).
- 373 Nacionales, D. C. *et al.* Aged mice are unable to mount an effective myeloid response to sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **192**, 612-622, doi:10.4049/jimmunol.1302109 (2014).
- 374 Remick, D. G., Newcomb, D. E., Bolgos, G. L. & Call, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga.)* **13**, 110-116 (2000).
- Hubbard, W. J. *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga.)* 24 Suppl 1, 52-57 (2005).

- 376 Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N. & Sannomiya, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock (Augusta, Ga.)* **30 Suppl 1**, 53-59, doi:10.1097/SHK.0b013e318181a343 (2008).
- 377 Herrmann, I. K. *et al.* Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture. *Anesthesiology* **119**, 901-906, doi:10.1097/ALN.0b013e3182a2a38c (2013).
- 378 Zantl, N. *et al.* Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infection and immunity* 66, 2300-2309 (1998).
- 379 Rittirsch, D., Hoesel, L. M. & Ward, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of leukocyte biology* 81, 137-143, doi:10.1189/jlb.0806542 (2007).
- 380 Fink, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence* **5**, 143-153, doi:10.4161/viru.26083 (2014).
- 381 Efron, P. A., Mohr, A. M., Moore, F. A. & Moldawer, L. L. The future of murine sepsis and trauma research models. *Journal of leukocyte biology* 98, 945-952, doi:10.1189/jlb.5MR0315-127R (2015).
- 382 Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E. & al., e. Mouse, Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562 (2002).
- 383 Sellers, R. S., Clifford, C. B., Treuting, P. M. & Brayton, C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary pathology* **49**, 32-43, doi:10.1177/0300985811429314 (2012).
- 384 Beura, L. K. *et al.* Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* **532**, 512-516, doi:10.1038/nature17655 (2016).
- 385 Osuchowski, M. F. *et al.* Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. *Intensive care medicine experimental* 6, 26, doi:10.1186/s40635-018-0189-y (2018).
- 386 Drobnik, W. *et al.* Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res* 44, 754-761, doi:10.1194/jlr.M200401-JLR200 (2003).
- 387 Park, D. W. et al. Impact of serial measurements of lysophosphatidylcholine on 28-day mortality prediction in patients admitted to the intensive care unit with severe sepsis or septic shock. Journal of critical care 29, 882.e885-811, doi:10.1016/j.jcrc.2014.05.003 (2014).
- 388 Cho, W. H. *et al.* Clinical significance of enzymatic lysophosphatidylcholine (LPC) assay data in patients with sepsis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **31**, 1805-1810, doi:10.1007/s10096-011-1505-6 (2012).
- 389 Yan, J. J. et al. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. Nature medicine 10, 161-167, doi:10.1038/nm989 (2004).

- 390 Chen, G. *et al.* Suppression of HMGB1 release by stearoyl lysophosphatidylcholine:an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 46, 623-627, doi:10.1194/jlr.C400018-JLR200 (2005).
- 391 Fan, H. *et al.* Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 14, 422-428, doi:10.2119/2007-00106.Fan (2008).
- 392 Sharma, N., Akhade, A. S. & Qadri, A. Sphingosine-1-phosphate suppresses TLR-induced CXCL8 secretion from human T cells. *Journal of leukocyte biology* **93**, 521-528, doi:10.1189/jlb.0712328 (2013).
- 393 Engber, D. The Trouble With Black-6: A tiny alcoholic takes over the lab. *Slate.com* (2011).
- 394 Economides, A. N. et al. Conditionals by inversion provide a universal method for the generation of conditional alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E3179-3188, doi:10.1073/pnas.1217812110 (2013).
- 395 Higashi, A. Y. et al. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 182, 5633-5640, doi:10.4049/jimmunol.0802413 (2009).
- 396 Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nature genetics 21, 70-71, doi:10.1038/5007 (1999).
- 397 Hayashi, S. & McMahon, A. P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifeninducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental biology* 244, 305-318, doi:10.1006/dbio.2002.0597 (2002).
- 398 Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research* 23, 5080-5081, doi:10.1093/nar/23.24.5080 (1995).
- 399 Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. & Chambon, P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications* 237, 752-757, doi:10.1006/bbrc.1997.7124 (1997).
- 400 Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Springs Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- 401 Alberts, B. *et al.* Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
 (2000).
- 402 Mahmood, T. & Yang, P. C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* **4**, 429-434, doi:10.4103/1947-2714.100998 (2012).
- 403 Gerber, F. *et al.* Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 microm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of chromatography. A* **1036**, 127-133 (2004).
- 404 Χατζηιωάννου, Θ. Π. & Α., Κ. Μ. Ενόργανη Ανάλυση. Αθήνα (2003).
- 405 Pitt, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews* **30**, 19-34 (2009).

- 406 Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**, 497-509 (1957).
- 407 Hameyer, D. *et al.* Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiological genomics* **31**, 32-41, doi:10.1152/physiolgenomics.00019.2007 (2007).
- 408 Seibler, J. *et al.* Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic acids research* **31**, e12, doi:10.1093/nar/gng012 (2003).
- Ventura, A. *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665, doi:10.1038/nature05541 (2007).
- 410 Feil, R. et al. Ligand-activated site-specific recombination in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**, 10887-10890, doi:10.1073/pnas.93.20.10887 (1996).
- 411 Seibler, J. *et al.* Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res.* **31**, e12. (2003).
- 412 Hameyer, D. *et al.* Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics.* **31**, 32-41. Epub 2007 Apr 2024. (2007).
- 413 Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.*21, 70-71. (1999).
- 414 Saulnier-Blache, J. S. [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Medecine* sciences : M/S 20, 799-803, doi:10.1051/medsci/2004208-9799 (2004).
- 415 Yang, I. V. *et al.* A locus on chromosome 9 is associated with differential response of 129S1/SvImJ and FVB/NJ strains of mice to systemic LPS. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 22, 518-529, doi:10.1007/s00335-011-9340-8 (2011).
- 416 Ventura, A. *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature.*445, 661-665. Epub 2007 Jan 2024. (2007).
- 417 Brake, R. L., Simmons, P. J. & Begley, C. G. Cross-contamination with tamoxifen induces transgene expression in non-exposed inducible transgenic mice. *Genet Mol Res.* **3**, 456-462. (2004).
- 418 Lemaigre, F. P. Determining the fate of hepatic cells by lineage tracing: facts and pitfalls. Hepatology (Baltimore, Md.) **61**, 2100-2103, doi:10.1002/hep.27659 (2015).
- 419 Schmidt-Supprian, M. & Rajewsky, K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol.*8, 665-668. (2007).
- 420 Riggs, B. L. & Hartmann, L. C. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *The New England journal of medicine* **348**, 618-629, doi:10.1056/NEJMra022219 (2003).
- 421 Hammad, S. *et al.* Confounding influence of tamoxifen in mouse models of Cre recombinase-induced gene activity or modulation. *Archives of toxicology* **92**, 2549-2561, doi:10.1007/s00204-018-2254-4 (2018).

- 422 Muller, H. J. Further studies on the nature and causes of gene mutations. *Proc. 6th Int. Congr. Genetics* **1**, 213–255 (1932).
- 423 Glanemann, C. *et al.* Disparity between changes in mRNA abundance and enzyme activity in Corynebacterium glutamicum: implications for DNA microarray analysis. *Applied microbiology and biotechnology* **61**, 61-68, doi:10.1007/s00253-002-1191-5 (2003).
- 424 Goiffon, R. J., Martinez, S. C. & Piwnica-Worms, D. A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma. *Nature communications* 6, 6271, doi:10.1038/ncomms7271 (2015).
- 425 Benesch, M. G., Tang, X., Venkatraman, G., Bekele, R. T. & Brindley, D. N. Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis in vivo. *Journal of biomedical research* **30**, 272-284, doi:10.7555/jbr.30.20150058 (2016).
- 426 Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. Biochimica et biophysica acta **1781**, 513-518, doi:10.1016/j.bbalip.2008.06.005 (2008).
- Parrill, A. L. & Tigyi, G. Integrating the puzzle pieces: the current atomistic picture of phospholipid-G protein coupled receptor interactions. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 2-12, doi:10.1016/j.bbalip.2012.09.002 (2013).
- 428 Saga, H. *et al.* A novel highly potent autotaxin/ENPP2 inhibitor produces prolonged decreases in plasma lysophosphatidic acid formation in vivo and regulates urethral tension. *PLoS One* **9**, e93230, doi:10.1371/journal.pone.0093230 (2014).
- 429 Lee, S. C. *et al.* Autotaxin and LPA1 and LPA5 receptors exert disparate functions in tumor cells versus the host tissue microenvironment in melanoma invasion and metastasis. *Molecular cancer research : MCR* **13**, 174-185, doi:10.1158/1541-7786.mcr-14-0263 (2015).
- Ahn, W. G., Jung, J. S., Kwon, H. Y. & Song, D. K. Alteration of Lysophosphatidylcholine-Related Metabolic Parameters in the Plasma of Mice with Experimental Sepsis. *Inflammation* 40, 537-545, doi:10.1007/s10753-016-0500-6 (2017).
- 431 Corriden, R. *et al.* Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nature communications* 6, 8369, doi:10.1038/ncomms9369 (2015).
- Behjati, S. & Frank, M. H. The effects of tamoxifen on immunity. *Current medicinal chemistry* 16, 3076-3080 (2009).
- 433 Jacobs, A. C. *et al.* Adenylate kinase release as a high-throughput-screening-compatible reporter of bacterial lysis for identification of antibacterial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 26-36, doi:10.1128/aac.01640-12 (2013).
- Knowlden, S. & Georas, S. N. The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J Immunol.* 192, 851-857. doi: 810.4049/jimmunol.1302831. (2014).
- 435 Tsalik, E. L. *et al.* An integrated transcriptome and expressed variant analysis of sepsis survival and death. *Genome medicine* **6**, 111, doi:10.1186/s13073-014-0111-5 (2014).

- 436 Wiersinga, W. J., Leopold, S. J., Cranendonk, D. R. & van der Poll, T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* **5**, 36-44, doi:10.4161/viru.25436 (2014).
- 437 Weber, G. F. & Swirski, F. K. Immunopathogenesis of abdominal sepsis. *Langenbeck's archives of surgery* **399**, 1-9, doi:10.1007/s00423-013-1129-7 (2014).

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Citation: Katsifa A, Kaffe E, Nikolaidou-Katsaridou N, Economides AN, Newbigging S, McKerlie C, et al. (2015) The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. PLoS ONE 10(11): e0143083. doi:10.1371/journal.pone.0143083

Editor: Junning Yue, The University of Tennessee Health Science Center, UNITED STATES

Received: July 21, 2015

Accepted: October 31, 2015

Published: November 16, 2015

Copyright: © 2015 Katsifa et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The present work was funded by 1) a National SYNERGASIA 2009 Grant (Project Code 09SYN-11-679), and 2) a National ARISTIA II Grant (Project Code 3311), co-financed by the European Union (European Regional Development Fund and European Social Fund respectively) and National resources through the Operational Programs "Competitiveness and Entrepreneurship" and "Education and Lifelong Learning", respectively, of the National Strategic Reference Framework (NSRF). The funders had no role in study design, data **RESEARCH ARTICLE**

The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life

Aggeliki Katsifa¹, Eleanna Kaffe¹, Nefeli Nikolaidou-Katsaridou¹, Aris N. Economides², Susan Newbigging^{3,4}, Colin McKerlie^{3,4}, Vassilis Aidinis¹*

Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Athens, Greece,
 Genome Engineering Technologies Group and Skeletal Diseases TFA Group, Regeneron
 Pharmaceuticals Inc., Tarrytown, New York, United States of America, 3 Physiology and Experimental
 Medicine Research Program, the Hospital for Sick Children, Center for Phenogenomics, Toronto, Canada,
 Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Canada

* v.aidinis@fleming.gr

Abstract

Autotaxin (ATX, *Enpp2*) is a secreted lysophospholipase D catalysing the production of lysophosphatidic acid, a pleiotropic growth factor-like lysophospholipid. Increased ATX expression has been detected in a number of chronic inflammatory diseases and different types of cancer, while genetic interventions have proven a role for ATX in disease pathogenesis. Therefore, ATX has emerged as a potential drug target and a large number of ATX inhibitors have been developed exhibiting promising therapeutic potential. However, the embryonic lethality of ATX null mice and the ubiquitous expression of ATX and LPA receptors in adult life question the suitability of ATX as a drug target. Here we show that inducible, ubiquitous genetic deletion of ATX in adult mice, as well as long-term potent pharmacologic inhibition, are well tolerated, alleviating potential toxicity concerns of ATX therapeutic targeting.

Introduction

Autotaxin (ATX, *Enpp2*) is a secreted lysophospholipase D [1] widely present in biological fluids including blood [2–4]. ATX is the major enzyme catalysing the production of lysophosphatidic acid (LPA) and ATX heterozygous null mice have half of normal LPA levels [5–7]. LPA is a bioactive, growth factor-like lysophospholipid promoting a large variety of cellular responses in almost all cell types [2, 8], mediated from at least six G-protein coupled LPA receptors (LPARs) that exhibit overlapping specificities and widespread distribution [9, 10].

ATX expression and LPA production were shown to be necessary for embryonic development, as ubiquitous genetic deletion of ATX resulted to vascular and neuronal defects leading to lethality [5–7]. In adult life ATX is widely expressed, and upregulated levels have been reported in various chronic inflammatory diseases and cancer [2, 11, 12]. Conditional genetic deletion of ATX attenuated the development of rheumatoid arthritis and pulmonary fibrosis in mouse models [13, 14], suggesting a primary role in disease pathogenesis [15, 16]. Transgenic



collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. A. Economides is an employee of Regeneron Pharmaceuticals Inc., which provided the R26Cre mouse and paid a salary to author A. Economides, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific role of this author is articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: A. Economides is an employee of Regeneron Pharmaceuticals Inc. who provided the R26Cre mouse. There are no patents, products in development, or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

mammary ATX overexpression resulted in enhanced rates of spontaneous breast cancer development in aged mice, often preceded by chronic inflammation [17]. Therefore, ATX overexpression at chronic inflamed or neoplastic tissues, possibly localized to the cell surface through integrin-binding [18], most likely results to increased local levels of LPA, which in turn exert its pathologic effects at the microenvironment [2].

Consequently, ATX has emerged as a promising therapeutic target in chronic inflammatory diseases and cancer [2] and a large number of ATX inhibitors have been developed [19, 20]. Moreover, the crystal structure of ATX was recently solved [18, 21] enabling rational drug design. In this report we show that inducible, ubiquitous genetic deletion of ATX in adult mice, as well as its potent pharmacologic inhibition, are well tolerated, alleviating potential toxicity concerns of ATX therapeutic targeting.

Materials and Methods

Mice

All mice were bred at the animal facilities of the Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center, under specific pathogen-free conditions. Mice were housed at 20–22°C, 55 ±5% humidity, and a 12-h light-dark cycle; water and food were provided *ad libitum*. Mice were bred and maintained in a C57BL/6 genetic background for more than 10 generations. All experimentation in mice for this project was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming" (#376), as well as the Veterinary service and Fishery Department of the local governmental prefecture (#5365). Age and sex-matched littermate mice were assigned randomly to experimental and control groups. All measures were taken to minimize animal suffering and distress; however, neither anesthetics nor analgesics were used during the protocol, as no invasive or painful techniques were performed. The health status of the mice was monitored once per day and no unexpected deaths were observed. Mice were euthanized at predetermined time-points or when they exhibited a <20% body weight loss. Euthanasia was performed in a CO₂ chamber with gradual filling followed by exsanguination. The generation and genotyping protocols for *Enpp2*^{n/n} [5], R26Cre-ER^{T2} [22, 23], and R26R [24] mice have been described previously.

Tamoxifen treatment

Tamoxifen (Tmx; Sigma T5648, USA) was dissolved in a corn oil/ ethanol (9/1) mixture at 45 mg/ml. Tmx was administered either intraperitoneally (IP; 50–100 mg/kg) or by oral gavage (Per Os, PO; 180 mg/kg), as previously described (Indra, et al., 1999, Hayashi, S. et al., 2002). Control groups received corn oil.

Tissue processing and H&E staining

Fresh mouse tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin overnight at 4°C, processed using a standard overnight protocol, and embedded in paraffin blocks. Sections of 4 μ m were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) according to standard procedures and imaged using a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) attached to a Q Imaging EXI Aqua digital camera, using the Q-Capture Pro 7 software. Images were taken and evaluated blindly.

X-gal staining

Freshly isolated mouse tissues were embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen. Sections of 6 μ m were prepared on a cryotome and fixed in 2% formaldehyde/ 0.2% glutaraldehyde for

10 minutes at 4°C, washed twice in cold PBS /2 mM MgCl₂ for 10 minutes and stained in X-gal staining solution (2 mg/ml X-gal (5-bromo-a-chloro-3-inodyl- β -D-galactopyranoside) in 0.1 M Na phosphate buffer pH 7.3, 0.01% Na deoxycholate, 5 mM K3Fe(CN)6, 5.7 mM K4Fe(CN) 6, 2 mM MgCl₂, 0.02% NP-40) at 37°C in the dark overnight. The sections were rinsed twice in PBS /2 mM MgCl₂ for 10 minutes at room temperature, counterstained with eosin, and visualized under an Eclipse E800 microscope as in the previous section.

ATX activity assay

ATX / LysoPLD activity was measured using the TOOS activity assay. ATX catalyzes the cleavage of lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid and choline. The released choline is oxidised by choline oxidase to produce betaine and hydrogen peroxide. The latter is used as the oxidizing agent. In the presence of horseradish peroxidase, H₂O₂ reacts with TOOS (N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline) and 4-AAP (aminoantipyrene) to form a pink quinoneimine dye which absorbs at 555 nm. 1 x LysoPLD buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 60 µM CoCl₂, 1 mM LPC) was incubated at 37°C for 30 minutes. Plasma samples (100 fold diluted) were incubated with 1 x LysoPLD buffer at 37° C for 4 hours at a final volume of 100 µl in a 96-well plate. At the end of the incubation, a colour mix (0.5 mM 4-AAP, 7.95 U/ml HRP, 0.3 mM TOOS, 2 U/ml choline oxidase in 5 mM MgCl₂/ 50 mM Tris-HCl pH 8.0) was prepared and 100 µl were added to each well. Absorbance (A) was measured at 555 nm every 5 minutes for 20 minutes. For each sample, the absorbance was plotted against time and the slope (dA/min) was calculated for the linear (steady-state) portion of each reaction. ATX activity was calculated according to the following equation: Activity $(U/ml) = (\mu mol/min/ml) = [dA/min (sample)-dA/min (blank)] * Vt/ (e* Vs* 0.5)$ where Vt: total volume of reaction (ml), Vs: volume of sample (ml), e: milimolar extinction coefficient of quinoneimine dye under the assay conditions ($e = 32.8 \mu mol/cm^2$) and 0.5: the moles of quinoneimine dye produced by 1 mol of H_2O_2 .

Western blotting

1 μl of plasma samples were diluted in Laemmli buffer, electrophorised on 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred to Protran nitrocellulose membranes (Whatman plc, Maidstone, Kent, UK) using the Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Primary a-ATX Ab incubation (rat monoclonal 4F1, kindly provided by J. Aoki, 1:1000; rabbit polyclonal Cayman 1:250) was performed overnight in 5% (w/v) non-fat milk in TBS-Tween 0.05% (TBST) at 4°C. The membranes were then washed three times with TBST and incubated with HRP-conjugated secondary Abs (a-rat or a-rabbit respectively; 1:2000) for one hour at room temperature. Membranes were washed three times with TBST and antibody-antigen complexes were revealed using ECL chemiluminescent reagent (Pierce/ Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Antibody specificity has been scrutinized previously [13].

Plasma biochemical and haematological analyses were performed with the Abbott Architect 8200 and Cell-Dyn 3700 analysers respectively.

Real-Time RT-PCR

Total RNA was extracted from the left lung lobe using the Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc, USA) and treated with DNAse (RQ1 RNAse-free DNAse, Promega, Wis, USA) in accordance to the manufacturer's instructions. Reverse transcription to cDNA was performed with 3.5 µg RNA by M-MLV RT (Promega) at a final volume of 20 µl. Real-time PCR was performed on a BioRad CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories

Ltd, CA, USA). Values were normalized to β2-microglobulin (*b2M*). The primer sequences, designated as f for forward and r for reverse, as well as the product sizes (in bp) were as follows: *Enpp2* (f, 5'-GATGCATTCCTTGTAACCAACA-3', r, 5'- TCATCCTCAATGT CACGTAAGC-3', 173bp), *B2M* (f, 5'-TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA-3', r, 5'-CAG TATGTTCCGGCTTCCCATTC-3', 104bp). The annealing temperature for all primers was 58°C.

HPLC-MS/MS

PF8380, LPA (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C20:4), LPI (C16:0, C18:0), LPG (C16:0, C18:0), LPE (C16:0, C18:0), LPS (C16:0, C18:0) and LPC species (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C24:0) were determined in plasma by HPLC-ESI/ MS/ MS using an RSLCnano system (Ultimate 3000 Series, Dionex Corporation, USA) coupled with an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Plasma samples (50 µl) were mixed with 950 µl PBS and spiked with the internal standard mix (17:0 LPA/ LPC/ LPS/ LPG/ LPE). Neutral extraction was performed twice with 4 ml ice-cold CHCl₃/ CH₃OH (2/1, v/v) followed by 2 ml PBS saturated ice-cold CHCl₃/ CH₃OH (2/1, v/v). Each step of extraction was followed by a 1 minute vortex and a 1 minute centrifugation at 4°C at 3,000 rpm. The lower chloroform organic phases from both neutral extraction steps were pooled together and reserved for the LPC and PF8380 measurements. The remaining aqueous phase was chilled on ice for 10 minutes, acidified to pH 3 with acetic acid and undergone a 2 step extraction with ice-cold CHCl₃/ CH₃OH (2/1, v/v), as above. The lower organic phases were pooled and kept for LPA, LPS, LPG, LPI and LPE determination. The neutrally extracted organic phase and the neutralized acidified lower organic phase were evaporated to dryness. The residues were re-suspended in 0.15 ml isopropanol for HPLC-ESI/ MS/MS analysis. Obtained recoveries were 90% for PF8380, 60-85% for LPA species and 80-100% for LPC, LPS, LPG, LPI and LPE. The HPLC-MS/MS was performed as previously described [25].

Mouse pharmacokinetics and in vivo inhibition of ATX activity

PF8380 was administered by oral gavage (120 mg/kg) dissolved in vehicle (Hydroxypropyl Cellulose 2% / Tween 80 0.1%) to 8 week old mice. Control mice received only the vehicle. Venus blood was collected at time points up to 12 hours post administration, in tubes containing EDTA at a final concentration of 50 mM. For plasma preparation, whole blood was centrifuged at 2000 g for 20 minutes at 4°C and the supernatant was stored in siliconized tubes at -20°C. Plasma samples were examined for ATX activity and PF8380/ LPA levels using the TOOS activity assay and HPLC- MS/MS, respectively.

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SEMs. Statistical analysis was performed using SigmaPlot 11.0 (Systat software Inc., IL, USA). The statistical significance was estimated in pair-wise comparisons with control values using a paired Student's *t*-test, or a Mann-Whitney test in cases of not normal distributions. Survival curves were calculated using Kaplan-Meier survival analysis; the statistical significance of curves was assessed using Logrank test. P values <0.05 (*), p<0.01 (**) and p<0.001 (***) were considered significant. The number of samples (n) and the number of experiments/repetitions (exp) are indicated in each figure legend.

Results and Discussion

Inducible ubiquitous inactivation of ATX in adult mice

An inducible strategy to inactivate ATX in adult mice was used. R26Cre-ER^{T2} mice (line 2151), generated by Regeneron Pharmaceuticals [22, 23], carry a Cre recombinase-Oestrogen receptor-T2 (Cre-ER^{T2}) allele targeted to the ubiquitously expressed ROSA26 (R26) locus (S1A Fig), as in previous efforts [26–28]. The ER^{T2} moiety retains the Cre recombinase in the cytoplasm until tamoxifen (Tmx; a synthetic oestrogen antagonist) administration releases this inhibition, thus permitting the nuclear translocation of Cre and the recombination of genomic loxP sites [29].

In order to confirm efficiency and tissue specificity of Tmx-induced Cre-mediated recombination, R26Cre-ER^{T2} mice were crossed with mice carrying a Cre-responsive b-galactosidase (*LacZ*) reporter allele [24]. In this reporter strain (R26R), a *lacZ* transgene has been introduced into the R26 locus, preceded by a floxed neo expression cassette preventing *lacZ* expression. Upon Cre recombinase activation, this "stop" neo cassette is removed and *lacZ* expression can be detected using X-gal staining [24]. Intraperitoneal (IP) injections of Tmx (100 mg/kg per day for 10 days) in R26Cre-ER^{T2}/R26R mice resulted in varying degrees of X-gal staining in almost all tissues examined (S1B Fig), as previously reported for similar strains of mice [26– 28], suggesting efficient and widespread Tmx-induced, Cre-mediated gene targeting. Moreover, no X-gal staining was detected in the absence of Tmx or the R26Cre-ER^{T2} allele (S1B Fig), indicating stringent control of gene expression.

For the inducible inactivation of ATX in mice *in vivo*, $Enpp2^{n/n}$ mice [5] were crossed with the R26Cre-ER^{T2} mice yielding R26Cre-ER^{T2}/ $Enpp2^{n/n}$ mice, which received different concentrations of Tmx via different routes of administration. Administration of 50 mg/kg Tmx IP per day for 10 days was not sufficient to induce recombination (S1 Table) and had no effect in overall mouse survival rate (Fig 1A). Increasing the Tmx dose to 100 mg/kg (IP; per day for 10 days) resulted in accurate recombination of the Enpp2 allele, which could only be detected in the presence of the R26Cre-ER^{T2} allele (S1 Table). R26Cre-ER^{T2}-mediated recombination was also detected in littermate R26Cre-ER^{T2}/ $Enpp2^{n/n}$ mice not receiving Tmx but housed in the same cages (see below and S1 Table) [30]. As genomic PCR is not a quantitative assay, the results from the reporter mice (S1 Fig) suggest minimal levels of leaky recombination.

No statistically significant effect in the overall survival rate of mice was observed (Fig 1B). Comparative histopathology of 44 tissues from R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} mice 2 days post Tmx administration (100 mg/kg IP per day for 10 days) at the onset of the limited observed lethality did not identify any significant findings after deletion of ATX, with the exception of lung and gastrointestinal (GI) tract which had mild to moderate inflammatory changes (S2 Table and S2 Fig) and which were followed through the entire study. However, similar histopathological changes were also observed in all control groups receiving Tmx (S2 Table and S2 Fig), while observed pathologies did not persist 20 days post Tmx administration (S3A Fig), indicating that the observed transient pathologies in the lungs and GI tract were due to Tmx administration and not ATX ablation. To lower Tmx-induced toxicity experiments were repeated using 5 days of IP injections of 100 mg/kg Tmx with similar results. *Enpp2* recombination was readily detected (S1 Table), with no statistically significant effects in mice survival rates in comparison to control mice (Fig 1C) and exhibiting no histopathological changes in lung and GI tract 10 and 20 days post Tmx treatment (S3B Fig).

The majority of ATX activity is not necessary for adult life

To confirm results utilizing a different and more widely used route of administration, Tmx (180 mg/kg) was administered to R26Cre- $\text{ER}^{\text{T2}}/Enpp2^{n/n}$ and control littermate mice with oral



Fig 1. No effect of **Tmx-induced genetic inactivation of ATX in mouse survival rate.** Kaplan–Meier survival curves of R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} and control mice administered with different Tmx concentrations (50, 100 and 180 mg/kg) using two different routes of delivery (IP, PO), as indicated and as described in the text. Presented results are cumulative from 1 (A), 3 (B) and 4 (C and D) experiments. No statistical significant differences were observed, as assessed with the Logrank test. Overlapping curves are indicated by consecutive symbols.

doi:10.1371/journal.pone.0143083.g001

gavage (Per Os; PO) for 4 days, followed by a 3-day arrest and Tmx administration was continued for 2 more days (Fig 1D). Similar to the other dosing regimens reported here, Tmxinduced recombination in all tissues could be detected only in the presence of the R26Cre-ER^{T2} allele, while its minimal leakiness could be avoided with individually housing mice (S1 Table). No statistically significant effect in the overall survival rate of Tmx-administered R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} mice was observed in comparison to littermate Tmx-administered R26Cre-ER^{T2} mice, suggesting that the majority of ATX expression is dispensable for adult life and that the observed lethality could be attributed to Tmx- and Cre- mediated toxicity as previously reported [31]. No histopathological changes were detected in the lungs and GI tract of all experimental and control mice 18 and 30 days post treatment (S4 Fig). Moreover, no deleterious changes indicative of liver, kidney, or pancreatic function were identified in clinical biochemistry analytes from Tmx-administered R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} mice (S5 Fig). Likewise, no differences were detected in blood cell populations (S6 Fig). Therefore, ATX ablation appears to have no major effects in tissue homeostasis and the hematopoietic system.

Based on limited published expression studies, ATX is thought to be widely expressed in adult mice, with the highest mRNA levels reported in brain, ovary/testis, intestine, kidney, and lung [2]. Moreover, ATX has been reported to be secreted from adipocytes [32, 33], while adipose specific genetic deletion of ATX resulted in marked decreases of serum LPA [34], suggesting the adipose tissue as a major contributor to serum ATX. Real Time RT-PCR analysis of ATX mRNA expression confirmed the brain and adipose (gonadal white adipose tissue, WAT; brown adipose tissue, BAT) tissues as the highest ATX expression tissues in wt C57BL/6 mice (Fig 2A), in general agreement with on line expression data repositories (http://biogps.org/ #goto = genereport&id=18606, http://www.gtexportal.org/home/gene/ENPP2). Tmx-induced, R26Cre-ER^{T2}-mediated *Enpp2* recombination resulted in >80% attenuation of ATX mRNA levels in all organs examined including brain and adipose tissue (Fig 2B), as quantified with Real-Time RT-PCR. As a consequence, ATX protein was barely detectable in the plasma of Tmx-administered R26Cre- $ER^{T2}/Enpp2^{n/n}$ mice (Fig 2C and S7 Fig), resulting to an 80% decrease of plasma ATX activity levels (Fig 2D), as quantified with the TOOS assay on natural LPC substrates. ATX activity levels were followed by a similar decrease in LPA levels (Fig 2E) despite the unaffected levels of possible ATX substrates (Fig 2F), as quantified by HPLC-MS/MS.

A 50% reduction in plasma ATX (and LPA) levels in heterozygous ATX KO mice was previously reported to result in no overt phenotype [5-7]. Our results extend these observations proving that even an 80% reduction in ATX activity and LPA levels in adult mice has no effect on tissue histopathology and overall survival. However, we cannot exclude the possibility that residual total LPA may still be enough to maintain normal body functions, although the reported LPA concentration thresholds to observe any effect in any cell type in vitro is much higher $(>>1 \,\mu\text{M}$ up to $10 \,\mu\text{M})$ [2]. In fact, most reported effects of LPA *in vitro* were observed at non-physiological concentrations corresponding to pathophysiological situations of increased local concentrations of LPA at inflamed/malignant sites, most likely as a result of increased expression of ATX. Moreover, it should be noted that cellular effects of LPA will depend not only on its local concentration (controlled by the relative levels of both ATX and LPPs), but as well as on the local cell-specific abundance of LPA receptors and their suggested transactivation by other factors [35] or the local concentration of interacting proteins that have been reported to modulate its biological effects [36]. Additionally and depending on the concentration, LPA may also elicit cellular responses not only through specific binding to cognate receptors, but as well as through the activation of nuclear receptors [37], through the modulation of macromolecular signalling complexes via direct docking to proteins or the metabolic rewiring of cell metabolism [38].

Potent pharmacological ATX inhibition exhibits no toxic effects

Upregulated expression of ATX has been detected in a number of chronic inflammatory diseases and cancer, while genetic interventions have proven a role of ATX in disease pathogenesis; establishing ATX as a promising potential therapeutic target [2]. However, the embryonic lethality of ATX knockout mice poses a concern for the suitability of ATX as a drug target.

Inducible, ubiquitous genetic deletion of ATX indicated that the majority of ATX expression is dispensable for adult life, suggesting potential safety of pharmaceutical targeting. To validate the conclusion, mice were treated with the potent ATX inhibitor 6-(3-(piperazin-1-yl)propanoyl)-benzo[d]oxazol-2(3H)-one (PF8380)[39]. PF8380 is small molecule with a long linear and flexible structure, good oral bioavailability, and a reported IC50 of 1.7 nM on natural LPC substrates [39]. Oral administration of 30 mg/kg PF8380 reduced inflammatory hyperalgesia in a rat air pouch model, exhibiting >95% reduction of LPA levels in both plasma and

ATX Is a Safe Therapeutic Target









mice as determined with the TOOS assay on natural LPC substrates (n = 13–27; exp = 3). (E) Plasma LPA levels of the indicated mice as determined by HPLC-MS/MS (n = 9–13; exp = 2). (D) Plasma lysophospholipid (LPLs) levels remain unchanged as measured with HPLC-MS/MS (n = 9–13; exp = 2). All values in every panel are means (\pm SEM) and are presented (except A) normalised (%) to control values.

doi:10.1371/journal.pone.0143083.g002



Fig 3. PF8380 inhibits ATX activity *in vitro* and *in vivo*. (A) Dose response ATX activity inhibition curve under various PF8380 concentrations as measured with the TOOS assay using 50 μM of 16:0 LPC as substrate. (B) Plasma PF8380 pharmacokinetic profile following administration of 120 mg/kg PF8380 for 3 weeks, by oral gavage, in female mice. (C) No effect in mouse body weight following treatment with PF8380 as above. (D) Percent (%) residual plasma ATX activity measured in the presence of 1 mM 16:0 LPC with the TOOS assay at various time points post PF8380 administration as above. (E) Percent (%) residual plasma total LPA levels and (F) concentration of different LPA species at different time points post treatment with PF8380 as above. The cumulative values of two independent experiments (n = 4–7) are presented as means (± SEMs).

doi:10.1371/journal.pone.0143083.g003

inflammatory site tissue within 3 hours [39]. *In vitro* testing on natural LPC substrates of synthesized PF8380 confirmed its potency (IC50 1.9 nM) (Fig 3A), while pharmacokinetic profiling indicated that its levels remained above IC50 values for at least 12 hours (Fig 3B). Wild type 8 week old mice were treated twice daily for 3 weeks with 120 mg/kg PF8380 administered by oral gavage (PO). Despite high dosing for a prolonged period, treated mice exhibited no weight loss (Fig 3C) or macroscopic signs of toxicity. Histopathological examination of 13 major organs following treatment (S8 Fig) identified no pathological changes, confirming that the bulk of ATX activity is dispensable for adult life and that ATX is a safe therapeutic target. Similar conclusions have been reached following administration of ONO-8430506, a novel ATX inhibitor (reported IC50 6.4–19 nM)[40], for 4 or 21 days at a concentration 10 or 100 mg/kg, where no lethality or weight loss was observed [41].

Conclusions

Given the extensive steady state reduction of LPA levels upon inducible genetic deletion of ATX and the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) profiles of existing potent ATX inhibitors, it is highly unlikely to achieve experimentally a further, 24 hours-long, reduction in LPA levels by combining genetic and pharmacologic approaches. However, such a hypothetical 100% constant ATX inhibition would not only prove that the entire ATX expression and activity (as opposed to 80% shown here) is dispensable for adult life, but would also

indicate the relative contribution to serum LPA levels from alternative synthetic pathways possibly mediated by phospholipase A-type enzymes as previously suggested [42].

As the important role of ATX in chronic inflammation and cancer is emerging, a large number of ATX inhibitors have been developed over the last years [2, 20], while several of them have exhibited therapeutic potential: in air-pouch inflammation [39], collagen-induced arthritis [43], bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis [14], allergen-induced asthma [44], as well as in the metastasis of melanoma and breast cancer cells [41, 45-48]. Moreover, ATX inhibition has been proposed as a potential adjuvant therapy to known cancer treatments, given its suggested role in chemotherapy and radiotherapy resistance [49, 50]. Noteworthy, the therapeutic effects of inhibiting ATX in most reported pharmacological studies did not always correlate with the PK/PD profile of the compound, when available, and LPA levels were never suppressed >80% for more than three hours. Although the tissue penetration and retention of the compounds and tissue LPA levels post treatment are largely unknown, it's safe to conclude that even the most potent ATX inhibitors that do exhibit therapeutic potential cannot attenuate LPA levels >80% at a steady state for 24 hours. On the other hand the present study has shown that even a constant 80% reduction of LPA is well tolerated systemically. Therefore, ATX inhibition can exert its therapeutic benefits by inhibiting, most likely, the increased amounts of ATX at inflamed and malignant sites locally, without exhibiting systemic, toxic side effects.

Supporting Information

S1 Fig. Widespread sporadic Cre excision in tamoxifen-treated R26CreER^{T2}/ROSAlacZ mice. A. Schematic representation of the gene targeting strategy. The R26Cre-ER^{T2} construct was sequentially inserted into the *Rosa26* locus by homologous recombination as depicted. E, EcoRI; P, PacI; CreER^{T2}, adenovirus splice acceptor-CreER^{T2}-PMC polyadenylation site; H, Hygro, PGK-hygromycin. B. Tissue sections from 8-week old double transgenic R26Cre-ER^{T2}/R26R mice and littermates were stained for b-galactosidase activity to identify sites of active Cre-mediated recombination. (Scale bar: 150 μ m). (PDF)

S2 Fig. *In vivo* Tmx treatment results in minor inflammatory changes in lung and gastrointestinal (GI) tract. Representative images of tissue sections (H&E staining) from R26Cre- $ER^{T2}/Enpp2^{n/n}$ mice and littermates treated IP with Tmx (100 mg/kg) or corn oil once per day for 10 days. Mice were sacrificed 2 days post Tmx treatment. (Scale bar: 50 µm). Mice treated with corn oil had no histopathological changes indicating that the inflammatory changes were due to Tmx administration. (PDF)

S3 Fig. Genetic ablation of *Enpp2* has no effect in tissue histology. Representative images of tissue sections (H&E staining) from R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} mice and littermates treated IP with Tmx (100 mg/kg) or corn oil for **A**. 10 days and **B**. 5 days. Mice were sacrificed 20 or 10 and 20 days post Tmx treatment, respectively. (Scale bar: 150 μ m). (PDF)

S4 Fig. Genetic deletion of *Enpp2* has no effect in tissue histology. Representative images of tissue sections (H&E staining) from R26Cre-ER^{T2}/*Enpp2*^{n/n} mice and littermates treated PO with Tmx (180 mg/kg) or corn oil for 6 days. Mice were sacrificed 18 and 30 days post Tmx administration. (Scale bar: 150 μ m). (PDF)

S5 Fig. Genetic excision of *Enpp2* has no effect in biochemical factors indicative of main body functions. Plasma biochemical analytes from Tmx / oil-administered R26Cre-ER^{T2}/ $Enpp2^{n/n}$ mice and littermates (n = 3–8, exp = 2). AST: Aspartate transaminase; ALT: Alanine transaminase; CPK: Creatine phosphokinase; LDH: Lactate dehydrogenase; γ -GT: γ -glutamyltranspeptidase.

(PDF)

S6 Fig. Genetic excision of *Enpp2* has no effect in hematopoietic cell populations. Blood cell counts and parameters in Tmx-treated R26Cre- $ER^{T2}/Enpp2^{n/n}$ mice and littermates (n = 3–6, exp = 1). WBC: White blood cells; LYMPH: Lymphocytes; MXD: monocytes, basophils and eosinophils; GRA: Granulocytes; RBC: Red blood cells; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean volume of erythrocytes; MCH: mean content of hemoglobin; MCHC: mean concentration of hemoglobin; RDW: Red cell Distribution Width; PLT: platelets; PCT: plateletkrit; MPV: mean platelet volume; PDW: relative width of the distribution of platelets. (PDF)

S7 Fig. Genetic excision of *Enpp2* **attenuates its protein levels in the plasma.** (A) Western blot of the indicated mouse plasma samples with a rat monoclonal antibody (4F1) against ATX. (B) Western blot of the same (as in A) samples with a commercial (Cayman) rabbit polyclonal against ATX. (C) Coomassie brilliant blue staining of the same (as in A) samples, serving as a loading control.

(PDF)

S8 Fig. Potent pharmacological inhibition of ATX has no effect on tissue histology. Representative images of tissue sections from vehicle-treated and PF8380-treated mice (120 mg/kg PF8380, PO, twice a day for 3 weeks), stained with H&E. (Scale bar: 150 μm). (PDF)

S1 Table. R26CreER^{T2}-driven *Enpp2* recombination, as tested by PCR, in the indicated mouse strains and upon the indicated treatments. (PDF)

S2 Table. No major effects in tissue physiology upon inducible, complete genetic deletion of ATX. (PDF)

(PDF)

Acknowledgments

We are thankful to V. Gorgoulis and D. Moissidou for confirming histology findings. The PF8380 compound was kindly provided by F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VA. Performed the experiments: AK EK NN-K. Analyzed the data: AK EK NN-K SN CM VA. Contributed reagents/materials/analysis tools: AE. Wrote the paper: VA.

References

 Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. The Journal of cell biology. 2002; 158(2):227–33. doi: <u>10.1083/jcb.200204026</u> PMID: <u>12119361</u>

- Barbayianni E, Kaffe E, Aidinis V, Kokotos G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. Progress in lipid research. 2015; 58:76–96. Epub 2015/02/24. doi: 10.1016/j.plipres.2015.02.001 PMID: 25704398.
- Perrakis A, Moolenaar WH. Autotaxin: structure-function and signaling. J Lipid Res. 2014. Epub 2014/ 02/20. doi: <u>10.1194/jir.R046391</u> PMID: <u>24548887</u>.
- Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin—an LPA producing enzyme with diverse functions. J Biochem. 2010; 148(1):13–24. Epub 2010/05/25. doi: <u>10.1093/jb/mvq052</u> PMID: <u>20495010</u>.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, et al. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. Dev Biol. 2010; 339(2):451–64. PMID: 20079728. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.01.007
- Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, et al. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. J Biol Chem. 2006; 281 (35):25822–30. PMID: 16829511.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. Molecular and cellular biology. 2006; 26(13):5015–22. PMID: <u>16782887</u>.
- Okudaira S, Yukiura H, Aoki J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. Biochimie. 2010; 92(6):698–706. Epub 2010/04/27. S0300-9084(10)00153-7 [pii] doi: <u>10.</u> <u>1016/j.biochi.2010.04.015</u> PMID: 20417246.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010; 50:157–86. Epub 2010/01/09. doi: <u>10.1146/annurev.</u> pharmtox.010909.105753 PMID: 20055701.
- Yanagida K, Kurikawa Y, Shimizu T, Ishii S. Current progress in non-Edg family LPA receptor research. Biochim Biophys Acta. 2013; 1831(1):33–41. Epub 2012/08/21. S1388-1981(12)00168-0 [pii] doi: <u>10.</u> <u>1016/j.bbalip.2012.08.003</u> PMID: <u>22902318</u>.
- Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. Biochim Biophys Acta. 2013; 1831(1):42–60. Epub 2012/08/08. S1388-1981(12)00154-0 [pii] doi: <u>10.1016/j.bbalip.2012.07.019</u> PMID: <u>22867755</u>.
- Benesch MG, Ko YM, McMullen TP, Brindley DN. Autotaxin in the crosshairs: Taking aim at cancer and other inflammatory conditions. FEBS letters. 2014. Epub 2014/02/25. doi: <u>10.1016/j.febslet.2014.02.</u> 009 PMID: <u>24560789</u>.
- Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, Sevastou I, Nikolaidou-Katsaridou N, Zhao Z, et al. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. J Exp Med. 2012; 209(5):925–33. Epub 2012/04/12. jem.20112012 [pii] doi: <u>10.1084/jem.20112012</u> PMID: <u>22493518</u>.
- Oikonomou N, Mouratis MA, Tzouvelekis A, Kaffe E, Valavanis C, Vilaras G, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2012; 47(5):566–74. Epub 2012/06/30. doi: <u>10.1165/rcmb.2012-0004OC</u> PMID: <u>22744859</u>.
- Bourgoin SG, Zhao C. Autotaxin and lysophospholipids in rheumatoid arthritis. Curr Opin Investig Drugs. 2010; 11(5):515–26. Epub 2010/04/27. PMID: <u>20419597</u>.
- Tager AM. Autotaxin emerges as a therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis: limiting fibrosis by limiting lysophosphatidic acid synthesis. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2012; 47(5):563–5. Epub 2012/11/06. doi: <u>10.1165/rcmb.2012-0235ED</u> PMID: <u>23125419</u>; PubMed Central PMCID: PMC3547105.
- Liu S, Umezu-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, et al. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. Cancer Cell. 2009; 15(6):539–50. PMID: <u>19477432</u>. doi: <u>10.1016/j.ccr.2009.03.027</u>
- Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, et al. Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. Nat Struct Mol Biol. 2011; 18(2):198–204. PMID: 21240271. doi: 10.1038/nsmb.1980
- Albers HM, Ovaa H. Chemical Evolution of Autotaxin Inhibitors. Chem Rev. 2012. Epub 2012/02/18. doi: <u>10.1021/cr2003213</u> PMID: <u>22335786</u>.
- Barbayianni E, Magrioti V, Moutevelis-Minakakis P, Kokotos G. Autotaxin inhibitors: a patent review. Expert Opin Ther Pat. 2013. Epub 2013/05/07. doi: 10.1517/13543776.2013.796364 PMID: 23641951.
- Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, Inoue A, et al. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. Nat Struct Mol Biol. 2011; 18(2):205–12. Epub 2011/01/18. nsmb.1998 [pii] doi: <u>10.1038/nsmb.1998</u> PMID: <u>21240269</u>.
- Economides AN, Frendewey D, Yang P, Dominguez MG, Dore AT, Lobov IB, et al. Conditionals by inversion provide a universal method for the generation of conditional alleles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(34):E3179–88. Epub 2013/08/07. doi: <u>10.1073/pnas.1217812110</u> PMID: <u>23918385</u>; PubMed Central PMCID: PMC3752204.
- Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, et al. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. J Immunol. 2009; 182(9):5633–40. Epub 2009/04/22. doi: <u>10.4049/jimmunol.0802413</u> PMID: <u>19380810</u>.
- 24. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet. 1999; 21 (1):70–1. Epub 1999/01/23. doi: 10.1038/5007 PMID: <u>9916792</u>.
- Nikitopoulou I, Kaffe E, Sevastou I, Sirioti I, Samiotaki M, Madan D, et al. A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis. PLoS One. 2013; 8 (7):e70941. doi: <u>10.1371/journal.pone.0070941</u>. Print 2013. PMID: <u>23923032</u>
- Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, et al. Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. Physiol Genomics. 2007; 31(1):32–41. Epub 2007/04/26. doi: <u>10.1152/</u> physiolgenomics.00019.2007 PMID: 17456738.
- Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, et al. Rapid generation of inducible mouse mutants. Nucleic Acids Res. 2003; 31(4):e12. Epub 2003/02/13. PMID: <u>12582257</u>; PubMed Central PMCID: PMC150244.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature. 2007; 445(7128):661–5. Epub 2007/01/26. doi: <u>10.</u> <u>1038/nature05541</u> PMID: <u>17251932</u>.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 237(3):752–7. Epub 1997/08/ 28. doi: 10.1006/bbrc.1997.7124 PMID: 9299439.
- Brake RL, Simmons PJ, Begley CG. Cross-contamination with tamoxifen induces transgene expression in non-exposed inducible transgenic mice. Genet Mol Res. 2004; 3(4):456–62. Epub 2005/02/03. PMID: <u>15688312</u>.
- Schmidt-Supprian M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. Nat Immunol. 2007; 8 (7):665–8. Epub 2007/06/21. doi: <u>10.1038/ni0707-665</u> PMID: <u>17579640</u>.
- Boucharaba A, Serre CM, Gres S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. The Journal of clinical investigation. 2004; 114(12):1714–25. PMID: <u>15599396</u>.
- Saulnier-Blache JS. [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. Med Sci (Paris). 2004; 20(8– 9):799–803. PMID: <u>15361348</u>.
- Dusaulcy R, Rancoule C, Gres S, Wanecq E, Colom A, Guigne C, et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. J Lipid Res. 2011; 52(6):1247–55. Epub 2011/03/23. jlr.M014985 [pii] doi: <u>10.1194/jlr.M014985</u> PMID: <u>21421848</u>; PubMed Central PMCID: PMC3090245.
- Rai V, Toure F, Chitayat S, Pei R, Song F, Li Q, et al. Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. J Exp Med. 2012; 209(13):2339–50. Epub 2012/12/05. doi: <u>10.</u> <u>1084/jem.20120873</u> PMID: <u>23209312</u>; PubMed Central PMCID: PMC3526353.
- Tigyi G, Parrill AL. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. Progress in lipid research. 2003; 42(6):498–526. Epub 2003/10/16. PMID: <u>14559069</u>.
- McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(1):131–6. Epub 2002/12/28. [pii]. PMID: <u>12502787</u>; PubMed Central PMCID: PMC140905.
- Parrill AL, Tigyi G. Integrating the puzzle pieces: The current atomistic picture of phospholipid-G protein coupled receptor interactions. Biochim Biophys Acta. 2013; 1831(1):2–12. Epub 2012/09/18. S1388-1981(12)00199-0 [pii] doi: <u>10.1016/j.bbalip.2012.09.002</u> PMID: <u>22982815</u>.
- Gierse JK, Thorarensen A, Beltey K, Bradshaw-Pierce E, Cortes-Burgos L, Hall T, et al. A Novel Autotaxin Inhibitor Reduces Lysophosphatidic Acid Levels in Plasma and the Site of Inflammation. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2010. PMID: <u>20392816</u>.
- 40. Saga H, Ohhata A, Hayashi A, Katoh M, Maeda T, Mizuno H, et al. A Novel Highly Potent Autotaxin/ ENPP2 Inhibitor Produces Prolonged Decreases in Plasma Lysophosphatidic Acid Formation In Vivo and Regulates Urethral Tension. PLoS One. 2014; 9(4):e93230. Epub 2014/04/22. doi: <u>10.1371/</u> journal.pone.0093230 PMID: 24747415; PubMed Central PMCID: PMC3991570.

- Benesch MG, Tang X, Maeda T, Ohhata A, Zhao YY, Kok BP, et al. Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. Faseb J. 2014. Epub 2014/03/07. doi: <u>10.1096/fj.13-248641</u> PMID: <u>24599971</u>.
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. Biochim Biophys Acta. 2008; 1781(9):513–8. PMID: <u>18621144</u>. doi: <u>10.1016/j.bbalip.2008.06.005</u>
- Nikitopoulou I, Sevastou I, Madan D, Prestwich GD, Aidinis V. A bromo-phosphonate analogue of lysophosphatidic acid attenuates the development of collagen induced arthritis. PLoS One. 2013;in press.
- Park GY, Lee YG, Berdyshev E, Nyenhuis S, Du J, Fu P, et al. Autotaxin production of Lysophosphatidic Acid Mediates Allergic Asthmatic Inflammation. Am J Respir Crit Care Med. 2013. Epub 2013/09/ 21. doi: 10.1164/rccm.201306-1014OC PMID: 24050723.
- 45. Zhang H, Xu X, Gajewiak J, Tsukahara R, Fujiwara Y, Liu J, et al. Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo. Cancer research. 2009; 69(13):5441–9. PMID: <u>19509223</u>. doi: <u>10.1158/0008-5472.CAN-09-0302</u>
- 46. Lee SC, Fujiwara Y, Liu J, Yue J, Shimizu Y, Norman DD, et al. Autotaxin, LPA Receptors (1 and 5) Exert Disparate Functions in Tumor Cells Versus the Host Tissue Microenvironment in Melanoma Invasion and Metastasis. Mol Cancer Res. 2014. Epub 2014/08/28. PMID: 25158955.
- Leblanc R, Lee SC, David M, Bordet JC, Norman DD, Patil R, et al. Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin alphaVbeta3 controls metastasis of breast cancer cells to bone. Blood. 2014. Epub 2014/10/04. doi: <u>10.1182/blood-2014-04-568683</u> PMID: <u>25277122</u>.
- Benesch MG, Tang X, Dewald J, Dong WF, Mackey JR, Hemmings DG, et al. Tumor-induced inflammation in mammary adipose tissue stimulates a vicious cycle of autotaxin expression and breast cancer progression. Faseb J. 2015. Epub 2015/06/14. doi: 10.1096/fj.15-274480 PMID: 26071407.
- Brindley DN, Lin FT, Tigyi GJ. Role of the autotaxin-lysophosphatidate axis in cancer resistance to chemotherapy and radiotherapy. Biochim Biophys Acta. 2012. Epub 2012/09/08. S1388-1981(12)00186-2 [pii] doi: <u>10.1016/j.bbalip.2012.08.015</u> PMID: <u>22954454</u>.
- Venkatraman G, Benesch MG, Tang X, Dewald J, McMullen TP, Brindley DN. Lysophosphatidate signaling stabilizes Nrf2 and increases the expression of genes involved in drug resistance and oxidative stress responses: implications for cancer treatment. Faseb J. 2014. Epub 2014/11/16. doi: <u>10.1096/fj.</u> <u>14-262659</u> PMID: <u>25398768</u>.



S1 Fig. Widespread sporadic Cre excision in tamoxifen-treated R26CreER^{T2}/ROSAlacZ mice. A. Schematic representation of the gene targeting strategy. The R26Cre-ER^{T2} construct was sequentially inserted into the Rosa26 locus by homologous recombination as depicted. E, EcoRI; P, PacI; CreER^{T2}, adenovirus splice acceptor-CreER^{T2}-PMC polyadenylation site; H, Hygro, PGK-hygromycin. **B.** Tissue sections from 8-week old double transgenic R26Cre-ER^{T2}/R26R mice and littermates were stained for b-galactosidase activity to identify sites of active Cre- mediated recombination (Scale bar: 150 μm).



S2 Fig. *In vivo* Tmx treatment results in minor inflammatory changes in lung and gastrointestinal (GI) tract. Representative images of tissue sections (H&E staining) from R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} mice and littermates treated IP with Tmx (100 mg/kg) or corn oil once per day for 10 days. Mice were sacrificed 2 days post Tmx treatment. (Scale bar: 50 μm). Mice treated with corn oil had no histopathological changes indicating that the inflammatory changes were due to Tmx administration.







S3 Fig. Genetic ablation of Enpp2 has no effect in tissue histology. Representative images of tissue sections (H&E staining) from R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} mice and littermates treated IP with Tmx (100 mg/kg) or corn oil for A. 10 days and B. 5 days. Mice were sacrificed 20 or 10 and 20 days post Tmx treatment, respectively. (Scale bar: 150 µm).



S4 Fig. Genetic deletion of Enpp2 has no effect in tissue histology. Representative images of tissue sections (H&E staining) from R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} mice and littermates treated PO with Tmx (180 mg/kg) or corn oil for 6 days. Mice were sacrificed 18 and 30 days post Tmx administration. (Scale bar: 150 μm).



S5 Fig. Genetic excision of *Enpp2* has no effect in biochemical factors indicative of main body functions. Plasma biochemical analytes from Tmx / oil-administered R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} mice and littermates (n=3-8, exp=2). AST: Aspartate transaminase; ALT: Alanine transaminase; CPK: Creatine phosphokinase; LDH: Lactate dehydrogenase; γ-GT: γ-glutamyl-transpeptidase.



S6 Fig. Genetic excision of *Enpp2* has no effect in hematopoietic cell populations. Blood cell counts and parameters in Tmx-treated R26Cre-ER^{T2}/Enpp2^{n/n} mice and littermates (n=3-6, exp=1). WBC: White blood cells; LYMPH: Lymphocytes; MXD: monocytes, basophils and eosinophils; GRA: Granulocytes; RBC: Red blood cells; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean volume of erythrocytes; MCH: mean content of hemoglobin; MCHC: mean concentration of hemoglobin; RDW: Red cell Distribution Width; PLT: platelets; PCT: plateletcrit; MPV: mean platelet volume; PDW: relative width of the platelet distribution.



S7 Fig. Genetic excision of *Enpp2* **attenuates its protein levels in the plasma. A.** Western blot of the indicated mouse plasma samples with a rat monoclonal antibody (4F1) against ATX. **B.** Western blot of the same (as in A) samples with a commercial (Cayman) rabbit polyclonal antibody against ATX. **C.** Coomassie brilliant blue staining of the same (as in A) samples, serving as a loading control.



S8 Fig. Potent pharmacological inhibition of ATX has no effect on tissue histology. Representative images of tissue sections from vehicle-treated and PF8380-treated mice (120 mg/kg PF8380, PO, twice a day for 3 weeks), stained with H&E. (Scale bar: 150 μm).

	Genotype	ATXiCre	ATXiCre	ATXiCre	ATX	ATX	ATXiCre	ATXiCre	ATX	ATX	iCre	iCre
	Treatment	Tmx	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil
	mg/Kg	50	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-
	Route	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP
	Days	10	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5
Recombination in tissues	Brain	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 1/1	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Heart	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 2/2	+ 1/2	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Lung	- 1/1	+ 6/6	+ 2/2	- 4/4	- 2/2	+ 8/8	+ 4/5	- 6/6	- 4/4	- 6/6	- 5/5
	Gut	-1/1	+ 6/6	+ 2/2	- 4/4	- 2/2	+ 11/11	+ 7/7	- 6/6	- 4/4	- 6/6	- 5/5
	Spleen	- 1/1	+ 6/6	+ 2/2	- 4/4	- 2/2	+ 11/11	+ 7/7	- 6/6	- 4/4	- 6/6	- 5/5
	Thymus	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 2/2	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Spinal cord	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 3/3	+ 2/2	-3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Kidney	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 1/1	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Liver	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 4/4	+ 2/2	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Ovary	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 3/3	+ 1/2	- 2/2	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Testis	- 1/1	+ 1/1	nd	nd	nd	+ 1/1	nd	-1/1	- 1/1	- 2/2	- 2/2
	Lymph nodes	nd	nd	nd	nd	nd	+ 3/3	+ 1/1	- 3/3	- 1/1	- 2/2	- 2/2

Supplementary Table 1. R26CreER^{T2}-driven *Enpp2* recombination, as tested by PCR, in the indicated mouse strains and upon the indicated treatments

	Genotype	ATXiCre	ATXiCre	ATX	ATX	iCre	iCre	ATXiCre*	ATXiCre*	ATX: homozygous Enpp $2^{n/n}$; iCre:		
	Treatment	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	Tmx	Oil	heterozygous R26CreER ^{T2} ;		
	mg/Kg	180	-	180	-	180	-	180	-			
	Route	PO	PO	PO	PO	PO	PO	PO	PO	IP: intraperitoneal; PO: oral; Tmx:		
	Days	6	6	6	6	6	6	6	6	Tamoxifen;		
Recombination in tissues	Brain	+ 9/9	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	+2/2	-2/2			
	Heart	+ 8/8	+ 2/2	- 3/3	- 2/2	- 5/5	- 3/3	nd	nd	+ denotes detection of complete removal of floxed exons along with the neo cassette, as described previously (PMID:20079728)		
	Lung	+ 9/9	+ 2/2	- 3/3	- 3/3	- 5/5	- 3/3	+1/1	-2/2			
	Gut	+ 11/11	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	+1/1	-2/2			
	Spleen	+ 11/11	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 4/4	- 3/3	nd	nd			
	Stomach	+ 8/8	+ 2/2	- 3/3	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd	1 . 1		
	Spinal cord	+ 9/9	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd	nd: not determined		
	Kidney	+ 9/9	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd	1/2. denotes recombination in 1 out		
	Liver	+ 11/11	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 6/6	- 3/3	+1/1	-2/2	+1/2: denotes recombination in 1 out of 2 mice tested		
	Ovary	+1/1	nd	- 2/2	- 2/2	- 1/1	- 1/1	nd	nd	of 2 mile tested.		
	Testis	+ 6/6	+ 2/2	- 1/1	- 1/1	- 1/1	- 1/1	nd	nd	*denotes separate housing of mice		
	Lymph nodes	+ 10/10	+ 2/2	- 4/4	- 3/3	- 5/5	- 3/3	nd	nd	receiving Tmx		

	Mouse No	Affected tissues	Diagnosis	Severity
		Lung	Interstitial pneumonia	Moderate
	NICOS	Small gut	Enteritis	Mild
	N295	Colon	Typhlitis	Mild
		Cecum	Adult helminthes	Mild
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
		Small gut	Enteritis	Mild
м		Colon	Typhlitis	Moderate
m X	N1	Cecum	Typhlitis	Moderate
E +		Spleen	Histiocytosis	moderate
ų,		Stomach	Gastritis	Mild
p2'		Lung	Interstitial pneumonia	Moderate
du		Small gut	Enteritis	Mild
Æ	N303	Colon	Typhlitis	Moderate
RI	11303	Cecum	Typhitis	Moderate
Ξ		Spleen	Histioautosis	Widdefale
ŗ		Juna	Interactical provincial	Mild
e C		Lung		IVIIIQ M:14
R2	N1205	Small gut	Enteritis	Mild
	N305	Colon	I yphitis	Moderate
		G	Colitis	Mild
		Cecum	Typhlitis	Moderate
	N308	Lung	Interstitial pneumonia	Moderate
		Small gut	Enteritis	Mild
		Colon	Typhylitis	Moderate
			Colitis	Mild
		Lung	Interstitial pneumonia	Severe
	N300	Small gut	Enteritis	Mild
		Colon	Colitis	Severe
		Lung	Interstitial pneumonia	Severe
	N301	Small gut	Enteritis	Mild
		Colon	Colitis	Severe
		Stomach	Gastritis	Mild
		Lymph node	Hystiocytosis, neutrophilia	
nx		Spleen	Neutrophilia	
Ę		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
+ 	N304	Small gut	Enteritis	Moderate
5		Colon	Typhylitis	Moderate
ldu		Stomach	Gastritis	Moderate
E		Spleen	Hystiocytosis	
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
	N306	Small gut	Enteritis	Mild
		Colon	Typhylitis	Moderate
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
		Small gut	Enteritis	Moderate
	N307	Colon	Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
		Stomach	Gastritis	Moderate
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
	N339	Small gut	Enteritis	Moderate
12		Colon	Typhylitis	Severe
ER			Colitis	Severe
[Lino	Interstitial pneumonia	Mild
⁺ I C		Small out	Enteritis	Moderate
526	N341	Colon	Typhylitis	Severe
H		COIDII	Colitis	Severe
	N3/12	Ling	Interstitial nneumonia	Mild
Í.	11,074	Lung	mersunai pircumonia	wind

Supplementary Table 2. No major effects in tissue physiology upon inducible, complete genetic deletion of ATX

	Colon		Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
	N343	Colon	Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
	N346	Colon	Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
		Lung	Interstitial pneumonia	Mild
	N250	Colon	Typhylitis	Severe
			Colitis	Severe
		Lung	No significant findings	
[2	N255	Small gut	No significant findings	
CR	11355	Colon	No significant findings	
e-F mx		Spleen	No significant findings	
-P C	N257	Lung	No significant findings	
26		Small gut	Enteritis	Mild
R	11337	Colon	No significant findings	
		Spleen	No significant findings	

Examined organs as arranged and phenotyped in slides: Slide 1: Heart, thymus, tongue, sternum; Slide 2: Lung, thyroid, trachea, salivary glands; Slide 3: Kidneys, adrenals; Slide 4: Liver, spleen, pancreas; Slide 5: GI tract; Slide 6: Reproductive organs, urinary bladder, skin (+mammary glands for females); Slide 7: Head (5 pieces); Slide 8: Hind limb; Slide 9: Vertebrae and spinal cord (cervical, thoracic, lumbar)



Citation: Mouratis M-A, Magkrioti C, Oikonomou N, Katsifa A, Prestwich GD, Kaffe E, et al. (2015) Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. PLoS ONE 10(7): e0133619. doi:10.1371/journal. pone.0133619

Editor: Xiao Su, Chinese Academy of Sciences, CHINA

Received: February 27, 2015

Accepted: June 29, 2015

Published: July 21, 2015

Copyright: © 2015 Mouratis et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Hellenic Ministry for education and religion/General Secretariat of research and technology Aristia II (INFLALIPID-3311) and Synergasia 2009 (ATX-09SYN-11-679) grants, through the Operational Programs "Education and Lifelong Learning" and "Competitiveness and Entrepreneurship" (respectively) of the National Strategic Reference Framework (NSRF), co-funded by the European Commission (European Social Fund and European Regional Development Fund respectively) and **RESEARCH ARTICLE**

Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury

Marios-Angelos Mouratis¹°, Christiana Magkrioti¹°, Nikos Oikonomou¹, Aggeliki Katsifa¹, Glenn D. Prestwich², Eleanna Kaffe¹, Vassilis Aidinis¹*

1 Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Athens, Greece, 2 Department of Medicinal Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah, United States of America

• These authors contributed equally to this work.

* v.aidinis@fleming.gr

Abstract

Acute Lung Injury (ALI) is a life-threatening, diffuse heterogeneous lung injury characterized by acute onset, pulmonary edema and respiratory failure. Lipopolysaccharide (LPS) is a common cause of both direct and indirect lung injury and when administered to a mouse induces a lung phenotype exhibiting some of the clinical characteristics of human ALI. Here, we report that LPS inhalation in mice results in increased bronchoalveolar lavage fluid (BALF) levels of Autotaxin (ATX, *Enpp2*), a lysophospholipase D largely responsible for the conversion of lysophosphatidylcholine (LPC) to lysophosphatidic acid (LPA) in biological fluids and chronically inflamed sites. In agreement, gradual increases were also detected in BALF LPA levels, following inflammation and pulmonary edema. However, genetic or pharmacologic targeting of ATX had minor effects in ALI severity, suggesting no major involvement of the ATX/LPA levels was shown to predispose to and/or to promote acute inflammation and ALI unlike chronic inflammatory pathophysiological situations, further suggesting a differential involvement of the ATX/LPA axis in acute versus chronic pulmonary inflammation.

Introduction

Acute lung injury (ALI), or mild acute respiratory distress syndrome (ARDS) [1], is a diffuse heterogeneous lung injury characterized by arterial hypoxemia, respiratory failure and low lung compliance, as well as non-cardiogenic pulmonary edema and widespread capillary leakage leading to alveolar flooding [2]. Different experimental animal models have been evolved and used to investigate the pathophysiological mechanisms of ALI, mostly based on reproducing known risk factors for the human condition, such as sepsis, acid aspiration and mechanical ventilation [3]. Among them, LPS inhalation in (C57Bl/6) mice is a well-established experimental model of ALI (LPS/ALI), characterized by acute neutrophil accumulation in lung tissue/BALF and pulmonary edema [4]. Lipopolysaccharide (LPS), a component of gram-negative bacteria cell walls and a potent TLR4 activator, is a common cause in both direct and indirect lung injury (i.e. pneumonia and sepsis respectively)[4].



National resources. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Autotaxin (ATX, *Enpp2*) is a secreted glycoprotein, widely present in biological fluids, including broncheoalveolar lavage fluid (BALF) [5, 6]. ATX is a member of the ectonucleotide pyrophosphatase-phosphodiesterase family of ectoenzymes (E-NPP) that hydrolyze phosphodiesterase bonds of various nucleotides and derivatives [7]. However and unlike other E-NPP family members, the prevailing catalytic activity of ATX is the conversion of lysophosphatidyl-choline (LPC) to lysophosphatidic acid (LPA)[8]. LPA is a phospholipid mediator [9, 10] that evokes growth-factor-like responses in almost all cell types, including cell growth, survival, differentiation and motility [11–13]. The large variety of LPA effector functions is attributed to at least six, G-protein coupled, LPA receptors (LPARs) with overlapping specificities and wide-spread distribution including the lung [14, 15].

A major role for the ATX/LPA axis has been suggested in chronic inflammation and cancer [16], while the numerous LPA effects in pulmonary cell types *in vitro* have implicated the axis in lung pathophysiology [17]. More importantly, genetic and pharmacologic studies *in vivo* [18–20] have indicated a decisive contribution of ATX/LPA in the development of pulmonary chronic inflammation and fibrosis [21–23]. Therefore, given the established role of the ATX/LPA axis in pulmonary chronic inflammation and fibrosis *in vivo*, as well as the LPA effects in pulmonary cell types *in vitro*, in this report we evaluated a possible role for the ATX/LPA axis in endotoxin-induced acute lung injury.

Materials and Methods

Mice

All mice were bred at the animal facilities of the Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center, under specific pathogen-free conditions. Mice were housed at 20–22°C, $55\pm5\%$ humidity, and a 12-h light-dark cycle; water and food were given *ad libitum*. Mice were bred and maintained in their respective genetic backgrounds for more than 10 generations. All experimentation in mice for this project was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming" (#373/375), as well as the Veterinary service and Fishery Department of the local governmental prefecture (#5508). The generation and genotyping instructions of *Enpp2*^{n/n} conditional knockout mice [24], CC10-Cre [18] and LysM-Cre [25] have been described previously.

Construction of the TgCC10hATX transgenic mice

Vector pcDNA3.1/ZEO a1AT-hATX-BGHpA carrying the cDNA of human ATX preceded by the a1t1 promoter and followed by the Bovine Growth Hormone polyadenylation site (BGHpA) (a generous gift of G. Mills) was digested with HindIII/NaeI to isolate hATX-BGHpA. This was then ligated to pBS-CMV which had been cleaved with HindIII/EcoRV. The resulting vector pBS-CMV-hATX-BGHpA was digested with MfeI/HindIII to remove the CMV promoter and made blunt by filling the 5' overhangs with T4 DNA polymerase. CC10 promoter was excised with a HindIII digestion from CC10-Cre-hGH and was also made blunt. Ligation followed, thus, forming the pBS-CC10-hATX-BGHpA construct. The resulting construct was verified with an MfeI/BssHII digestion, amplified in bacterial cultures and purified by 2xCsCl. BssHII (PauI) digestion was employed to separate the vector backbone from the transgene encoding fragment (transgenic device). The latter was then isolated by b-agarase extraction.

For the production of transgenic mice from the transgenic facility of BSRC Fleming, fertilized CBAxC57Bl/6 hybrid (F2) zygotes were injected with the transgenic device at a concentration of 5,38 ng/µl, diluted in Embryo max solution (mr-095-f, Chemicon International, CA, USA). In the same day, 233 zygotes were transferred to 11 surrogate mothers F1 CBAxC57Bl/6 to generate 54 offsprings.

The transgene was detected in tail DNA with PCR analysis (primers: forward 5'-ACT GCC CAT TGC CCA AAC AC-3' and reverse 5'-TCT GAC ACG ACT GGA ACG AG-3'). From the 54 F0 mice 4 were identified as transgenic, which gave rise to the respective lines L13, L15, L16, L39.

LPS-induced Acute Lung Injury Model

LPS was administered by inhalation, applying a previously described method with minor modifications [26, 27]. Briefly, bacterial LPS from Pseudomonas aeruginosa (serotype 10, Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in normal saline at a concentration of 2mg/ml. 5 ml of this solution was fully administered via a custom-made nebulizer at an oxygen flow-rate of 4lt/min for 25 minutes into a chamber containing 5–7 mice. For control mice, normal saline was administered as above. All measures were taken to minimize animal suffering; however and during the protocol no anaesthetics were used as no invasive or painful techniques were performed. After the induction of ALI, the condition of the animals was checked every two hours during the light period. No adverse effects were observed that would necessitate the use of analgesics and no animals died before the experimental points. Mice were sacrificed 24 hours after the induction of ALI for all experiments apart from the time course experiment where sacrifice was done at several time points between 6 and 48 hours after the induction. Sacrifice was performed in a CO_2 chamber with gradual filling followed by exsanguination. In the pharmacologic study, GWJ-A-23 (dissolved in saline, 2% DMSO) was administered intraperitoneally at a dosage of 10mg/kg before exposure to LPS. The vehicle group was administered 2% DMSO in saline.

Total Protein Content Determination

Total protein concentration in BALF samples was measured using the Bradford protein assay (Biorad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. OD readings of samples were converted to μ g/ml using values obtained from a standard curve generated with serial dilutions of bovine serum albumin (2000–125 μ g/ml).

ATX activity assay

ATX activity was measured using the TOOS activity assay. ATX cleaves the LPC substrate to LPA and choline. The liberated choline is oxidised by choline oxidase to betaine and hydrogen peroxide. The latter, in the presence of HRP (horseradish peroxidase), reacts with TOOS (Nethyl-N-(2-hydroxy-3-slfopropyl)-3-methylaniline) and 4-AAP (aminoantipyrene) to form a pink quinoeimine dye with a maximum absorbance at 555nm. Briefly, 1.25x LysoPLD buffer (0.12 M Tris-HCl pH = 9, 1.25 M NaCl, 6.25 mM CaCl₂, 6.25 mM MgCl₂, 6.25 µM CoCl₂, 1.25 mM LPC) was incubated at 37°C for 30 minutes before adding 80µl/well in 20 µl BALF in a 96-well plate. The mix was incubated at 37°C for 4 hours. At the end of the incubation, a colour mix (5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH = 8, 8 U/ml HRP, 0.5 mM 4-AAP, 0.3 mM TOOS, 2 U/ml choline oxidase) was prepared and 100 μ l added to each well. Readings were taken every 5 minutes for 20 minutes. For each sample, the absorbance (A) was plotted against time and dA/min was calculated for the linear part of the plot. ATX activity was calculated according to the equation: Activity(u/ml) = $[dA/dT(sample)-dA/dT(blank)] * V_t/(32.8*V_s*1/2)$, where Vt = total volume of reaction (mL), Vs = volume of sample (mL), 32,8 = the milimolarextinction coefficient of quinoneimine dye ($cm^2/\mu mol$) and 1/2 = the mols of quinoneimine dye produced by 1 mol of H_2O_2 .

Immunohistochemistry

Immunostaining was performed with peroxidase labelling techniques. Tissue sections were deparaffinized and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 1% peroxide. The sections were preincubated with 2% Normal Goat Serum (NGS) in PBS-Tween (PBST) for 30 minutes, followed by incubation overnight at 4°C with the primary antibody against ATX (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). Sections were then washed in PBST and incubated for 30 minutes with horseradish peroxidase (HRP)–conjugated anti-rabbit IgG (1:1000 dilution in PBS-T). The sections were further washed with PBST. Finally, colour was developed by immersing the sections in a solution of 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma) and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. The sections were counterstained with hematoxylin. The specificity of a-ATX antibodies has been analysed in detail previously [28].

RNA Extraction and Real-time RT-PCR Analysis

RNA was extracted from the left lung lobe using the peqGOLD TriFast Reagent and treated with DNAse (RQ1 RNAse-free DNAse, Promega, Wis, USA) prior to RT-PCR according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed for cDNA synthesis using the peqGOLD MMLV H plus reverse transcriptase. All reagents were purchased from PEQLAB Biotechnologie GMBH, Germany. Real-time PCR was performed on a BioRad CFX96 Tou-chReal-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd, CA, USA). Values were normalized to the expression of b-2 microglobulin (B2m).

HPLC-MS/MS measurements

LPA (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 and C20:4) and LPC species (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C20:4, C22:6 and C24:0) were measured in plasma by means of HPLC-ESI/MS/MS using an RSLCnano system (Ultimate 3000 Series, Dionex Corporation, USA) coupled with an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Lipid extraction from BALF was performed as previously described with minor modifications [29]. Briefly, BALF samples (300 μ L) were mixed with 700 μ L PBS prior to extraction and spiked with the internal standard mix (17:0 LPA/LPC). Neutral extraction was performed twice with 2 mL icecold CHCl3/CH3OH (2/1, v/v) followed by 1 mL PBS saturated ice-cold CHCl3/CH3OH (2/1, v/v). Each extraction step was followed by a 60 sec vortex and a 1 min centrifugation step at 4°C at 3,000 rpm. The lower organic phases from both extraction steps were pooled and kept for LPC measurements. The remaining aqueous phase was chilled in ice for 10 min, acidified with HCl 6N τo pH 3.0 and undergone further 2-step extraction with ice-cold CHCl3/CH3OH (2/1, v/v) as above. The lower organic phases were pooled and kept for LPA measurements. The neutrally extracted organic phase and the neutralized acidified lower organic phase were evaporated to dryness. Finally, the dry residues were resuspended in 0.15 mL of isopropanol for HPLC-ESI/MS/MS analysis. Recovery of LPA and LPC species ranged between 55-85% and 80–100%, respectively. The HPLC-MS/MS was performed as previously described [29].

Statistical analysis

Statistical significance was assessed in pair-wise comparisons with control values using a paired Student's *t*-test, or a Mann-Whitney test in cases of not normal distributions, using SigmaPlot 11.0 (Systat software Inc., IL, USA), and presented as means (\pm S.E). In all figures, * and ** denote p-values <0.05 and <0.001 respectively. All experiments presented are representative of two repetitions; cumulative normalized-to-control values produce identical results and conclusions.

Results and Discussion

ATX was previously suggested as a candidate gene involved in the control of pulmonary functions, development and remodelling [30], while the lung has been suggested to be among the tissues expressing moderately high ATX mRNA levels in healthy conditions [17]. In pathophysiological conditions, increased ATX/LPA levels have been detected in fibrotic lungs, both in human patients and animal models [18, 20]. Accordingly, genetic deletion of ATX, LPAR1 or LPAR2 [18, 20, 31], as well as pharmacologic inhibition of ATX or LPAR1[18, 19], attenuated the development of the bleomycin (BLM)-induced modelled disease. Therefore, a major role of ATX and LPA in pulmonary chronic inflammation and fibrosis was established, attributed to LPA-induced vascular leak and fibroblast recruitment [21–23]. Moreover, a number of LPA effects in pulmonary cells *in vitro* are consistent with a pro-inflammatory and pro-fibrotic role of ATX/LPA, although a number of reports also suggest anti-inflammatory effects of LPA [17]. Therefore, and given the role of ATX/LPA in chronic pulmonary inflammation and the LPA effects in pulmonary cell types, we reasoned a possible role of ATX/LPA in acute inflammation and lung injury.

Increased BALF ATX/LPA levels upon LPS-induced ALI

To examine a possible involvement of ATX in the pathogenetic mechanisms underlying ALI, we first monitored its levels upon the time course of the modelled, LPS-induced, disease development. Noteworthy, and since no animal model fully represent all the clinical characteristics of human ALI, a recent American Thoracic Society workshop suggested that the main features of experimental ALI should include at least three out of the following four features: histological evidence of tissue injury (such as the accumulation of neutrophils in the alveolar or the interstitial space), alteration of the alveolar capillary barrier (such as the increase in total protein concentration of the bronchoalveolar lavage fluid; BALF), an inflammatory response (such as an increase in the absolute number of neutrophils in the BALF) and evidence of physiological dysfunction [32]. Accordingly, aerosolized LPS (*Pseudomonas aeruginosa*) was administered by inhalation to groups of littermate mice, which were then sacrificed 6, 12, 24 and 48 hours postadministration (Fig 1). Histological analysis of isolated lungs indicated that LPS inhalation resulted in alveolar wall thickening and leukocyte infiltration into the lung interstitium and alveolar space (Fig 1A), as previously reported [26, 27]. Inflammatory cells (93% neutrophils; [26]) were evident in BALFs already at the 6hr time-point and continued to increase at 48h (Fig 1A and 1B). Pulmonary microvascular leakage and edema induced by LPS was reflected in the gradual increase of BALF total protein content (Fig 1C).

Interestingly, ATX activity in BALFs, as quantified with the TOOS assay on natural LPC substrates, showed a gradual increase as time progressed (Fig 1D), following total protein levels (Fig 1C) most likely reflecting a relaxation of the endothelial barrier and thus suggesting increased recruitment from the circulation. Similar findings have been reported in earlier studies, upon intratracheal administration of LPS (5mg/Kg) in Sv/129 mice [33]. ATX immunohistochemistry (IHC) in lung tissue sections showed high constitutive expression from the bronchial epithelium, as well as a weak diffuse staining pattern in the lung parenchyma upon LPS/ALI (Fig 1E).

As the main known function of ATX is the hydrolysis of LPC to LPA, the corresponding BAL fluids were analyzed with HPLC-MS/MS to identify perturbations in lysophospholipid levels upon LPS-induced ALI. LPC, the substrate of ATX and precursor of LPA, peaked at 24 hours (Fig 1F), as previously reported for the lung surfactant of guinea pigs upon LPS-induced ALI [34]. Total BALF LPA levels were also found increased (Fig 1G), as previously reported [35], correlating with and confirming BALF ATX activity levels.



Fig 1. Increased BALF ATX/LPA levels upon LPS-induced ALI. Mice were administered aerosolized LPS and were sacrificed 6, 12, 24 and 48 hours later (n = 3–5; a representative experiment out of two is shown). A. Hematoxylin & Eosin staining of lung tissue sections following LPS exposure for the indicated times resulted in alveolar wall thickening and leukocyte infiltration into the lung interstitium and alveolar space. B. Increased BALF cellularity upon LPS/ALI. C. Pulmonary microvascular leakage and edema induced by LPS was reflected in BALF protein content. D. Increased ATX activity in LPS/ALI BALFs, as measured with the TOOS assay. E. IHC for ATX in lung tissue showing constitutive expression from the bronchial epithelium, as well as a weak diffuse staining pattern in the lung parenchyma. F-G. BALF total LPC/LPA levels respectively upon LPS/ALI, as measured with HPLC-MS/MS.

PLOS ONE

Bronchial epithelium-specific ATX expression has a minor contribution to ALI pathogenesis

ATX expression is localized mainly in the bronchial epithelium, both in healthy and inflammatory conditions (Fig 1E)[17, 18, 36], suggesting this cell type as the main pulmonary source of ATX. To confirm both its cell-specific expression, as well as to examine its possible contribution to ALI pathogenesis, ATX was conditionally deleted from the bronchial epithelium by crossing the conditional knock out mouse for ATX ($Enpp2^{n/n}$)[24] with the Tg*CC10-Cre* transgenic mouse strain that expresses the Cre recombinase under the control of the mouse CC10Kd (*Scgb1a1*) promoter [18]. As previously reported, CC10-Cre drives conditional ATX recombination in *CC10Enpp2^{-/-}* mice exclusively in bronchial epithelial cells (with an efficiency of 70–80%), while the transgenic Cre driver mouse strain itself exhibits no apparent pulmonary phenotype even under inflammatory conditions [18].



Fig 2. Genetic deletion of ATX from the bronchial epithelium has minor effects in ALI development. Aerosolized LPS was administered in mice where ATX was genetically deleted specifically from bronchial epithelial cells (CC10Enpp2^{-/-}), as well as wild type littermates. Mice were sacrificed 24 hours later (n = 3–8; a representative experiment out of two is shown). A-C. Histological analysis (A) and BALF measurements (B & C) indicated no significant changes in the lungs of mice lacking ATX expression in the bronchial epithelium in comparison to their wild type littermates. D. Conditional deletion of ATX from the cells of the bronchial epithelium led to decreased enzyme activity of ATX in the BALF.

LPS was administered to $CC10Enpp2^{-/-}$ mice, as well as to wild type littermates, and disease severity was assessed 24 hours later. Deletion of ATX from bronchial epithelial cells had minor effects in attenuating disease development (a clear and reproducible, but not statistically significant, negative trend), such as tissue damage (Fig 2A), neutrophilic inflammation (Fig 2B) and pulmonary edema (Fig 2C), despite decreased BALF ATX levels (Fig 2D).



Fig 3. Generation of TgCC10Enpp2 mice. A. Schematic representation of the construct used for the generation of the transgenic mice. B. Genotyping PCR of the 4 offsprings that carried the transgene, out of the 54 that were generated after the injections of the transgene-microinjected zygotes in surrogate mothers. C. All four transgenic lines contained equal copy numbers, as identified with Real-Time PCR. D. Real-Time RT-PCR confirmed the expression of the transgene (L39 is shown). E. Total ATX activity levels in the BALFs of Tg*CC10Enpp2* mice (L39) were found moderately upregulated with the TOOS assay. F. In the same mice, BALF LPA was also found elevated, as measured with HPLC-MS/MS. (C-F n = 3–8).

In order to further examine a role of bronchial epithelial cell-derived ATX expression, a new transgenic mouse strain was constructed, expressing human ATX driven by the CC10 promoter (Tg*CC10hEnpp2*; Fig 3A) which directs expression exclusively in bronchial epithelial cells [18]. All 4 transgenic lines obtained (L13, L15, L16, L39; Fig 3B), contained 4–5 transgene copies (Fig 3C), and expressed the transgenic (hATX) mRNA in the lung tissue (Fig 3D; L39 is shown). Total ATX activity in BALFs of the transgenic mouse line was found moderately upregulated (Fig 3E), resulting in similar increases in BALF LPA levels (Fig 3F).

To examine whether bronchial epithelial cell-derived hATX has any effect in LPS-induced ALI, LPS was administered in homozygous $TgCC10hEnpp2^{+/+}$ mice (L16), which are healthy and fertile and exhibit no overt lung phenotype at 8–10 weeks after birth (Fig 4A). The moderate overexpression of ATX from bronchial epithelial cells had minor effects in exacerbating disease symptoms such as tissue damage (Fig 4A), neutrophilic inflammation (Fig 4B) and pulmonary edema (Fig 4C), although an opposite trend in disease severity could be observed in comparison to mice with bronchial epithelial deletion of ATX (Fig 2).

Therefore, bronchial epithelial expression of ATX does not seem to have a major role in LPS-induced, acute inflammation and lung injury, as opposed to its role in BLM-induced chronic pulmonary inflammation and fibrosis [18], suggesting a differential involvement of ATX/LPA in acute vs chronic pulmonary inflammation.

Macrophage-specific ATX expression does not contribute to ALI pathogenesis

To examine if myeloid cell derived ATX contributes to the pathogenesis of ALI, the conditional knock out mouse for ATX $(Enpp2^{n/n})[24]$ was crossed with a transgenic mouse strain (LysM-Cre) expressing the Cre recombinase under the control of the mouse Lysozyme M (LysM) promoter, which achieves a recombination efficiency close to 100% in granulocytes and 83–98% in macrophages [25]. No differences were observed in BALF ATX activity between



Fig 4. Genetic overexpression of ATX from the bronchial epithelium has minor effects in ALI development. Transgenic (TgCC10hEnpp2^{+/+}) mice overexpressing hATX in the bronchial epithelium and littermate wild type mice were administered aerosolized LPS to induce ALI and were sacrificed 24 hours later (n = 3–10; a representative experiment out of two is shown). A-C. Histological analysis (A) and BALF measurements (B & C) indicated no significant changes in the lungs of mice overexpressing ATX expression in the bronchial epithelium in comparison to their wild type littermates. D. Increased enzyme activity of ATX in the transgenic mice.

LysMEnpp2^{-/-} mice and their wild type littermates (Fig 5D), indicating no contribution of macrophages to BALF ATX levels upon LPS challenge. Accordingly, no differences were observed in all disease indices upon genetic deletion of ATX from macrophages (Fig 5), excluding a role of inflammatory macrophage derived ATX in LPS-induced acute lung inflammation in the lung, especially given the relatively few macrophages (<3%) in BALF infiltrates 24 hours post



Fig 5. Deletion of ATX from myeloid cells had no effects in ALI development. Aerosolized LPS was administered in mice where ATX was deleted from the myeloid cells (LysMEnpp2^{-/-}) and wild type littermate mice. Mice were sacrificed 24 hours later. A-C. Histological analysis (A) and BALF measurements (B & C) showed no differences in inflammation and edema between mice lacking ATX expression from myeloid cells and their wild type littermates. D. Conditional deletion of ATX from myeloid cells had no effects in BALF ATX activity.

LPS [26, 27]. On the contrary macrophage derived ATX was shown to be important for the development of BLM-induced chronic pulmonary inflammation and fibrosis [18], where macrophages are the most abundant (>60%) infiltrating cell type during disease development [37].

Increased systemic ATX levels exacerbate acute pulmonary inflammation

Genetic deletion of ATX from bronchial epithelial cells, although diminished, did not attenuate pulmonary BALF ATX levels suggesting that a major part of BALF ATX is derived from the circulation, through the possible relaxation of endothelial and epithelial barriers upon LPSinduced ALI [4]. Therefore, and to investigate a possible role of circulating ATX in LPS/ALI, we next examined whether systemic fluctuations of ATX could modulate ALI pathogenesis. LPS was administered to homozygous transgenic mice overexpressing ATX in the liver driven by the human α 1- antitrypsin inhibitor (a1t1) promoter (Tga1t1Enpp2; up to 200% of normal plasma ATX/LPA levels) [38], as well as to the heterozygous complete knock out mouse for ATX $(Enpp2^{+/-}; 50\%)$ of normal plasma ATX/LPA levels)[24]. Chronically elevated serum ATX levels in Tga1t1Enpp2 mice increased LPS-induced tissue damage (Fig 6A), BALF neutrophilic infiltration (Fig 6B) and pulmonary edema (Fig 6C) in comparison to their wild type littermates. However, reduced serum ATX levels in Enpp2^{+/-} mice had only minor effects in LPSinduced ALI (Fig 6A, 6E and 6F), suggesting that a 50% reduction of systemic normal levels of ATX is not sufficient to confer resistance to ALI. Therefore, systemic, chronic exposure to increased ATX/LPA levels seems to predispose to and/or promote acute inflammation and ALI.

Noteworthy, systemic ATX levels were shown not to play a role in the development of modelled chronic inflammatory diseases, such as pulmonary fibrosis and rheumatoid arthritis where local ATX expression was shown to be the crucial event [18, 28], further suggesting a differential role of ATX/LPA in acute versus chronic inflammation.

Pharmacologic inhibition of ATX does not alleviate ALI

It has been previously reported that pharmacologic inhibition of ATX using GWJ-A-23, a nanomolar ATX inhibitor [39, 40], attenuated both the development of BLM-induced pulmonary fibrosis [18], as well as triple-allergen (DRA)-induced asthma in mice [40]. Therefore, we next investigated the therapeutic potential of ATX inhibition in ALI. GWJ-A-23 was injected intraperitoneally just before LPS administration and disease indices were examined in comparison with vehicle treated littermate mice. As shown in Fig 7, ATX inhibition (Fig 7D) and reduction of LPA levels (Fig 7E) did not significantly attenuate ALI severity, as reflected in all disease indices (Fig 7A–7C), in agreement with the studies in $Enpp2^{+/-}$ mice. Likewise, pharmacologic antagonism of LPAR1 and 3 with ki16425 had minor effects in inflammation (<25%) and no effect in pulmonary edema [35]. Therefore, the results further confirm a differential role of ATX in acute versus chronic inflammation and suggest no therapeutic potential of targeting the ATX/LPA axis in ALI/ARDS.

Conclusions

LPS administration to wt C57Bl6 mice resulted in increased ATX/LPA levels in BALFs, as previously reported [33, 35]. However, genetic deletion of ATX from bronchial epithelial cells or pharmacologic ATX inhibition, had minor effects in ALI pathology, as opposed to BLMinduced chronic pulmonary inflammation and fibrosis [18], suggesting a differential involvement of ATX/LPA in acute and chronic inflammation.

Similarly, the genetic deletion or pharmacologic antagonism of LPAR1 had no effect in vascular leak and edema upon LPS administration [35], the major hallmark of LPS/ALI-ARDS (and minimal, <25%, effects in inflammation, possibly due to genetic background differences of control mice). On the contrary, LPA/LPAR1-induced vascular leak was the main attribute

PLOS ONE



Fig 6. Systemic overexpression of ATX exacerbates ALI. Transgenic ($Tga1t1Enpp2^{+/+}$) or heterozygous complete knock-out (Enpp2^{+/-}) mice and their corresponding wild type littermate mice were administered with aerosolized LPS to induce lung injury and were sacrificed 24 hours later (n = 2–6; a representative experiment out of two is shown). A-D. Histological analysis (A) and BALF measurements (B & C) showed increased inflammation and edema in the lungs of the transgenic mice with systemic overexpression of ATX as a result of increased BALF ATX activity (D). On the contrary, histological analysis (A) and BALF measurements (E-G) showed non-significant effects in the lungs of the heterozygous knock-out mice as a result of decreased ATX activity levels.

doi:10.1371/journal.pone.0133619.g006

(together with fibroblast recruitment) of the observed protection from BLM-induced chronic pulmonary inflammation and fibrosis upon LPAR1 genetic deletion [20] (where no inflammatory changes were observed, especially in early time points) or pharmacologic inhibition [19], further supporting a differential role of ATX/LPA in acute vs chronic inflammation. The differences in LPA/LPAR1-mediated endothelial barrier functions in acute and chronic pulmonary inflammatory animal models suggest that the reported effects of LPA in endothelial





permeability may need chronic exposure of target cells. Indeed, LPA effects in pulmonary endothelial permeability were found to increase with time (and of course concentration)[41]. Accordingly, chronically elevated serum ATX levels in Tga1t1Enpp2 mice increased LPS-induced acute lung injury by increasing both vascular leak and inflammation (Fig 6). On the contrary the systemic levels of ATX/LPA had no effect in chronic pulmonary inflammation and edema [18], perhaps due to the local expression of ATX leading to chronic LPA exposure

of endothelial cells and a terminal increase of endothelial permeability that cannot be modulated further.

The likely differential involvement of ATX/LPA in acute inflammation could possibly be also attributed in part to macrophage specific ATX expression. Very few (<3%) macrophages infiltrate LPS challenged lungs and our results have shown that they don't contribute to the BALF ATX load nor to disease development (Fig 5). However, reducing macrophage (the most abundant, >60%, infiltrating cell type) ATX expression in BLM-induced chronic pulmonary inflammation and fibrosis reduced both ATX BALF load and disease development [18].

Moreover, a more prominent role of ATX/LPA in chronic inflammation is consistent with their role in cancer [16], given the increasing links of chronic inflammation and carcinogenesis. Conditional deletion of ATX from bronchial epithelial cells that although had minor effects in LPS-induced ALI, attenuated the development of both pulmonary inflammation and fibrosis [18], as well urethane-induced lung cancer [42]. The issue is currently investigated in a more suitable context for such studies, namely liver pathogenesis.

Finally, any biological outcome of increased ATX/LPA levels would depend on the abundance and activity of the different LPA receptors in different cell types participating in the different phases of an inflammatory response, especially given the reported anti-inflammatory effects of LPA/LPAR2 on innate immune responses in the lung [43] and the suggested roles of LPA in the regulation of adaptive immune responses [44]. Therefore, the complete understanding of the involvement of ATX/LPA in the various forms of inflammation will require precise knowledge of the spatiotemporal regulation of ATX and LPA receptors expression, as well as the cell-specific LPA effects in the different cell types involved in inflammatory responses.

Acknowledgments

We would like to thank I. Forster for the LysM-Cre mice, G. Mills for the Tga1t1Ennp2 transgenic mice, G. Jiang and J. Zhang for the re-synthesis of the GWJ-A-23 ATX inhibitor.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NO VA. Performed the experiments: MM NO CM AK EK. Analyzed the data: MM NO CM AK EK. Contributed reagents/materials/analysis tools: GP. Wrote the paper: MM VA.

References

- Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. JAMA. 2012; 307(23):2526–33. Epub 2012/07/17. doi: <u>10.</u> <u>1001/jama.2012.5669</u> PMID: <u>22797452</u>.
- Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest. 2012; 122(8):2731–40. Epub 2012/08/02. doi: <u>10.1172/jci60331</u> PMID: <u>22850883</u>; PubMed Central PMCID: PMC3408735.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008; 295(3):L379–99. Epub 2008/07/16. doi: <u>10.1152/ajplung.00010.2008</u> PMID: <u>18621912</u>; PubMed Central PMCID: PMC2536793.
- Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. Expert Rev Respir Med. 2010; 4(6):773–83. Epub 2010/12/07. doi: <u>10.1586/ers.10.71</u> PMID: <u>21128752</u>.
- Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin—an LPA producing enzyme with diverse functions. J Biochem. 2010; 148(1):13–24. Epub 2010/05/25. doi: <u>10.1093/jb/mvq052</u> PMID: <u>20495010</u>.
- Perrakis A, Moolenaar WH. Autotaxin: structure-function and signaling. J Lipid Res. 2014. Epub 2014/ 02/20. doi: <u>10.1194/jir.R046391</u> PMID: <u>24548887</u>.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. Trends in biochemical sciences. 2005; 30(10):542–50. PMID: <u>16125936</u>.

- Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. The Journal of cell biology. 2002; 158(2):227–33. doi: <u>10.1083/jcb.200204026</u> PMID: <u>12119361</u>
- Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. Semin Cell Dev Biol. 2004; 15(5):477–89. Epub 2004/07/24. doi: <u>10.1016/j.semcdb.2004.05.001</u> [doi] S1084952104000631 [pii]. PMID: <u>15271293</u>.
- van Meeteren LA, Moolenaar WH. Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. Progress in lipid research. 2007; 46(2):145–60. PMID: <u>17459484</u>.
- 11. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. Nature reviews. 2003; 3(8):582–91. PMID: <u>12894246</u>.
- Moolenaar W. H., van Meeteren L. A., Giepmans B. N. G. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. Bioessays. 2004; 26(8):870–81. PMID: <u>15273989</u>
- Luquain C, Sciorra VA, Morris AJ. Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things. Trends in biochemical sciences. 2003; 28(7):377–83. PMID: <u>12878005</u>.
- Yanagida K, Kurikawa Y, Shimizu T, Ishii S. Current progress in non-Edg family LPA receptor research. Biochim Biophys Acta. 2013; 1831(1):33–41. Epub 2012/08/21. doi: S1388-1981(12)00168-0 [pii] doi: <u>10.1016/j.bbalip.2012.08.003</u> PMID: <u>22902318</u>.
- Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA Receptor Signaling: Pharmacology, Physiology, and Pathophysiology. J Lipid Res. 2014. Epub 2014/03/20. doi: <u>10.1194/jlr.R046458</u> PMID: <u>24643338</u>.
- Barbayianni E, Kaffe E, Aidinis V, Kokotos G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. Progress in lipid research. 2015; 58:76–96. Epub 2015/02/24. doi: <u>10.1016/j.plipres.2015.02.001</u> PMID: <u>25704398</u>.
- Magkrioti C, Aidinis V. ATX and LPA signalling in lung pathophysiology. World J Respirol. 2013; 3 (3):77–103. Epub November 28. doi: <u>10.5320/wjr.v3.i3.77</u>
- Oikonomou N, Mouratis MA, Tzouvelekis A, Kaffe E, Valavanis C, Vilaras G, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012; 47 (5):566–74. Epub 2012/06/30. doi: <u>10.1165/rcmb.2012-0004OC</u> rcmb.2012-0004OC [pii]. PMID: <u>22744859</u>.
- Swaney JS, Chapman C, Correa LD, Stebbins KJ, Bundey RA, Prodanovich PC, et al. A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. Br J Pharmacol. 2010; 160(7):1699–713. PMID: <u>20649573</u>. doi: <u>10.1111/j.1476-5381.2010.00828.x</u>
- Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. Nat Med. 2008; 14(1):45–54. PMID: <u>18066075</u>.
- Shea BS, Tager AM. Role of the lysophospholipid mediators lysophosphatidic acid and sphingosine 1phosphate in lung fibrosis. Proc Am Thorac Soc. 2012; 9(3):102–10. Epub 2012/07/18. doi: <u>10.1513/</u> <u>pats.201201-005AW PMID: 22802282</u>.
- Zhao Y, Natarajan V. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors: role in airway inflammation and remodeling. Biochim Biophys Acta. 2013; 1831(1):86–92. Epub 2012/07/20. doi: <u>10.1016/j.bbalip.</u> 2012.06.014 PMID: 22809994; PubMed Central PMCID: PMC3491109.
- Tager AM. Autotaxin emerges as a therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis: limiting fibrosis by limiting lysophosphatidic acid synthesis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012; 47(5):563–5. Epub 2012/ 11/06. doi: 47/5/563 [pii] doi: <u>10.1165/rcmb.2012-0235ED</u> PMID: <u>23125419</u>; PubMed Central PMCID: PMC3547105.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, et al. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. Dev Biol. 2010; 339(2):451–64. PMID: 20079728. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.01.007
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. Transgenic Res. 1999; 8(4):265–77. Epub 2000/01/06. PMID: 10621974.
- Ingenito EP, Mora R, Cullivan M, Marzan Y, Haley K, Mark L, et al. Decreased surfactant protein-B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 25(1):35–44. Epub 2001/07/27. doi: 10.1165/ajrcmb.25.1.4021 PMID: 11472973.
- Kotanidou A, Loutrari H, Papadomichelakis E, Glynos C, Magkou C, Armaganidis A, et al. Inhaled activated protein C attenuates lung injury induced by aerosolized endotoxin in mice. Vascul Pharmacol. 2006; 45(2):134–40. Epub 2006/09/09. doi: <u>10.1016/j.vph.2006.06.016</u> PMID: <u>16959545</u>.
- Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, Sevastou I, Nikolaidou-Katsaridou N, Zhao Z, et al. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. J Exp

Med. 2012; 209(5):925–33. Epub 2012/04/12. doi: jem.20112012 [pii] doi: <u>10.1084/jem.20112012</u> PMID: <u>22493518</u>.

- Nikitopoulou I, Sevastou I, Madan D, Prestwich GD, Aidinis V. A bromo-phosphonate analogue of lysophosphatidic acid attenuates the development of collagen induced arthritis. PLoS One. 2013;in press.
- Ganguly K, Stoeger T, Wesselkamper SC, Reinhard C, Sartor MA, Medvedovic M, et al. Candidate genes controlling pulmonary function in mice: transcript profiling and predicted protein structure. Physiol Genomics. 2007; 31(3):410–21. Epub 2007/09/07. doi: 00260.2006 [pii] doi: <u>10.1152/</u> physiolgenomics.00260.2006 PMID: <u>17804602</u>.
- Huang LS, Fu P, Patel P, Harijith A, Sun T, Zhao Y, et al. Lysophosphatidic Acid Receptor 2 Deficiency Confers Protection Against Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2013. Epub 2013/07/03. doi: <u>10.1165/rcmb.2013-00700C</u> PMID: <u>23808384</u>.
- Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011; 44(5):725–38. Epub 2011/05/03. doi: <u>10.1165/rcmb.2009-0210ST</u> PMID: <u>21531958</u>.
- Zhao J, He D, Berdyshev E, Zhong M, Salgia R, Morris AJ, et al. Autotaxin induces lung epithelial cell migration through lysoPLD activity-dependent and-independent pathways. The Biochemical journal. 2011; 439(1):45–55. Epub 2011/06/24. doi: BJ20110274 [pii] doi: <u>10.1042/BJ20110274</u> PMID: <u>21696367</u>.
- Kennedy M, Phelps D, Ingenito E. Mechanisms of surfactant dysfunction in early acute lung injury. Exp Lung Res. 1997; 23(3):171–89. Epub 1997/05/01. PMID: <u>9184787</u>.
- Zhao J, He D, Su Y, Berdyshev E, Chun J, Natarajan V, et al. Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011; 301(4):L547–56. Epub 2011/08/09. ajplung.00058.2011 [pii] doi: <u>10.</u> <u>1152/ajplung.00058.2011</u> PMID: <u>21821728</u>; PubMed Central PMCID: PMC3191756.
- Yang Y, Mou L, Liu N, Tsao MS. Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. American journal of respiratory cell and molecular biology. 1999; 21(2):216–22. PMID: <u>10423404</u>.
- Oikonomou N, Harokopos V, Zalevsky J, Valavanis C, Kotanidou A, Szymkowski DE, et al. Soluble TNF Mediates the Transition from Pulmonary Inflammation to Fibrosis. PLoS ONE. 2006; 1(1):e108.
- Pamuklar Z, Federico L, Liu S, Umezu-Goto M, Dong A, Panchatcharam M, et al. Autotaxin/lysopholipase D and Lysophosphatidic Acid Regulate Murine Hemostasis and Thrombosis. J Biol Chem. 2009; 284 (11):7385–94. Epub Jan 12. PMID: <u>19139100</u>. doi: <u>10.1074/jbc.M807820200</u>
- Jiang G, Madan D, Prestwich GD. Aromatic phosphonates inhibit the lysophospholipase D activity of autotaxin. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2011; 21(17):5098–101. Epub 2011/04/15. doi: S0960-894X(11)00387-8 [pii] doi: <u>10.1016/j.bmcl.2011.03.068</u> PMID: <u>21489790</u>; PubMed Central PMCID: PMC3140587.
- Park GY, Lee YG, Berdyshev E, Nyenhuis S, Du J, Fu P, et al. Autotaxin production of Lysophosphatidic Acid Mediates Allergic Asthmatic Inflammation. Am J Respir Crit Care Med. 2013. Epub 2013/09/ 21. doi: <u>10.1164/rccm.201306-1014OC</u> PMID: <u>24050723</u>.
- Ren Y, Guo L, Tang X, Apparsundaram S, Kitson C, Deguzman J, et al. Comparing the differential effects of LPA on the barrier function of human pulmonary endothelial cells. Microvasc Res. 2013; 85:59–67. Epub 2012/10/23. doi: S0026-2862(12)00167-7 [pii] doi: <u>10.1016/j.mvr.2012.10.004</u> PMID: <u>23084965</u>.
- 42. Oikonomou N, Thanasopoulou A, Stathopoulos EN, Syrigos K, Aidinis V. Decreased Lung Tumorigenesis In Mice With Conditionally Inactivated Enpp2 Gene In CC10+ (Clara) Cells. A61 MOLECULAR PATHOGENESIS OF LUNG CANCER. American Thoracic Society International Conference Abstracts: American Thoracic Society; 2010. p. A2056-A.
- 43. Emo J, Meednu N, Chapman TJ, Rezaee F, Balys M, Randall T, et al. Lpa2 Is a Negative Regulator of Both Dendritic Cell Activation and Murine Models of Allergic Lung Inflammation. J Immunol. 2012. Epub 2012/03/20. doi: jimmunol.1102956 [pii] doi: <u>10.4049/jimmunol.1102956</u> PMID: <u>22427635</u>.
- Knowlden S, Georas SN. The Autotaxin-LPA Axis Emerges as a Novel Regulator of Lymphocyte Homing and Inflammation. J Immunol. 2014; 192(3):851–7. doi: <u>10.4049/jimmunol.1302831</u> PMID: <u>24443508</u>.





Hepatocyte Autotaxin Expression Promotes Liver Fibrosis and Cancer

Eleanna Kaffe,¹ Aggeliki Katsifa,¹ Nikos Xylourgidis,¹ Ioanna Ninou,¹ Markella Zannikou,¹ Vaggelis Harokopos,¹ Pelagia Foka,² Alexios Dimitriadis,² Kostas Evangelou,³ Anargyros N. Moulas,⁴ Urania Georgopoulou,² Vassilis G. Gorgoulis,^{3,5,6} George N. Dalekos,⁷ and Vassilis Aidinis¹

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D that catalyzes the production of lysophosphatidic acid (LPA), a pleiotropic growth-factor-like lysophospholipid. Increased ATX expression has been detected in various chronic inflammatory disorders and different types of cancer; however, little is known about its role and mode of action in liver fibrosis and cancer. Here, increased ATX expression was detected in chronic liver disease (CLD) patients of different etiologies, associated with shorter overall survival. In mice, different hepatotoxic stimuli linked with the development of different forms of CLDs were shown to stimulate hepatocyte ATX expression, leading to increased LPA levels, activation of hepatic stellate cells (HSCs), and amplification of profibrotic signals. Hepatocyte-specific, conditional genetic deletion and/or transgenic overexpression of ATX established a liver profibrotic role for ATX/LPA, whereas pharmacological ATX inhibition studies suggested ATX as a possible therapeutic target in CLDs. In addition, hepatocyte ATX ablation and the consequent deregulation of lipid homeostasis was also shown to attenuate hepatocellular carcinoma (HCC) development, thus implicating ATX/LPA in the causative link of cirrhosis and HCC. *Conclusion:* ATX is a novel player in the pathogenesis of liver fibrosis and cancer and a promising therapeutic target. (HEPATOLOGY 2017;65:1369-1383).

S everal chronic liver disorders (CLDs), including chronic viral hepatitis, alcoholic liver disease, and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH), cause hepatocellular injury and necrosis, triggering, in turn, inflammation and a wound-healing response characterized by the accumulation of extracellular matrix (ECM). If the insult is acute or self-limited, wound healing responses quickly restore normal tissue homeostasis and liver architecture. However, if the insult persists, the

ensuing chronic inflammation and ECM accumulation overrides the ability of liver to regenerate, leading to fibrosis and ultimately to cirrhosis, a liver disorder with dismal prognosis and the major risk factor for the development of hepatocellular carcinoma (HCC).⁽¹⁾

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D catalyzing the hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC) to lysophosphatidic acid (LPA), a pleiotropic growth-factor–like phospholipid.⁽²⁾ LPA has numerous effects in almost all cell types through its G-

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Abbreviations: Acta2, actin, alpha 2, smooth muscle, aorta; Afp, alpha-fetoprotein; Alb, albumin; ALD, alcoholic liver disease; ALT, alanine aminotransferase; a1t1, α1-antitrypsin inhibitor; ATX, autotaxin; CLDs, chronic liver disorders; Col3a1, collagen type III alpha 1 chain; ConA, concanavalin A; CVH, chronic viral hepatitis; Cxcx, C-X-C chemokine receptor; Cyp2S1, cytochrome P450 2S1; DEGs, differentially expressed genes; DEN, diethylnitrosamine; ECM, extracellular matrix; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FA, fatty acid; GPCRs, G-protein-coupled receptors; HA, hyaluronic acid; Heps, hepatocytes; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HPLC, high-performance liquid chromatography; HSCs, hepatic stellate cells; II, interleukin; JFH-1, Japanese fulminant hepatitis type 1; KCs, Kupffer cells; LPA, lysophosphatidic acid; LPAR, LPA receptor; LPC, lysophoshatidylcholine; LPS, lipopolysaccharide; MS/MS, tandem mass spectrometry; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; NF-κB, nuclear factor kappa B; PCNA, proliferative cell nuclear antigen; PE, phosphatidyl ethanolamine; Ppap2, phospholipid phosphatases; PLA2, phospholipase A2; RAs, retinoic acids; S1P, sphingosine-1-phosphate; Scd2, stearoyl-CoA desaturase 2; aSMA, alpha-smooth muscle actin; SREBPs, sterol regulatory element-binding proteins; TAG, triacylglycerol; Tnf, tumor necrosis factor; TOOS, N-ethyl-N-sulphohydroxypropyl-m-toluide; TUDCA, taurourdeoxycholate; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

Received July 18, 2016; accepted November 27, 2016.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28973/suppinfo.

Copyright © 2016 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.28973

protein-coupled receptors (GPCRs; LPAR1-6), which exhibit overlapping specificities and widespread distribution.⁽³⁾ Up-regulated ATX expression has been detected in various chronic inflammatory disorders and different types of cancer.^(4,5) ATX was shown to play a decisive role in the development of pulmonary fibrosis⁽⁶⁾; however, little is known about its role and mode of action in other fibroproliferative diseases.

Expanding and complementing previous studies,⁽⁷⁾ we have shown increased serum ATX levels in CLDs of different etiologies, correlating with decreased survival, as well as increased liver ATX mRNA expression, in both CLD and HCC patients. Accordingly, increased hepatocyte ATX and liver LPA levels were shown in animal models of experimental toxic hepatitis and HCC. Genetic and pharmacological interventions *in vivo*, coupled with *ex vivo* studies, indicated that ATX disturbs lipid homeostasis and promotes the development of both fibrosis and cancer.

Materials and Methods

HUMAN SUBJECTS

Clinical and personal characteristics of patients are presented in Supporting Table S2. Clinical investigations have been conducted according to Declaration of Helsinki principles. All patients and controls consented for anonymous research usage of their samples, as approved by the Ethical Committee of the University of Thessaly Medical School.

ANIMAL EXPERIMENTATION

All experimental mice were bred and maintained in a C57Bl6/J genetic background (>10 generations) under

specific pathogen free conditions at 20-22°C, $55 \pm 5\%$ humidity, and a 12-hour light-dark cycle; water and food (irradiated standard diet Mucedola #4RF21) were provided *ad libitum*. Generation and genotyping protocols for *Enpp2*^{n/n}⁽⁸⁾ Tg*Alb-Cre*,⁽⁹⁾ R26R,⁽¹⁰⁾ and Tg*a1t1hEnpp2*⁽¹¹⁾ mice have been described. All randomly assigned experimental controls were littermate sex- and age-matched mice. All reported experimentation in mice for this project, in line with the ARRIVE guidelines, was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (#377) and the Veterinary service and Fishery Department of the local governmental prefecture (#5366).

Acute and chronic intoxication with diethylnitrosamine (DEN) and/or CCl₄, liver histology, liver cell isolation and hepatitis C virus (HCV) infection, highperformance liquid chromatography (HPLC)/electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS), ATX activity assay (TOOS), enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), western blotting, RNA extraction and real-time RT-PCR are described in the Supporting Information.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis is indicated accordingly in the individual figure legends.

Results

INCREASED ATX EXPRESSION IN CLD PATIENTS OF DIFFERENT ETIOLOGIES

To interrogate human patients liver mRNA expression of ATX, as well as of LPA receptors (*LPAR1-6*) and phospholipid phosphatases (*PPAP2A-C/LPP1-3*),

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Athens, Greece; ²Laboratory of Molecular Virology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece; ³Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Athens, Athens, Greece; ⁴Laboratory of Biochemistry, Technological Educational Institute of Thessaly, Larissa, Greece; ⁵Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Athens, Greece; ⁶Institute for Cancer Sciences, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, UK and ⁷Department of Medicine and Research Laboratory of Internal Medicine, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Vassilis Aidinis, Ph.D. Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming 34 Fleming Street 16672 Athens, Greece E-mail: V.Aidinis@Fleming.gr Tel: +302109654382 we performed data mining in all CLD patient microarray data sets publically available at NCBI/GEO (Supporting Table S1A). Statistically significant increased ATX mRNA expression was found in the majority of data sets/patient cohorts; the same is true for *LPAR6*, previously suggested to support the tumorigenicity of HCC.⁽¹²⁾ Similarly, increased ATX mRNA levels were also detected in HCC data sets (Supporting Table S1B), accompanied by decreased expression of *PPA2PB* suggested to mediate LPA turnover.⁽¹³⁾

Increased ATX sera levels were identified in patients with CVH (including HCV and hepatitis B virus), as well as in ALD and NASH patients (Fig. 1A; Supporting Table S2), suggesting ATX as a biomarker in all CLDs regardless of the initiating insult. Noteworthy, the CVH patient group, exhibiting a large number of values close to the normal range, included 18 samples from patients with inactive disease as a result of the appropriate antiviral treatment. Interestingly, ATX levels in responding patients were significantly lower (155 [43-467] ng/ mL; P = 0.04) than 17 treatment-naïve CVH patients with an active disease (as defined by biochemical activity and/or viral replication; 285 [109-3,500] ng/mL).

Significant, albeit weak, associations of serum ATX levels were also discovered with a number of surrogate disease parameters (Supporting Table S3), including aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase (ALT) and bilirubin, indicative of hepatic damage and loss of function, respectively. Importantly, low serum ATX levels were significantly associated with longer overall survival in a 10-year follow-up period (Fig. 1B), further suggesting ATX as a prognostic indicator of disease severity.

INCREASED, WELL-TIMED LIVER ATX EXPRESSION IN EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

Chronic exposure to CCl₄ resulted, as expected, in focal, confluent, and portal necrosis, followed by portal inflammatory infiltration (Supporting Fig. S1A,B) of different cell types (Supporting Fig. S1C-J). Apoptosis (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling [TUNEL]⁺ cells) was profound at 4 weeks post-CCl₄ administration (Supporting Fig. S1K,L), accompanied by a strong regenerative response and hepatocytes (Heps) proliferation (proliferative cell nuclear antigen [PCNA]⁺ cells; Supporting Fig. S1M, N), as well as increased glycogen and neutral lipids deposition (Supporting Fig. S1O-Q). The initial



FIG. 1. Increased serum ATX levels in CLD patients of different etiologies, correlating with poor survival. (A) ATX serum levels in CVH (n = 35), NASH (n = 12), and ALD (n = 12) patients, as measured with ELISA, in comparison to healthy controls (n = 20). Median values are shown; *P < 0.05 to control values; Mann-Whitney test. (B) High ATX levels (2-fold higher than the normal values) are associated with poor cumulative survival, in a Kaplan-Meier survival curve. n = 59; *P < 0.05, log-rank (Mantel-Cox) test.

cytotoxic and inflammatory response to CCl₄ chronic administration was followed by a strong fibrotic response (Supporting Fig. S1R,S) and gradual collagen deposition (Supporting Fig. S2A), leading to hepatic damage at late stages (8-12 weeks; Supporting Fig. S2B,C), resulting in aberrant liver clearance functions (Supporting Fig. S2D).

Robust liver expression of ATX was detected (Fig. 2A-C) at 4w post CCl₄ administration (as well as after continuous administration of thioacetamide; Supporting Fig. S3), following an increased inflammatory gene expression profile (tumor necrosis factor [Tnf], interleukin [II]–1b, and II–6; Supporting Fig. S2E). Fibrotic gene expression (transforming growth factor beta, alpha-smooth muscle actin/actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [aSMA/Acta2], and collagen type III alpha 1 chain [Col3a1]) increased gradually throughout



disease development (Supporting Fig. S2F); however, significant aSMA protein expression was first detected at 4 weeks (Fig. 2C), the peak of ATX expression, accompanied by a major shift in the C-X-C chemokine receptor (*Cxcr*)4/*Cxcr*7 mRNA expression ratio (Supporting Fig. S2G), increased cytochrome P450 2S1 (*Cyp2S1*) mRNA levels (Supporting Fig. S2G) and increased plasma levels of retinoic acids (RAs; Supporting Fig. S2H). Therefore, CCl₄-induced, ATX well-timed liver expression coincided with the expression of several markers of HSC activation, suggesting a role for ATX in the modulation of HSC physiology and establishment of fibrosis.

DISORDERED PHOSPHOLIPID HOMEOSTASIS IN EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

To possibly correlate ATX levels with the levels of its enzymatic product, LPA, as well as to detect other possible disturbances in lipid homeostasis, we next performed lipidomic analysis of CCl₄-induced disease progression with HPLC-MS/MS. Clustering of lipid expression levels identified four major groups of lipids with deregulated expression (Fig. 2E).

The first group was composed mainly of LPA species, exhibiting comparatively the highest upregulation in liver tissue, peaking at 4 weeks both in liver tissue and plasma (Fig. 2E and Supporting Fig. S4A,B). As in human CLD patients (Supporting Table S1A), *Lpar6* exhibited the highest expression in the liver, peaking at 4 weeks (Supporting Fig. S2I). Therefore, the increased liver ATX expression upon damage led to local increases of LPA, possibly further sustained by the identified decrease in *Ppap2b* levels (Supporting Fig. S2J).

A second group of lipids was composed mainly of LPC species peaking at 4 weeks (Fig. 2E and Supporting Fig. S4E,F). Accordingly, most liver-abundant phospholipase A2 (*Pla2*) isoforms, largely responsible for liver LPC synthesis, were found up-regulated at 2-4 weeks post-CCl₄ administration (Supporting Fig. S2K). In agreement, expression profiling of all publicly available human CLD data sets, as described above, indicated a liver overexpression of PLA2 g4C, g5, and g7 isoforms (Supporting Table S1C), suggesting a parallel involvement of the PLA2/LPC axis in the pathogenesis of CLDs and toxin-induced hepatitis.

The third group (Fig. 2E) was composed mainly from triacylglycerols (TAGs), in agreement with the observed neutral lipid deposition (Supporting Fig. S1O-Q). The last group, a clustering node by itself, was composed mainly of phosphatidyl ethanolamine (PE) and lysoPE species that surged in the plasma, most likely as a direct toxic effect of CCl_4 on cell membranes.

HEPATOCYTE INJURY OR INFECTION STIMULATES ATX EXPRESSION

The increased ATX expression in the liver was localized mainly to Heps by double immunolabeling, which, furthermore, indicated that aSMA-expressing myofibroblasts are not major producers of ATX (Fig. 3A). Accordingly, fractionated primary Heps were found to produce and secrete the vast majority of ATX (Fig. 3B,C), further confirming the increased Hep ATX expression upon CCl₄ intoxication (Fig. 3D).

ATX expression from Heps (and Kupffer cells [KCs]) *ex vivo* was stimulated by TNF and lipopolysaccharide (LPS; Fig. 3E,F), whereas elevated liver ATX levels were detected upon concanavalin A (ConA)-induced, T-cell-dependent, and TNFmediated, inflammatory Heps damage *in vivo* (Supporting Fig. S5).⁽¹⁴⁾ Remarkably, ATX expression was also stimulated upon HCV (Japanese fulminant hepatitis type 1; JFH-1) infection in the permissive Huh7.5 hepatoma cell line or pJFH-1 RNA transfection in Hep2G cells (Supporting Fig. S6A,B).

Remarkably, LPC (18:1) was also shown to be a potent stimulus of ATX expression from Heps *ex vivo*

FIG. 2. Chronic CCl₄ intoxication stimulates ATX expression and distorts lipid homeostasis. (A) In situ hybridization with an ATX antisense probe and IHC with an a-ATX monoclonal antibody (7A5) in liver sections at the indicated time points post-CCl₄ administration in WT mice. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; in blue). (B) Q-RT-PCR analysis for ATX (*Enpp2*) mRNA expression in liver extracts at the indicated time points of the same mice. (C) Western blotting in liver extracts for ATX, aSMA, and Tubulin as loading control. (D) Plasma ATX activity as measured with the TOOS assay. (E) Lipidomic analysis with HPLC-ESI/MS/MS of liver tissue and plasma samples at 2-12 weeks post-CCl₄ administration in WT mice. The heatmap includes, for direct comparison purposes, the corresponding lipid profiles from CCl₄-treated, as well as DEN/CCl₄-treated (HCC), *AlbEnpp2^{-/-}* mice. Fold changes to the respective littermate oil-treated control values are shown; clustering was performed using the Euclidean's distance metrics. All values in all panels are mean \pm SEM; n = 4-6. **P* < 0.05; analysis of variance post-hoc test. Scale bars: 150 µm. Abbreviations: Ctrl, control; hyb., hybridization; IHC, immunohistochemistry; w, weeks; WT, wild type.



FIG. 3. Hepatocyte-specific ATX expression is stimulated by a variety of liver pathogenic stimuli. (A) Representative double IHC staining for ATX and albumin or aSMA in liver sections, counterstained with DAPI, 4 weeks post-CCl₄ administration and the relative quantifications. (B,E) Q-RT-PCR analysis for ATX (*Enpp2*) relative mRNA expression in primary liver cells *ex vivo*. (C,F) ATX activity, as measured with the TOOS assay, in the supernatants of the cells shown in (B) and (E), respectively. (D) Representative IHC for ATX in the indicated cultured hepatocytes. All values are mean \pm SEM; n = 3-6; **P* < 0.05; analysis of variance post-hoc test. Scale bar: 50 μ m. Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FC, fold change; IHC, immunohistochemistry; LSCs, liver stellate cells; tRA, trans-retinoic acid; w, weeks.

(Supporting Fig. S6C,D), while promoting their apoptosis (Supporting Fig. S6E,F). In agreement, LPC administration (18:1; 60 mg/kg intravenously) in mice *in vivo* led to an increase of both ATX and apoptosis (Supporting Fig. S6G-J), suggesting LPC as a potent ATX inducer in the liver. On the contrary, no major LPA effect in hepatocyte ATX expression was observed (Fig. 3E).⁽¹⁵⁾

HEPATOCYTE-SPECIFIC ATX EXPRESSION ACTIVATES HEPATIC STELLATE CELLS AND AMPLIFIES THE FIBROTIC RESPONSE

To examine whether Hep-specific ATX expression plays a pathogenic role in the development of liver



FIG. 4. Hepatocyte-specific ATX genetic deletion ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis. (Aa-d) Representative staining images of liver sections 4w post CCl₄ administration in *AlbEnpp2^{-/-}* and control (Ctrl; Tg*Alb-Cre*) littermate mice. Scale bars: 50 μ m: a; 100 μ m: d; 150 μ m: b; 200 μ m: c. (B) Q-RT-PCR analysis for ATX (*Enpp2*) relative mRNA expression in the indicated liver extracts. (C) Liver total LPA levels, as determined with HPLC-ESI/MS/MS. (D) Semi-quantitative scoring of necrosis, apoptosis (TUNEL⁺ cells), hydropic cells, inflammation and fibrosis at the indicated mice at 4w post CCl₄ administration. (E) Liver collagen deposition was quantified by hydroxyproline levels (F) Q-RT-PCR analysis of pro-fibrotic gene expression in liver extracts. Q-RT-PCR arbitrary ($\Delta\Delta$ Ct) values were normalized to the expression levels of *B2m* in the same samples and presented as fold change to control values (oil treated mice). Blind evaluation of all histology scoring was performed from 2 reviewers and confirmed by 2 independent expert pathologists. All values are mean +/- SEM; n=3-9. *p<0.05 to the respective control or indicated values; Unpaired, two-sided Student's t-test, or Mann-Whitney test for non-normal distributions. Abbreviations: H&E, hematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; w, weeks.

fibrosis, ATX was genetically deleted from Heps by mating the conditional knockout mouse for ATX $(Enpp2^{n/n})^{(8)}$ with a transgenic mouse line expressing the Cre recombinase under the tight control of the albumin (Alb) promoter (Tg*Alb-Cre*), directing efficient recombination of floxed alleles specifically to Heps (Supporting Fig. S7A,B).^(9,10) Accordingly, no Hep ATX expression could be detected in *AlbEnpp2^{-/-}* mice 4 weeks post-CCl₄ administration (Fig. 4Aa,B), followed by diminished liver and plasma LPA levels (Fig. 4C and Supporting Fig. S7C,D) and a complete reversal of the corresponding lipidomic profiles (Fig. 2E), thus suggesting that CCl₄-induced Heps-specific ATX expression results in local LPA production, that is also reflected in the circulation.

Abrogation of liver ATX/LPA production resulted in diminished necrosis (Fig. 4Ab,D), apoptosis

(Supporting Fig. S7Ea and Fig. 4D), and proliferation (Supporting Fig. S7Eb and Fig. 4D); however, the number of hydropic cells increased in the absence of ATX (Fig. 4Ab,D), suggesting that ATX/LPA might interfere with ionic and/or fluid homeostasis.⁽¹⁶⁾ The overall liver inflammatory histopathological score was not significantly reduced (Fig. 4D), although parenchymal inflammation appeared more diffuse rather than periportal (Fig. 4Ab), inflammatory gene expression was modulated (Supporting Fig. S7F), and a reduction in the number of infiltrating Gr1⁺ cells and activated macrophages was observed (Supporting Fig. S7I). Moreover, ATX deletion diminished the deposition of neutral lipids, but had no effect on glycogen deposition (Supporting Fig. S7E). More important, ATX ablation led to a diminished histopathological fibrotic score (Fig. 4D), consistent with decreased


FIG. 5. ATX/LPA promote HSC activation. (A) Hepatocyte-specific genetic deletion in $AlbEnpp2^{-/}$ mice decreases Acta2 liver mRNA expression, whereas (B) transgenic overexpression of ATX in Tga1t1-hEnpp2 mice increases it, 24 hours postacute exposure to CCl₄, as determined with Q-RT-PCR analysis; n = 5-12. (C) Representative aSMA staining images of serum-starved, LPA-stimulated mouse primary HSCs ex vivo and respective quantification. (D) Representative images of F-actin (phalloidin) staining in the same cells and respective quantification. (E) Q-RT-PCR analysis of Bax/ Bcl-2 mRNA expression, as determined with Q-RT-PCR; n = 3. Q-RT-PCR arbitrary ($\Delta\Delta$ Ct) values were normalized to the expression levels of B2m in the same samples and presented as fold change to control values. All values are mean \pm SEM; *P < 0.05to respective control values; unpaired, two-sided Student t test; scale bars: 60 μ m (C) and 30 μm (E). Abbreviations: *B2m*, beta-2-microglobulin; Bax, Bcl-2associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; $\Delta\Delta Ct$, delta delta threshold cycle; Ctrl, control; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Veh, vehicle; WT, wild type.

collagen production (Fig. 4E), profibrotic gene expression (Fig. 4F), aSMA expression (Fig. 4Ad), as well as liver damage (Supporting Fig. S7G,H).

Conversely, CCl₄ administration to Tga1t1-hEnpp2 mice, overexpressing a human ATX transgene in Heps driven by the human α 1-antitrypsin inhibitor (a1t1) promoter,⁽¹¹⁾ resulted in increased collagen deposition and fibrosis (Supporting Fig. S8). ATX/LPA levels in CCl₄-treated Tga1t1-hEnpp2 mice were not significantly higher than CCl₄-treated wild-type littermates (Supporting Fig. S8G-I), given that transgenic a1t1-driven hATX expression was not CCl₄ induced (Supporting Fig. S8J), suggesting that the chronic exposure to LPA, rather than its absolute levels, exerted the observed profibrotic effect.

In agreement with a chronic role of ATX/LPA pathogenetic effects in liver injury, ATX Heps ablation or overexpression led to minimal changes in the ConA



FIG. 6. Pharmacological ATX inhibition attenuates CCl₄-induced fibrosis. (A) Representative H&E and Sirius Red staining (scale bars, 100 and 200 μ m, respectively) in liver sections 4 weeks post-CCl₄ administration in WT mice treated (2-4 weeks) with PF-8380 or vehicle-treated littermates. (B) Semiquantitative scoring of inflammation, necrosis, and fibrosis in liver sections of the same mice. (C) Liver collagen deposition in livers was quantified by hydroxyproline levels. (D,F) Liver/plasma total LPA levels as measured with HPLC-ESI-MS/MS. (E) Plasma ATX activity measured with TOOS in the same mice. Blind evaluation of all histology scoring was performed from two reviewers and confirmed by two independent expert pathologists. All values are mean \pm SEM; n = 5-7. **P* < 0.05 to vehicle values; unpaired, two-sided Student *t* test or Mann-Whitney test for non-normal distributions. Abbreviations: H&E, hematoxylin and eosin; PF-8380, 3,5-dichlorobenzyl-[4-[3-oxo-3-(2-oxo-2,3-dihydrobenzoxazol-6-yl)propyl]]piperazine-1-carboxylate; w, weeks; WT, wild type.

model (Supporting Fig. S9A-D and S9I-L, respectively), suggesting no major effects of ATX in acute, Tcell-dependent, and TNF-mediated liver inflammatory responses. Likewise, genetic deletion or overexpression of ATX from Heps had also minor effects in acute (single-dose), CCl₄-induced hepatic damage (Supporting Fig. S9E-H and S9M-P, respectively).

Genetic deletion of ATX from hepatocytes also had minor effects in liver regeneration following partial hepatectomy (Supporting Fig. S10A,B), suggesting no major effects of ATX/LPA in hepatocyte proliferation, as observed *in vitro* (Supporting Fig. S10C,D). LPA stimulated *Tnf*, *Il-6*, and *Cxcr4* expression in primary hepatocytes *in vitro* (Supporting Fig. S10C); however, the relative contribution of LPA-induced hepatocyte responses to the overall liver proinflammatory and profibrotic gene expression (Supporting Fig. S2E-G) remains unknown.

Despite the minimum involvement of ATX in acute liver damage, deletion, or overexpression of ATX, in *AlbEnpp2^{-/-}* or Tga1t1-bEnpp2 mice, respectively, modulated accordingly *Acta2/aSMA* liver mRNA levels 24 hours postacute exposure to CCl₄ (Fig. 5A,B), further supporting a decisive role of ATX/LPA in hepatic stellate cell (HSC) activation. In agreement, LPA stimulation of serum-starved primary HSCs *in vitro* stimulated aSMA expression (Fig. 5C), while promoting the rearrangement of their actin cytoskeleton, and inhibiting their serum-starvation-induced apoptosis (Fig. 5D,E, respectively).

PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF ATX ATTENUATES CCl₄-INDUCED FIBROSIS

To translate the genetic findings into potential treatment options, CCl_4 -treated mice were administered (2-4 weeks post- CCl_4) with 30 mg/kg (intraperitoneally, twice-daily) of PF8380, a potent (half maximal inhibitory concentration, 1.9 nM) and well-characterized^(17,18) ATX inhibitor. Pharmacological ATX inhibition attenuated CCl_4 -induced fibrosis (Fig. 6A-F), confirming the genetic results and suggesting ATX as a potential therapeutic target in liver fibrosis.

HEPATOCYTE-SPECIFIC ATX GENETIC DELETION ATTENUATES HCC DEVELOPMENT

To examine a possible role of ATX/LPA profibrotic effects in HCC development, male $AlbEnpp2^{-/-}$ mice



FIG. 7. Hepatocyte-specific deletion of ATX attenuates HCC development. (A) Genetic deletion of ATX from hepatocytes significantly improves survival upon DEN/CCl₄ treatment. n = 4-14; Gehan-Breslow-Wilcoxon test. (B) Macroscopic liver appearance of DEN/CCl₄-treated *AlbEnpp2^{-/-}* (HCC^{ΔATX}) or control *Enpp2^{n/n}*</sup> littermate mice (HCC). (C) Q-RT-PCR analysis of relative*Enpp2* $mRNA expression in the indicated mouse strains. (D) Tumor number and (E) average size of the largest tumor in the presence or absence of hepatocyte ATX expression. (F) Representative Oil Red-O staining of liver sections (scale bar, 150 <math>\mu$ m) in the same mice and respective quantification. All values are mean ± SEM. n = 7-12. **P* < 0.05 to respective control or indicated values; unpaired, two-sided Student *t* test or Mann-Whitney for non-normal distributions. Abbreviation: Ctrl, control.</sup>

were administered, before CCl₄ intoxication and the observed effects in liver pathophysiology and ATX expression, with DEN (50 mg/kg; intraperitoneally at 15 days postpartum), thus coupling a genotoxic mutagenic insult with toxin-induced fibrosis that results in HCC.⁽¹⁹⁾

All DEN/CCl₄-treated, surviving (60%; Fig. 7A) control mice developed HCC (Fig. 7B). Among them, the majority (70%) developed tumors in all the liver lobes; in the remaining mice, tumorigenesis was confined to the caudate lobes and left lateral lobes (Supporting Fig. S11A). Increased ATX mRNA levels were detected upon HCC development (Fig. 7C); no changes in ATX plasma activity were observed (Supporting Fig. S11B). ATX staining localized in tumor cells, missing from healthy surrounding Heps (Supporting Fig. S11C).

ATX genetic deletion attenuated ATX mRNA and plasma activity levels (Fig. 7C and Supporting Fig. S11B, respectively); however, residual ATX staining in remaining tumors could still be detected (Supporting Fig. S11C), most likely as a result of not complete (<100%) recombination and/or possible ATX attachment to membrane receptors, such as integrins.^(20,21) All (100%) DEN/CCl₄-treated $AlbEnpp2^{-/-}$ mice survived the treatment (Fig. 7A); among them, 30% did not develop any tumors and 45% developed tumors only in some liver lobes (caudate lobes and left lateral lobe; Fig. 7B and Supporting Fig. S11A), suggesting that ATX/LPA amplify oncogenic signals. The dramatic reduction of both tumor number and size (Fig. 7D,E) was also reflected in liver weight (Supporting Fig. S11D). Histological analysis indicated a reduction trend in necrosis, inflammation, and fibrosis (Supporting Fig. S12A-D) and a significant decrease in CD34 and PCNA staining (Supporting Fig. S12E-H); however, the most prominent histological feature observed upon the genetic deletion of ATX was a significant decrease of neutral lipid deposition (Fig. 7F).



FIG. 8. LPA stimulates *SCD* mRNA expression and TAG accumulation in Hep2G cells *in vitro*. (A) Q-RT-PCR analysis of *Scd2* relative liver mRNA expression in the indicated mouse strains and treatments. Ctrl are the littermate controls of *AlbEnpp2^{-/-}*. (B) Q-RT-PCR analysis of *SCD* mRNA expression in serum-starved, LPA-stimulated Hep2G cells *in vitro*. Q-RT-PCR arbitrary ($\Delta\Delta$ Ct) values were normalized to expression levels of *B2m* in the same samples and presented as fold change to vehicle. (C) Representative Oil-Red-O staining of the same cells; scale bar: 150 μ m. (D) Independent quantification of neutral lipids content of the same cells with a colorimetric method. (E) TAG content of LPA-treated Hep2G cells *in vitro*, as determined with HPLC-ESI/MS/MS, presented as fold change to control values (vehicle). All values are mean ± SEM. n = 3-4. **P* < 0.05 to the respective control or indicated values; unpaired, two-sided Student *t* test or Mann-Whitney for non-normal distributions. Abbreviations: Abs, absorbance; *B2m*, beta-2-microglobulin; $\Delta\Delta$ Ct, delta delta threshold cycle; Ctrl, control; Veh, vehicle.

.....

ATX DISTORTS HCC-RELATED FATTY ACID METABOLISM

Lipidomic analysis indicated up-regulated levels of liver LPA upon HCC development, found to be diminished upon the genetic deletion of ATX (Fig. 2E and Supporting Fig. S11F). Noteworthy, Ppap2b mRNA levels were found to be decreased also in HCC (Supporting Fig. S11G), as shown (Supporting Table S1B) for human HCC patients, possibly accounting for the sustainment of LPA levels. Although PPAP2s have been also incriminated for sphingosine-1-phosphate (S1P) degradation,⁽²²⁾ no major differences in S1P levels were observed in HCC (Supporting Fig. S11H); however, large increases in expression of sphingosine-1-phosphate receptor 3 were observed upon HCC development, found to be diminished after ablation of ATX and LPA (Supporting Fig. S11K; Supporting Table S5), in agreement with previous in vitro studies.⁽²³⁾

Strikingly, liver accumulation of some TAG species in DEN/CCl₄-induced HCC was the most prominent feature of the HCC lipidomic profile (Fig. 2E); HCC TAG levels were found reduced in the absence of ATX, in agreement with the observed decreased neutral lipid deposition, suggesting a novel role for ATX/ LPA in HCC-related fatty acid (FA) metabolism.

To obtain mechanistic insights into the mode of action of the ATX/LPA axis in HCC development, we performed whole-liver, genome-wide expression profiling of DEN/CCl₄-induced HCC. Stringent gene set enrichment analysis of statistical significant differentially expressed genes (DEGs) upon HCC development in the absence of ATX identified mostly genes involved in lipid metabolism, as well as genes coding for plasma membrane and actin binding proteins (Supporting Table S4). Expression of a large number of ATX/ LPA-affected genes seem to be regulated by the transcription factor, activator protein 1 (AP-1) (Supporting Table S4), a critical transcriptional regulator of invasion⁽²⁴⁾ reported to be regulated by LPA.⁽⁵⁾

Comparison of HCC^{AATX} and HCC DEGs revealed genes that are up-regulated in the liver upon HCC development, but reverted toward physiological levels in the absence of ATX (Supporting Table S5). The HCC-induced, possibly ATX/LPA-regulated genes (ATX-rDEGs; Supporting Table S5) include alpha-fetoprotein (*Afp*) and glypican 3 (*Gpc3*), established HCC serum markers,⁽²⁵⁾ as well as wellknown markers of oncofetal transformation (*Afp*, *H19*, and brain expressed X-linked 1),^(19,26) proving, on a molecular level, that ATX deletion attenuates HCC.

Among the multiple ATX-rDEGs involved in lipid metabolism, stearoyl-CoA desaturase 2 (*Scd2*) was previously shown to be necessary for the biosynthesis of monounsaturated FA, essential components of TAGs.⁽²⁷⁾ DEN/CCl₄-mediated HCC development induced its expression, whereas ATX deletion attenuated its mRNA levels (Supporting Table S5; confirmed with Q-RT-PCR, Fig. 8A). In agreement, LPA stimulation of HepG2 cells *in vitro* stimulated *SCD* mRNA expression (Fig. 8B), neutral lipid deposition (Fig. 8C,D), and cellular TAG levels (as determined with liquid chromatography/MS; Fig. 8E).

Discussion

Increased ATX sera levels were detected in CLD patients of different etiologies, associated with shorter overall survival and surrogate disease parameters indicative of hepatic damage and loss of function (Supporting Table S3).⁽²⁸⁾ Moreover, increased liver ATX mRNA expression was found in the majority of publically available CLD and HCC microarray data sets, thus suggesting that hepatocyte injury can stimulate autologous ATX expression and that ATX, beyond its diagnostic or prognostic value, might also play a direct role in liver pathophysiology.

In agreement, robust ATX and LPA expression was detected in CCl₄-intoxicated injured mouse livers. ATX expression was localized mainly to hepatocytes, found to be induced by HCV infection, TNFmediated inflammation, as well as exposure to LPC, all pathological stimuli linked with the development of different forms of human CLDs. Interestingly, TNF has been reported to stimulate ATX expression in hepatoma cells in vitro through nuclear factor kappa B $(NF-\kappa B)$,⁽²⁹⁾ whereas LPS, a well-known activator of NF-kB in macrophage-like cells,⁽³⁰⁾ has also been shown to induce ATX expression in monocytic THP-1 cells,⁽³¹⁾ as shown here with primary KCs. LPC has been also shown to activate NF-kB in keratinocytes and pancreatic AR42J cells,^(32,33) whereas the activa-tion of NF-kB is well established in HCV infections.⁽³⁰⁾ Moreover, in silico analysis of the Ennp2 promoter revealed NF-kB target sites, validated by the respective coimmunoprecipitations,⁽³⁴⁾ strongly suggesting that ATX expression in the inflamed liver is

controlled, at least in part, by NF-kB, which had been suggested to link injury, fibrosis, and HCC, depending on cellular context and timing, as well as on activation thresholds.⁽³⁰⁾

Hepatocyte ATX expression and LPA production in CCl₄-intoxicated mouse livers coincided with a proliferative peak of hepatocytes, although no major effect of ATX/LPA in hepatocyte proliferation was observed in vitro, or in hepatectomized mice in vivo. Moreover, hepatocyte-specific ATX deletion and the consequent reduction in local LPA levels attenuated neutral lipid deposition. In agreement and as recently presented,⁽³⁵⁾ hepatocyte-specific ATX deletion abrogated lipid deposition in the liver and the development of steatosis in a more relevant, high-fat-diet-induced NASH metabolic model, associated with reduced expression of major lipogenic genes. However, the relative contribution of ATX/LPA to FA synthesis and TAG deposition in comparison with other converging pathways, as well as exogenous FA sources, remains to be determined.

On the other hand and most importantly, ATX expression also coincided with up-regulated aSMA protein expression, Cyp2S1 mRNA expression, and RA levels; all established markers of HSC activation.⁽³⁶⁾ Deletion or overexpression of ATX from hepatocytes accordingly modulated aSMA levels in all disease models examined, whereas exposure of primary HSCs to LPA promoted cytoskeletal rearrangements, inhibited apoptosis, and stimulated aSMA expression. Moreover, ATX well-timed expression coincided with the transition from regeneration to fibrosis, as shown with a major shift in the expression ratio of Cxcr4/Cxcr7, a recently reported modeled disease hallmark.⁽³⁷⁾ This predominance of CXCR4 over CXCR7 is thought to shift the angiocrine response of liver sinusoidal endothelial cells, which it has been recently shown can be modulated by LPA,⁽³⁸⁾ stimulating proliferation of HSCs and enforcing a profibrotic vascular niche.⁽³⁷⁾ Therefore, CCl₄-induced and LPC-driven, hepatocyte ATX expression enforces the entry to the perpetuation phase of fibrosis development by activating HSCs, directly or indirectly, through LPA, whose levels are possibly sustained in relatively high levels attributable to the downregulation of *Ppap2b* expression, further stimulating collagen production and hepatic fibrosis.

LPC, the main enzymatic substrate of ATX and a potent inducer of its Hep expression, peaked at 4 weeks post-CCl₄ in liver tissue, as also suggested for NAFLD patients.⁽³⁹⁾ Moreover, LPC administration has been reported to promote hepatitis⁽³⁹⁾; interesting-ly, rats fed a high-fat diet displayed elevated serum

ALT levels that correlated with increased *Pla2* mRNA expression and LPC levels,⁽⁴⁰⁾ suggesting that LPC and ATX/LPA could mediate diet and/or obesity effects in liver pathophysiology, as suggested for prostate disease.⁽⁴¹⁾ Different PLA2 isoforms were detected aberrantly expressed in mouse and human fibrotic livers, further supporting liver-specific *de novo* LPC synthesis upon damage, and suggesting a synergy of the PLA2/LPC and LPA/ATX axes in hepatitis development.⁽⁴²⁾

Conditional genetic deletion of ATX from Heps and abrogation of liver production of LPA modulated inflammation and diminished fibrosis, thus establishing ATX as a liver profibrotic factor. Conversely, transgenic Heps-ATX overexpression promoted collagen deposition and fibrosis; noteworthy, transgenic liver ATX expression did not induce any liver phenotype *per se*, suggesting that ATX expression is not sufficient to induce fibrosis, but is rather required to amplify profibrotic signals.

Deletion of ATX from Heps and down-regulation of liver LPA levels had also a profound effect in DEN/ CCl₄-induced HCC, promoting mice survival and attenuating both liver tumor numbers and size. In agreement with a procarcinogenic role for ATX, transgenic overexpression of ATX in the mammary gland resulted in spontaneous breast cancer in aged mice⁽⁴³⁾; noteworthy, the late onset suggests that ATX is not sufficient to promote carcinogenesis per se, as shown here for fibrosis, but is rather required to amplify oncogenic age-related signals. Moreover, reported LPA effects in vitro are concordant with several of the suggested hallmarks of cancer, a conceptual framework of essential alterations in cell physiology that collectively dictate malignant growth in most tumors.⁽⁴⁴⁾ LPA effects, mediated by pathways well consistent with their identity as GPCRs, include proliferation, resistance to cell death, angiogenesis, as well as invasion and metastasis.⁽⁵⁾

Cancer cells, under the pressure of increased proliferation and growth, have been suggested to reprogram their cellular energy metabolism in many different ways, including an increase in glutamine metabolism, the decoupling of glycolysis from pyruvate oxidation in mitochondria (the Warburg effect), and *de novo* FA synthesis, despite sufficient dietary supply and/or increased lipolysis in adipose tissue.^(44,45) Excessive FAs, that can be detrimental for the cell, are esterified with glycerol backbones generating TAGs that are stored in lipid droplets.^(44,45) At times of metabolic need, such as malignant growth, accumulated TAGs can be converted back to FAs through emerging lipolytic mechanisms that were also reported to be upregulated in cancer.^(44,45) Although this delicate balance of FA metabolism in cancer is far from being understood, FAs are essential to cancer cells for the synthesis of structural lipids required for the generation of new cells and the required energy production to sustain it, the biosynthesis of protumorigenic signaling lipids, as well as the resistance to oxidative-stressinduced cell death and chemotherapy.^(44,45)

Strikingly, the most prominent histopathological effect of ATX deletion in DEN/CCl₄-induced HCC was the significant decrease of neutral lipid deposition, indicating perturbations in FA metabolism; no significant liver accumulation of TAGs was detected upon the genetic deletion of ATX, whereas expression profiling revealed, as mostly affected, genes that are involved in lipid metabolism. Among them, Scd2 expression, essential for FA synthesis during early liver development,⁽²⁷⁾ was shown to be aberrantly reactivated in DEN/CCl₄-induced HCC, and was found to be stimulated by LPA in vitro, correlating with increased TAG accumulation. In support, Scd2 expression has been shown to be regulated by sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs; SREBP1a and 2),⁽⁴⁶⁾ transcription factors regulating FA synthesis,⁽⁴⁶⁾ and shown to be stimulated by LPA.⁽⁴⁷⁾ Pharmacological inhibition of SCD, as well as of other enzymes involved in FA synthesis, have been reported to reduce tumor growth and are currently at different levels of preclinical and clinical development.⁽⁴⁵⁾ Noteworthy, ATX/LPA also stimulated the expression of a large number of lipase genes (Supporting Tables S4 and S5), such as Patatin-like phospholipase domaincontaining 5 (Supporting Table S5), a neutral lipase that localizes to lipid droplets and has been shown as a link of TAG mobilization and autophagy.⁽⁴⁸⁾ Therefore, the ATX/LPA axis is critically involved in FA metabolism in cancer cells, in concert with other lipidmodifying enzymatic cascades and likely orchestrated from the adipose tissue, thus contributing to the reprogramming of energy metabolism in malignant cells, an emerging and maybe central cancer hallmark.

Pharmacological inhibition of ATX with PF8380 attenuated CCl₄-induced fibrosis, in agreement with the genetic deletion results. Noteworthy, ATX was recently reported to be inhibited by selective binding of the bile salt, taurourdeoxycholate (TUDCA),⁽⁴⁹⁾ an established treatment of primary biliary cirrhosis and other cholestatic disorders, suggesting that TUDCA efficacy could be partly attributed to ATX inhibition.

Therefore, ATX emerges as a potential therapeutic target in CLDs and possibly HCC, perhaps as an adjuvant therapy to current treatment options.

Acknowledgments: We thank T. Chavakis and I. Talianidis for critical reading of the manuscript. The Tga1t1Ennp2 transgenic mouse and the PF8380 compound were kindly provided by G. Mills and F. Hoffmann-La Roche Ltd., respectively.

REFERENCES

- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010;7:425-436.
- Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. J Biochem 2015;157:81-89.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2010;50:157-186.
- Benesch MG, Ko YM, McMullen TP, Brindley DN. Autotaxin in the crosshairs: Taking aim at cancer and other inflammatory conditions. FEBS Lett 2014;588:2712-2727.
- 5) **Barbayianni E, Kaffe E,** Aidinis V, Kokotos G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. Prog Lipid Res 2015;58: 76-96.
- 6) Oikonomou N, Mouratis MA, Tzouvelekis A, Kaffe E, Valavanis C, Vilaras G, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2012;47:566-574.
- Ikeda H, Yatomi Y. Autotaxin in liver fibrosis. Clin Chim Acta 2012;413:1817-1821.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, et al. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. Dev Biol 2010;339:451-464.
- Postic C, Magnuson MA. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. Genesis 2000;26: 149-150.
- Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 1999;21:70-71.
- Pamuklar Z, Federico L, Liu S, Umezu-Goto M, Dong A, Panchatcharam M, et al. Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. J Biol Chem 2009;284:7385-7394.
- 12) Mazzocca A, Dituri F, De Santis F, Filannino A, Lopane C, Betz RC, et al. Lysophosphatidic acid receptor LPAR6 supports the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2015; 75:532-543.
- Brindley DN, Pilquil C. Lipid phosphate phosphatases and signaling. J Lipid Res 2009;50(Suppl):S225-S230.
- 14) Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. J Exp Med 1994;179:1529-1537.
- Benesch MG, Zhao YY, Curtis JM, McMullen TP, Brindley DN. Regulation of autotaxin expression and secretion by lysophosphatidate and sphingosine 1-phosphate. J Lipid Res 2015; 56:1134-1144.

- 16) Chemin J, Patel A, Duprat F, Zanzouri M, Lazdunski M, Honore E. Lysophosphatidic acid-operated K+ channels. J Biol Chem 2005;280:4415-4421.
- 17) Gierse JK, Thorarensen A, Beltey K, Bradshaw-Pierce E, Cortes-Burgos L, Hall T, et al. A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. J Pharmacol Exp Ther 2010;334:310-317.
- 18) Katsifa A, Kaffe E, Nikolaidou-Katsaridou N, Economides AN, Newbigging S, McKerlie C, Aidinis V. The bulk of autotaxin activity is dispensable for adult mouse life. PLoS One 2015;10: e0143083.
- 19) Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. Cancer Cell 2012;21:504-516.
- 20) Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, et al. Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. Nat Struct Mol Biol 2011;18: 198-204.
- 21) Leblanc R, Lee SC, David M, Bordet JC, Norman DD, Patil R, et al. Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin $\alpha V\beta 3$ controls metastasis of breast cancer cells to bone. Blood 2014;124:3141-3150.
- 22) Tang X, Zhao YY, Dewald J, Curtis JM, Brindley DN. Tetracyclines increase lipid phosphate phosphatase expression on plasma membranes and turnover of plasma lysophosphatidate. Journal of Lipid Research 2016;57:597-606.
- 23) Ptaszynska MM, Pendrak ML, Stracke ML, Roberts DD. Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. Mol Cancer Res 2010;8:309-321.
- 24) Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. Oncogene 2007;26:1-10.
- 25) Bertino G, Ardiri A, Malaguarnera M, Malaguarnera G, Bertino N, Calvagno GS. Hepatocellualar carcinoma serum markers. Semin Oncol 2012;39:410-433.
- 26) Uehara T, Ainslie GR, Kutanzi K, Pogribny IP, Muskhelishvili L, Izawa T, et al. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. Toxicol Sci 2013;132:53-63.
- 27) Miyazaki M, Dobrzyn A, Elias PM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:12501-12506.
- 28) Pleli T, Martin D, Kronenberger B, Brunner F, Koberle V, Grammatikos G, et al. Serum autotaxin is a parameter for the severity of liver cirrhosis and overall survival in patients with liver cirrhosis--a prospective cohort study. PLoS One 2014;9:e103532.
- 29) Wu JM, Xu Y, Skill NJ, Sheng H, Zhao Z, Yu M, et al. Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NFkappaB axis in human hepatocellular carcinoma. Mol Cancer 2010;9:71.
- 30) Luedde T, Schwabe RF. NF-kappaB in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011;8:108-118.
- Li S, Zhang J. Lipopolysaccharide induces autotaxin expression in human monocytic THP-1 cells. Biochem Biophys Res Commun 2009;378:264-268.
- 32) Masamune A, Sakai Y, Yoshida M, Satoh A, Satoh K, Shimosegawa T. Lysophosphatidylcholine activates transcription factor NF-κB and AP-1 in AR42J cells. Dig Dis Sci 2001;46: 1871-1881.

- 33) Ryborg AK, Johansen C, Iversen L, Kragballe K. Lysophosphatidylcholine induces keratinocyte differentiation and upregulation of AP-1- and NF-kappaB DNA-binding activity. Acta Derm Venereol 2004;84:433-438.
- 34) Lovas A, Weidemann A, Albrecht D, Wiechert L, Weih D, Weih F. p100 Deficiency is insufficient for full activation of the alternative NF-kappaB pathway: TNF cooperates with p52-RelB in target gene transcription. PLoS One 2012;7:e42741.
- 35) Subramanian P, Techritz N, Prucnal M, Aidinis V, Chavakis T. Cell type-specific role of ATX in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). 13th International Conference on Innate Immunity, 23–28/06/2016, Rhodes, Greece. 2016;P72.
- 36) D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. PLoS One 2011;6:e24993.
- 37) Ding BS, Cao Z, Lis R, Nolan DJ, Guo P, Simons M, et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. Nature 2014;505:97-102.
- 38) Chou CH, Lai SL, Ho CM, Lin WH, Chen CN, Lee PH, et al. Lysophosphatidic acid alters the expression profiles of angiogenic factors, cytokines, and chemokines in mouse liver sinusoidal endothelial cells. PLoS One 2015;10:e0122060.
- 39) Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. J Lipid Res 2008;49:84-97.
- 40) Huang Y, Fu JF, Shi HB, Liu LR. Metformin prevents nonalcoholic fatty liver disease in rats: role of phospholipase A2/lysophosphatidylcholine lipoapoptosis pathway in hepatocytes. Zhonghua Er Ke Za Zhi 2011;49:139-145.
- Kulkarni P, Getzenberg RH. High-fat diet, obesity and prostate disease: the ATX-LPA axis? Nat Clin Pract Urol 2009;6:128-131.
- 42) Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/

LPC and ATX/LPA axes. Biochim Biophys Acta 2013;1831: 42-60.

- 43) Liu S, Umezu-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, et al. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. Cancer Cell 2009;15:539-550.
- Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2014;144:646-674.
- Rohrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. Nat Rev Cancer 2016;16:732-749.
- 46) Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. J Biol Chem 1998;273: 35299-35306.
- 47) Mukherjee A, Wu J, Barbour S, Fang X. Lysophosphatidic acid activates lipogenic pathways and de novo lipid synthesis in ovarian cancer cells. J Biol Chem 2012;287:24990-25000.
- 48) Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, Castillo EF, Masedunskas A, Weigert R, et al. Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. Curr Biol 2014;24:609-620.
- 49) Keune WJ, Hausmann J, Bolier R, Tolenaars D, Kremer A, Heidebrecht T, et al. Steroid binding to Autotaxin links bile salts and lysophosphatidic acid signalling. Nat Commun 2016;7:11248.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28973/suppinfo.